



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET



Dalibor Mihajlović

**ULOGA HENODEOKSIHOLNE I URSODEOKSIHOLNE
KISELINE NA FUNKCIONALNE I BIOHEMIJSKE
PROMJENE SRCA NA MODELU IZOPRENALINSKE
KARDIOTOKSIČNOSTI KOD PACOVA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2024. godine



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Dalibor Mihajlović

**THE ROLE OF HENODEOXYCHOLIC AND
URSODEOXYCHOLIC ACIDS ON THE FUNCTIONAL AND
BIOCHEMICAL CHANGES OF THE HEART IN THE
ISOPRENALINE CARDIOTOXICITY MODEL IN RATS**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2024.

Ovaj rad posvećujem svojoj porodici, koja je bila moj oslonac i izvor snage tokom cijelog puta. Posebnu zahvalnost dugujem svojim kćerkama, koje su mi svakodnevno davale inspiraciju i podsjećale me na važnost istrajnosti, ljubavi i posvećenosti. Njihova radoznalost i vedrina bili su mi vjetar u leđa tokom mnogih izazova. Bez njihove podrške, razumijevanja i neizmjerne ljubavi, ovaj uspjeh ne bi bio moguć. Ovaj rad je, u svakom smislu, rezultat ne samo mog truda, već i naše zajedničke snage kao porodice.

Mentor: Prof. dr Velibor Vasović, redovni profesor, Medicinski fakultet u Novom Sadu.

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

Naslov doktorske disertacije: *Uloga henodeoksiholne i ursodeoksiholne kiseline na funkcionalne i biohemijske promjene srca na modelu izoprenalinske kardiotoksičnosti kod pacova*

Rezime: Akutni infarkt srca je danas najveći javno medicinski problem, jer je vodeći uzrok smrti u razvijenim zemljama. Možemo ga definisati kao nesrazmjeru između dotoka krvi kardiomiocitima i njihovih potreba, što rezultuje njihovom nekrozom. U mjestu nastanka infarkta tj. nekroze, javlja se upalni odgovor čiji je zadatak da ukloni mrtve ćelije i zamijeni ih drugim, funkcionalno manje vrijednim ćelijama. Takođe, u ishemično nekrotičnom tkivu se javlja porast reaktivnih kiseoničnih molekula odnosno markera oksidativnog stresa. Pretpostavljeno kardioprotektivno dejstvo ursodeoksiholne kiseline i dejstvo henodeoksiholne kiseline posmatrano je i praćeno preko funkcionalnih i biohemijskih parametara koji su određivani u ovoj studiji. Kao model kardiotoksičnosti uzet je model izoprenalinske kardiotoksičnosti, jer u potpunosti izaziva promjene u srcu, kao i kod akutnog infarkta srca koji je izazvan koronarnom okluzijom. Studija je rađena na sljedeći način: zdravi pacovi su metodom slučajnog izbora na početku eksperimenta podijeljeni u 6 grupa. Pacovi su bili približno iste tjelesne težine, Wistar albino soja, i to mužjaci. Tretman svake grupe je trajao 10 dana a 11-og dana je rađeno žrtvovanje životinja. Prva grupa označena kao kontrolna (C) grupa, ona je tokom 10 dana dobijala vehikulum za žučne kiseline, tj. propilen glikol (PG), a 9-og i 10-og dana uz njega je dat i 0,9% fiziološki rastvor. Druga grupa, izoprenalinska (I) grupa je primala propilen glikol 10 dana a 9-og i 10-og dana je uz njega primala i izoprenalin. Treća grupa, ursodeoksiholna grupa (UDCA) je 10 dana primala ursodeoksiholnu kiselinu *per os*, a 9-og i 10-og dana je dobila i 0,9% fiziološki rastvor. Četvrta grupa, henodeoksiholna grupa (CDCA) je tokom 10 dana primala *per os* henodeoksiholnu kiselinu, a uz nju 9-og i 10-og dana je dobila i 0,9% fiziološki rastvor. Peta grupa, ursodeoksiholna grupa plus izoprenalin (UDCA I) je tokom 10 dana *per os* dobijala ursodeoksiholnu kiselinu, a 9-og i 10-og dana je primila i izoprenalin. I šesta grupa, henodeoksiholna grupa plus izoprenalin (CDCA I) je grupa koja je tokom 10 dana primala *per os* henodeoksiholnu kiselinu da bi 9-og i 10-og dana primila i izoprenalin.

Evaluacijom dobijenih parametara nakon žrtvovanja životinja pokazano je da je pretretman sa UDCA i CDCA u grupama koji su primale izoprenalin (UDCA I, CDCA I) znatno smanjio vrijednosti visoko osjetljivog troponina I u odnosu na grupu sa izoprenalinom, ali bez pretretmana sa žučnim kiselinama (I). Takođe su smanjene vrijednosti reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS) u grupama koje nisu primale izoprenalin (UDCA, CDCA i C grupa), a u grupama koje su primale izoprenalin vrijednosti TBARS bile su značajno niže u UDCA I u odnosu na I grupu. Isto tako je primijećen i trend porasta antioksidanasa (Katalaze-CAT, Glutathiona-GSH i Super oksid dismutaze-SOD) u grupama koje su primale UDCA i CDCA. U grupama koji su primale izoprenalin vrijednosti GSH su bile značajno više u CDCA I u odnosu na UDCA I i grupu I. Efekat pretretmana sa žučnim kiselinama na ostale praćene parametre biće prikazan u studiji.

Ključne riječi: infarkt srca izazvan izoprenalinom, henodeoksiholna kiselina, ursodeoksiholna kiselina, oksidativni stres, žučne kiseline

Naučna oblast: Medicinske i zdravstvene nauke

Naučno polje: Medicinske nauke

Uža naučna oblast: Kardiologija, Fiziologija

Klasifikciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrarniku: B 470

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

Mentor: Velibor Vasović, MD, PhD, full professor, Faculty of Medicine in Novi Sad.

Comentor: Ranko Škrbić, MD, PhD, full professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka.

Title of doctoral dissertation: *The role of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on functional and biochemical changes of the heart in the model of isoprenaline cardiotoxicity in rats*

Summary: Acute myocardial infarction is currently the largest public health issue, being the leading cause of death in developed countries. It can be defined as a mismatch between the blood supply to cardiomyocytes and their needs, resulting in their necrosis. At the site of infarction, i.e., necrosis, an inflammatory response occurs, aiming to remove dead cells and replace them with functionally inferior ones. In addition, ischemic necrotic tissue shows an increase in reactive oxygen species, which are markers of oxidative stress. The presumed cardioprotective effect of ursodeoxycholic acid and the effect of chenodeoxycholic acid were observed and monitored through functional and biochemical parameters determined in this study. The model of isoproterenol-induced cardiotoxicity was chosen as it induces changes in the heart similar to those caused by acute myocardial infarction due to coronary occlusion. The study was conducted as follows: Healthy rats were randomly divided into six groups at the start of the experiment. The rats were approximately of the same body weight, of the Wistar albino strain, and male. The treatment for each group lasted 10 days, and on the 11th day, the animals were sacrificed. The first group, labeled as the control (C) group, received a vehicle for bile acids, i.e., propylene glycol (PG), for 10 days, and on the 9th and 10th days, 0.9% saline solution was added. The second group, the isoproterenol (I) group, received propylene glycol for 10 days, and on the 9th and 10th days, they also received isoproterenol. The third group, the ursodeoxycholic acid group (UDCA), received ursodeoxycholic acid orally for 10 days, and on the 9th and 10th days, they also received 0.9% saline solution. The fourth group, the chenodeoxycholic acid group (CDCA), received chenodeoxycholic acid orally for 10 days, and on the 9th and 10th days, they also received 0.9% saline solution. The fifth group, the ursodeoxycholic acid plus isoproterenol group (UDCA I), received ursodeoxycholic acid orally for 10 days, and on the 9th and 10th days, they also received isoproterenol. The sixth group, the chenodeoxycholic acid plus isoproterenol group (CDCA I), received chenodeoxycholic acid orally for 10 days, and on the 9th and 10th days, they also received isoproterenol. Evaluation of the obtained parameters

after the animals were sacrificed showed that pretreatment with UDCA and CDCA in the groups receiving isoproterenol (UDCA I, CDCA I) significantly reduced the levels of high-sensitivity troponin I compared to the isoproterenol group without bile acid pretreatment (I). In addition, thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels were reduced in the groups not receiving isoproterenol (UDCA, CDCA, and C group), and in the isoproterenol-treated groups, TBARS levels were significantly lower in the UDCA I group compared to the I group. A trend of increased antioxidant levels (Catalase - CAT, Glutathione - GSH, and Superoxide Dismutase - SOD) was also observed in the UDCA and CDCA groups. In the isoproterenol-treated groups, GSH levels were significantly higher in the CDCA I group compared to the UDCA I and I groups. The effect of bile acid pretreatment on other monitored parameters will be presented in the study.

Keywords: isoprenaline-induced heart attack, chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid, oxidative stress, bile acids

Scientific area: Medical and health sciences

Scientific field: Medical sciences

Narrow scientific area: Cardiology, Physiology

Classification code for the scientific area according to the CERIF codebook: B 470

Type of the selected licence of the Creative Commons how to use the content of the doctoral dissertation: Attribution–Non-Commercial –Share Alike

SADRŽAJ

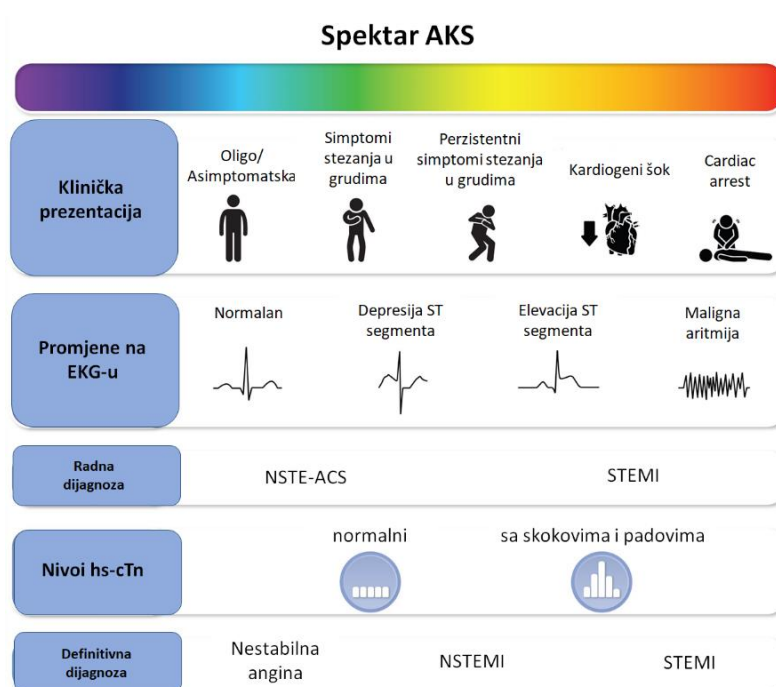
I. UVOD	1
1.1. Akutni koronarni sindrom.....	1
1.2. Oksidativni stres kod oštećenja srca	4
1.2.1. Izvori proizvodnje ROS-a	6
1.2.2. Antioksidansni sistemi i zaštita kod oštećenja srca.....	7
1.2.3. Posljedice oksidativnog stresa na srce	9
1.3. Inflamacija kod oštećenja srca	11
1.4. Remodelovanje srca nakon oštećenja	13
1.5. Apoptoza.....	17
1.6. Citotoksičnost i citoprotektivnost žučnih kiselina	18
1.7. Uloga NFκB kod infarkta miokarda	24
1.7.1. Kardioprotektivna uloga NF-κB u srčanom tkivu.....	26
1.7.2. Kardiotoksična uloga NFκB u srčanom tkivu.....	27
1.8. TNF-α i njegova uloga kao posrednika u infarktu miokarda.....	28
1.9. Regulator apoptoze BAX i infarkt miokarda.....	30
1.10. Eksperimentalni model akutnog infarkta srca izazvanog izoprenalinom.....	31
II. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
III. HIPOTEZE	35
IV. MATERIJAL I METODE	36
4.1. Eksperimentalne životinje.....	36
4.2. Eksperimentalni protokol.....	36
4.2.1. Formiranje grupa.....	36
4.2.2. Kontrolna grupa.....	37
4.2.3. Eksperimentalne grupe.....	37
4.3. Postupak uzorkovanja i analize krvi	41

V. REZULTATI.....	43
5.1. Efekti primjene UDCA i CDCA na biokemijske parametre i serumske srčane markere	43
5.2. Efekti CDCA i UDCA na markere oksidativnog stresa	45
5.3. Efekti UDCA i CDCA na proinflamatorne povezane citokinske gene i gene koji regulišu apoptozu.....	49
5.4. Efekti UDCA i CDCA u prevenciji nastanka patohistoloških promjena na miokardu.....	51
VI. DISKUSIJA.....	53
VII. ZAKLJUČCI	60
VIII. LITERATURA	61
LISTA SKRAĆENICA.....	86
BIOGRAFIJA.....	89

I. UVOD

1.1. Akutni koronarni sindrom

Akutni koronarni sindrom (AKS) se definiše kao smanjen dotok krvi u miokard što se manifestuje kao infarkt miokarda sa elevacijom ST segmenta ili ACS bez elevacije ST, što uključuje nestabilnu anginu i infarkt miokarda bez elevacije ST segmenta. Uobičajeni faktori rizika uključuju starost od najmanje 65 godina, neliječenu hipertenziju, dijabetes melitus, hiperlipidemiju, pušenje cigareta, indeks tjelesne mase veći od 25 kg po m² ili porodičnu anamnezu preuranjene koronarne bolesti. Simptomi koji najviše predviđaju AKS uključuju nelagodnost u grudima koja je substernalna ili se širi u ruke (najčešće lijevu) ili vilicu (1).



Slika 1. Spektar kliničke slike, elektrokardiografski nalaz i visokoosjetljivi nivoi srčanog troponina kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom (2)

Legenda: ACS - akutni koronarni sindrom; EKG - elektrokardiogram; hs-cTn - srčani troponin visoke osjetljivosti; NSTE-ACS - akutni koronarni sindrom bez ST-elevacije; NSTEMI - infarkt miokarda bez ST-elevacije; STEMI - infarkt miokarda sa elevacijom ST.

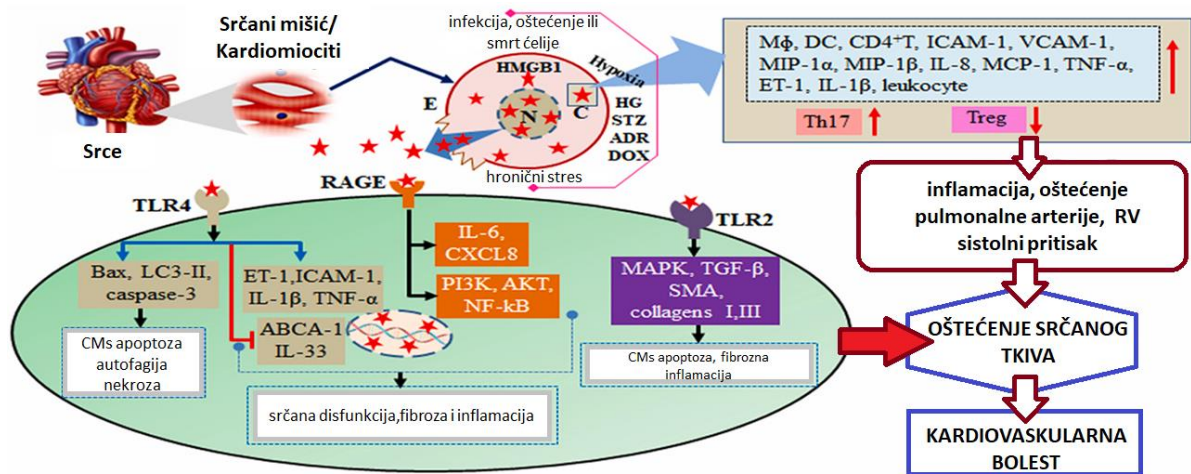
Dakle, akutni koronarni sindromi (AKS) obuhvataju spektar stanja koja uključuju pacijente sa nedavnim promjenama kliničkih simptoma ili znakova, sa ili bez promjena na

12-kanalnom elektrokardiogramu (EKG) i sa ili bez akutnog povećanja koncentracije troponina (cTn), (slika 1). Pacijenti sa sumnjom na AKS mogu na kraju dobiti dijagnozu akutnog infarkta miokarda (AIM) ili nestabilne angine pektoris (NA). Dijagnoza infarkta miokarda (IM) je povezana sa oslobađanjem cTn i postavlja se na osnovu četvrte univerzalne definicije IM (3). NA se definiše kao ishemija miokarda u mirovanju ili pri minimalnom naporu u odsustvu akutne povrede/nekroze kardiomiocita. Karakteriše je specifični klinički nalazi produžene (>20 min) angine u mirovanju; nova pojava teške angine; angina koja se povećava po učestalosti, duže u trajanju ili sa nižim pragom; ili angina koja se javlja nakon nedavne epizode IM. AKS je povezan sa širokim spektrom kliničkih prezentacija, od pacijenata koji su bez simptoma na prezentaciji - do pacijenata sa kontinuiranom nelagodnošću/simptomima bola u grudima i pacijenata sa srčanim zastojem, električnom/hemodinamskom nestabilnošću ili kardiogenim šokom (slika 1).

Pacijenti sa sumnjom na AKS se obično klasifikuju na osnovu prezentacije EKG-a, a u svrhu početnog liječenja. Nakon toga, pacijenti se mogu dalje klasifikovati na osnovu prisustva ili odsustva povišenja srčanog troponina (kada ovi rezultati budu dostupni), kao što je prikazano na slici 1. Ove karakteristike (EKG promjene i povišenje troponina) su važne u početnoj trijaži i dijagnoza pacijenata sa AKS, kao i početnoj strategiji tretmana. Međutim, nakon faze akutnog liječenja i stabilizacije, većina aspekata strategije naknadnog liječenja je zajednička za sve pacijente sa AKS (bez obzira na početni EKG obrazac ili prisustvo/odsustvo povišenja srčanog troponina).

Na osnovu EKG karakteristika (odsutnost ili prisutnost ST elevacije), razlikuju se STEMI (*ST elevation myocardial infarction*) i NSTEMI (*non ST elevation myocardial infarction*) akutni koronarni sindromi (slika 1). Zajednička patofiziologija AKS je ruptura ili erozija ateromatoznog plakasa posljedičnom trombozom, inflamacijom, vazokonstrikcijom i mikroembolizacijom (4-6). Istraživanja pokazuju povećanje biomarkera i prije pojave biomarkera nekroze (cTnI, cTnT), kao što su: upalni citokini, ćelijske adhezione molekule, matriks metaloproteinaze, visoko senzitivni C-reaktivni protein (hs-CRP), biomarkeri destabilizacije plaka, biomarkeri ishemije (npr. holin, ishemijom modifikovan albumin), biomarkeri srčane disfunkcije (B-tip natriuretskog peptida), itd. Oni mogu olakšati raniju procjenu ukupnog rizika i pomoći u identifikaciji i tretmanu pacijenata sa simptomima koji upućuju na AKS prije smrti ćelija (7).

Epidemiološki posmatrano, kardiovaskularne bolesti (KVB) su najčešći uzrok mortaliteta i morbiditeta širom svijeta, pri čemu značajan dio ovog tereta snose zemlje sa niskim i srednjim prihodima (7,8). AKS je često prva klinička manifestacija KVB. U 2019. godini bilo je procijenjenih 5,8 miliona novih slučajeva ishemijske bolesti srca u 57 zemalja članica ESC (engl. *National Cardiac Societies*), (8). Prosječna procjena incidencije standardizovane po starosti na 100 000 ljudi bila je 293,3 (interkvartilni odnos 195,8–529,5). KVB je i dalje najčešći uzrok smrti u zemljama članicama ESC, što predstavlja nešto manje od 2,2 miliona smrtnih slučajeva kod žena i nešto više od 1,9 miliona smrtnih slučajeva kod muškaraca u posljednjoj godini dostupnih podataka (2019. godina). Ishemijska bolest srca je najčešći uzrok smrti od KVB, čineći 38% svih smrtnih slučajeva od KVB kod žena i 44% kod muškaraca (8).



Slika 2. Povezanost kardiovaskularnih bolesti sa inflamatornim odgovorom, zbog oslobađanja slobodnih kiseoničnih radikala i proteolitičkih enzima (9)

AKS je povezan sa inflamatornim odgovorom, zbog oslobađanja slobodnih kiseoničnih radikala i proteolitičkih enzima (9). Nekrozom kardiomiocita oslobađaju se signalne molekule opasnosti (npr. HMGB1- nuklearni protein hromatina), koje se vežu za upalne receptore (RAGE, TLR receptore) koji potom aktiviraju komponente komplementa i djeluju na MAPK (mitogenima aktivirane protein kinaze) i NF kB (nuklearni faktor kapa B). Aktivacijom MAPK i NF kB dolazi i do aktivacije proupalnih gena koji, dovode do stvaranja upalnih citokina (TNF- tumor nekroza faktora, IL-6- interleukin 6, IL-1- interleukin 1, IL-18- interleukin 18), hemokina i adhezionih molekula. Stvorene molekule pojačavaju upalni odgovor (stimulišući MAPK, NF kB) i privlače upalne ćelije (neutrofile, monocite,

limfociteimastocite) dovodeći do njihove ekstravazacije u oštećeno tkivo srca (10). Upalni tj. inflamatorni proces u velikoj mjeri može da utiče na veličinu nekrotične lezije srca (11).

1.2.Oksidativni stres kod oštećenja srca

Pokazalo se da su razne kardiovaskularne bolesti povezane sa viškom proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS),(12-15). ROS čine i slobodni radikali kiseonika, kao što su superoksid, hidroksilni radikali i peroksi radikali, kao i neradikali, kao što su vodonik peroksid, hipohlorna kiselina itd. (16). U većini tipova ćelija, mitohondrije su glavni pokretači intracelularne proizvodnje oksidanata, dok su drugi relevantni izvori nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze (sažeti kao NOKS porodica enzima). Pored toga, brojni drugi enzimi kao što su ksantin oksidaza, sintaza azot oksida, ciklooksigenaze, enzimi citokroma P450 i lipoksigenaze, kao i druge ćelijske organele, poput peroksizoma i endoplazmatskog retikuluma, doprinose intracelularnoj proizvodnji ROS (17). Proteini, lipidi i DNK su primarne ćelijske strukture na koje utiču ROS i reaktivne vrste azota (RNS). Generisanje molekularnog kiseonika u obliku ROS je prirodni dio aerobnog života. S tim u vezi, bazalni nivoi ROS-a su neophodni za ispoljavanje različitih ćelijskih funkcija, kao što su putevi transdukcije signala, odbrana od invazivskih mikroorganizama, ekspresija gena i promocija rasta ili smrti (18).Uprkos ključnoj važnosti redoks reakcija, disregulacija signalizacije oksidansa može izazvati ili ubrzati mnoštvo patoloških stanja, kao što je brzina starenja. Međutim, organizamposjeduje zaštitne mjere protiv ROS - preko enzimskih (npr. superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksiredoksina (Prk) i glutation peroksidaze (GSH-Pk)), kao i neenzimskih jedinjenja (npr. tokoferol/vitamin E, beta-karoten, askorbat, glutation (GSH) i nikotinamid (NAM)),(19). Noviji istraživački dokazi omogućavaju istraživanje redoks signalnih puteva sa adekvatnim hemijskim detaljima, i postalo je jasno da su redoks procesi podjednako važni u (pato)fiziologiji, kao i reakcije fosforilacije-defosforilacije, ili centralni mehanizmi odgovorni za kontrolu genoma i epigenoma, kao što je acetilacija-deacetilacija i metilacija-demetilacija (20). Međutim, analiza redoks sistema je izazovna zbog značajnih subćelijskih razlika u redoks potencijalu i kratkog životnog vijeka ROS. Otkriće brojnih biomarkera oksidativnog stresa je olakšalo mjerenje ROS; međutim, njihova klinička upotreba još uvijek treba da bude validirana s obzirom na ogromnu raznolikost oksidativnog stresa između različitih bolesti, posebno AKS.

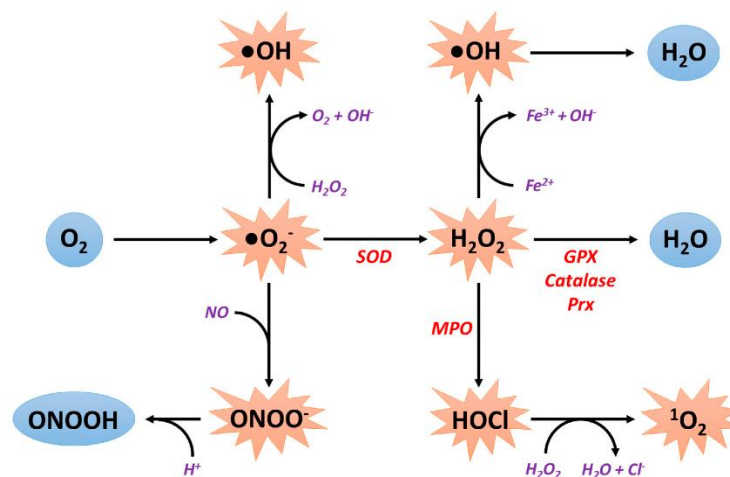
Ćelije postavljaju antioksidativni obrambeni sistem koji se uglavnom bazira na enzimskim komponentama, poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx), kako bi se zaštitili od ROS-indukovanog ćelijskog oštećenja (21). U ishemičnom miokardu izvori ROS-a su mitohondrijski lanac transportnih elektrona (disfunkcija rada mitohondrija), povećana aktivnost azot oksid sintetaze (NOS), ksantin oksidaze, autooksidacije kateholamina i drugi izvori (22). Toksični efekti produkovanih ROS u miokardiocitima dovodi do njihovog oštećenja ili smrti kroz različite mehanizme, a najčešće alteracijom u homeostazi Ca^{2+} i Fe, poremećaja u funkciji mitohondrija i sarkoplazmatskog retikuluma, promjena u sintezi nukleinskih kiselina i proteina, degradacije miofilamenata i komponenti citoskeleta (23). Reaktivne kiseonične vrste imaju profibrotičku funkciju tj. idukuju proliferaciju fibroblasta i aktiviraju matriksne metaloproteinaze. ROS direktno oštećuju kontraktilnu strukturu kardiomiocita putem modifikacije proteinskog sistema koji učestvuje u kontrakciji ćelija srca i preko kanalskih sistema (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ i $Na-K^+$ kanala). Oštećenjem ili smrću srčanih ćelija u krvi se mogu detektovati biomarkeri srčane nekroze, a najčešće korišten i u praksi okarakterisani kao zlatni standard su srčani troponini (T i I troponin).

Oksidativni stres je češće povezan sa povišenim nivoima ROS ili reaktivnih azotnih vrsta (RNS) u ćelijskom i subćelijskom nivou. Međutim, ROS/RNS na suboptimalnom nivou mogu djelovati kao signalni molekuli u održavanju kardiovaskularne funkcije. S druge strane, povećani nivoi ROS/RNS mogu izazvati patologiju oštećenjem lipida, proteina i DNK. Dakle, ROS će u zavisnosti od njihove koncentracije, mjesta proizvodnje i ukupne redoks ravnoteže ćelije odrediti njeno biološko djelovanje (korisno ili štetno) u tkivima. Kardiovaskularna patologija povezana sa oksidativnim stresom primjećena je kod nekoliko srčanih oboljenja kao što su ishemija/reperfuzijska povreda, ateroskleroza, dijabetička kardiomiopatija i sl.

Žučne kiseline, koji se sintetišu iz holesterola u hepatocitima jetre, predmet su proučavanja, zahvaljujući njihovoj složenoj mreži signalnih puteva koju ispoljavaju na hepatocite, miokardiocite i druge ćelije. Jedna od svojstava žučnih kiselina je njihovo djelovanje na citotoksičnost, odnosno citoptotekciju, a ta svojstva zavise od hidrofobnosti odnosno od hidrofilnosti žučnih kiselina. Ursodeoksiholna kiselina (UDCA) kao hidrofilnažučna kiselina, ihhibiše apoptozu i nekrozu ćelija preko više efekta među kojima je i sprečavanje stvaranja ROS-a (24).

1.2.1. Izvori proizvodnje ROS-a

ROS dakle ima i korisnu i štetnu ulogu. Oksidativni stres se javlja kada god je proizvodnja ROS-a veća od antioksidativnih kapaciteta. ROS se generiše kao nusprodukt mitohondrijalnog disanja ili metabolizma ili pomoću specifičnih enzima. Različiti faktori životne sredine i/ili izlaganje različitim agensima podstiču proizvodnju ROS-a i doprinose pojavi brojnih patologija kao što je ovdje slučaj sa kardiovaskularnim bolestima(25-27). Na nivou srca, kao što smo već naveli glavni izvori ROS-a su mitohondrijski lanac transporta elektrona, ksantin oksidaza, NADPH oksidaze (NOKS) i sintaze azotnog oksida (NO). Dioksisgen (O_2) je polazna tačka za formiranje ROS-a. Tako, „hvatanjem“ elektrona, dioksisgen izaziva stvaranje superoksidnih anjona ($\bullet O_2^-$). Ovo su najzastupljeniji ROS u ćelijama i odgovorni su za formiranje svih drugih tipova ROS-a, posebno hidrosil ($\bullet OH$) i hidroperoksi ($\bullet HO_2$) radikala i drugih neradikalnih vrsta, kao što je vodonik peroksid (H_2O_2) koji mogu da formiraju hidrosilni radikal (28).



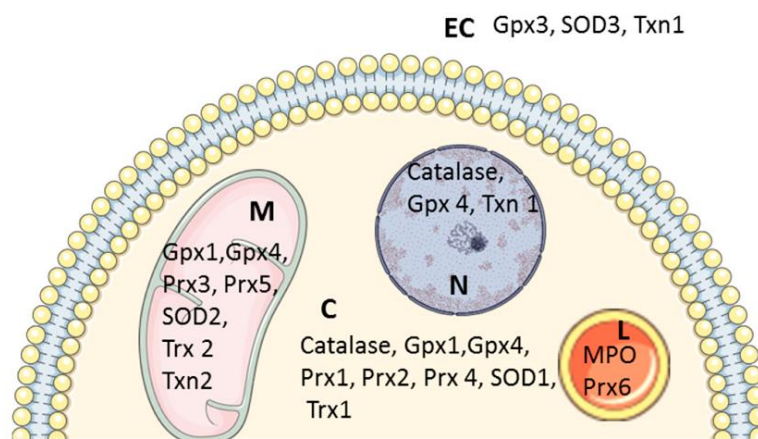
Slika 3. Formiranje ROS i detoksikacija. 1O_2 : singletni kiseonik; Cl^- : hlorid jon; Fe^{2+} : gvožđe (II) jon; Fe^{3+} : gvožđe (III) jon; GPXS: glutation peroksidaza; H^+ : proton; H_2O : voda; H_2O_2 : vodonik peroksid; $HOCl$: hipohlorna kiselina; MPO: mijeloperoksidaze; NE: azot oksid; O_2 : kiseonik; $\bullet O_2^-$: superoksid anjon; $\bullet OH$: hidrosilni radikal; $ONOO^-$: peroksinitrit; $ONOOH$: peroksinitrozna kiselina; Prk: peroksiredoksini; SOD: superoksid dismutaze (28).

Superoksidni anjoni tada mogu da stupe u interakciju sa NO da bi formirali peroksinitrit ($ONOO^-$) ili da bi se pretvorili u vodonik peroksid dejstvom enzima superoksid dismutaze (SOD). Superoksidni anjoni takođe mogu da reaguju sa vodonik-peroksidom, što dovodi do proizvodnje hidrosilnog radikala (29). Pored toga, peroksinitrit se detoksikuje do peroksinitrozne kiseline ($ONOOH$) nakon hvatanja protona. Vodonik peroksid može

dovesti do stvaranja hidroksilnih radikala u reakciji sa prisustvom jona gvožđa i do stvaranja hipohlorne kiseline (HOCl) dejstvom mijeloperoksidaza. Vodonik-peroksid se na kraju detoksikuje u vodi dejstvom nekoliko enzima: glutacion peroksidaze (GPKS), katalaze i peroksiredoksina (Prk). Konačno, hipohlorna kiselina može da stupi u interakciju sa vodonik-peroksidom i formira singletni kiseonik ($1O_2$), (slika 3).

1.2.2. Antioksidansni sistemi i zaštita kod oštećenja srca

Nekoliko antioksidativnih odbrambenih sredstava štiti biološke sisteme, pa tako i srce od toksičnosti ROS-a i uključuje antioksidativne enzime sa specifičnom raspodjelom (superoksid dismutaza (SOD), katalaza, glutacion peroksidaza, glutacion-S-transferaza i glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza) i neenzimske antioksidante, abilirubin -tokoferol i β -karoten),(30), (Slika 4).



Slika 4. Kompartimentalizacija srčanih antioksidativnih enzima. C: citosol; EC: Ekstracelularni odjeljak; L: lizozomi; M: mitohondrije; N: jedro; GPKS 1–4: glutacion peroksidaza 1–4; SOD 1–3: superoksid dismutaza 1–3; Tkn 1–2: tioredoksin 1 i 2; Trk 1–2: tioredoksin reduktaza 1 i 2; MPO: mijeloperoksidaza; Prk 1–6: peroksiredoksin 1–6 (30).

Superoksidne dismutaze (SOD) su metaloproteini sposobni da katalizuju transformaciju superoksidnog anjona ($\bullet O_2^-$) u vodonik peroksid (H_2O_2). To je najefikasniji antioksidativni enzim kod čovjeka. Zaista, detoksikacijom superoksidnih anjona, SOD inhibiraju njihovu reakciju sa NO i sprečavaju stvaranje peroksinitrita ($ONOO^-$). Postoje tri izoforme SOD sa specifičnom subćelijskom lokalizacijom da bi bile bliže izvoru proizvodnje ROS: citosolni SOD1, mitohondrijski SOD2 i ekstracelularni SOD3. Ove izoforme takođe

zahtijevaju različite metalne kofaktore i dimerizaciju za svoju aktivnost: SOD1 dimer i SOD3 tetramer zahtijevaju vezu za bakar (Cu) i za cink (Zn), pa se zato nazivaju Cu-ZnSOD, dok tetramer SOD2, koji se također naziva MnSOD, koristi mangan (Mn) kao kofaktor (31).

U literaturi je opisana implikacija SOD u kardiovaskularnim bolestima. Na primjer, inhibicija ekspresije SOD2 je izazvala i mitohondrijski oksidativni stres i hipertrofiju kardiomiocita (32). Štaviše, miševi sa nedostatkom SOD2 umiru od kardiomiopatije u roku od 10 dana od rođenja, dok heterozigotni SOD2(+/-) miševi pokazuju ultrastrukturno oštećenje miokarda i mitohondrija, povezano sa povećanim oksidativnim stresom (formiranje nitrotirozina i peroksidacija lipida), kao i aktivacija apoptotičkih signalnih puteva u srcu (33). S druge strane, aktivnost SOD3 je bila nezavisno povezana sa abnormalnim obrascima geometrije lijeve komore (34).

Nekoliko enzima je u stanju da detoksifikuje vodonik peroksid u vodu. Među njima, katalaza, tetramerni hem protein, ima ovu funkciju u zavisnosti od koncentracije vodonik peroksida: u slučaju visoke koncentracije vodonik peroksida, aktivnost katalitičke detoksikacije je najvažnija, dok u slučaju niske koncentracije vodonik peroksida, aktivnost peroksidaze je glavna funkcija, uz peroksidaciju različitih supstrata kao što su funkcije alkohola ili askorbinske kiseline (35). Zanimljivo je da transgeni miševi koji ekspimiraju katalazu ciljanu na mitohondrije pokazuju slabljenje razvoja mitohondrijalnog oksidativnog stresa i hipertenzije izazvanog dimom cigareta ili angiotenzinom II (AngII) u poređenju sa miševima divljeg tipa.

Peroksiredoksini (Prk) su enzimi sposobni da smanje peroksidne funkcije nekoliko molekula, uključujući vodonik peroksid i peroksinitrit. Kod ljudi se može razlikovati šest različitih izoformi Prk, sa različitim subćelijskim lokacijama (36), (Slika 4). Na nivou srca, peroksiredoksin 2 i 4 su identifikovani proteomskom analizom kao uključeni u kardiomiopatiju i srčanu insuficijenciju (37-39).

Glutation peroksidaze (Gpk) su tetramerni selenoproteini koji se nalaze u citoplazmi, jezgrima i mitohondrijama i odgovorni su za detoksikaciju vodonik-peroksida u vodi i eliminaciju ostataka peroksida iz lipida koristeći redukcijske kapacitete para glutathion/glutathion sulfid (GSH/GSSG),(31). Ovaj sistem lančane reakcije funkcioniše samo ako se GSSG kontinuirano redukuje u GSH pomoću glutathion reduktaze, koja je sama aktivna u prisustvu NADPH, generisana metaboličkim spajanjem sa pentozofosfatnim

putem (40). Treba napomenuti da je Gpk4 smanjen u ranim i srednjim stadijumima infarkta miokarda (41).

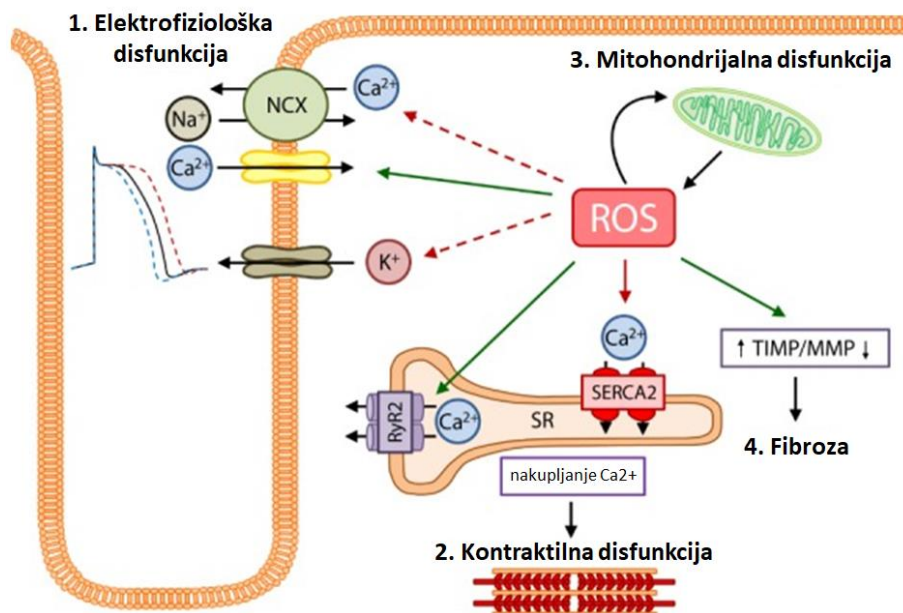
Generalno, svi proteini koji sadrže tiolne grupe imaju redukciona svojstva i mogu lako da zarobe ROS. Glutation je glavni intracelularni tiol u ćelijama, u kojima je prisutan u suštini u redukovanom obliku. Glutation ima nekoliko antioksidativnih svojstava: on je kofaktor Gpk, helator prelaznih metala i konačni regeneratorko vitamina C i E. Glutation takođe može da interaguje sa hidroksilnim radikalom ili sa funkcijama peroksida. Konačno, odnos GSH/GSSG se smatra veoma dobrim markerom oksidativnog stresa i tačnije peroksidacije lipida. Albumin se smatra plazmatskim ekvivalentom glutaciona. Štaviše, vitamin C, koji se takođe naziva askorbinska kiselina, smatra se najefikasnijim antioksidansom rastvorljivim u vodi u ljudskoj plazmi (42). Vitamin E pokriva sve izomere tokoferola, uglavnom predstavljene α -tokoferolom. Uglavnom se unosi putem hrane, posebno ulja, orašastih plodova i lješnika. Lipofilna priroda vitamina E, kao i njegova lokacija na ćelijskoj membrani, daje mu snažno antioksidativno dejstvo sprječavanjem peroksidacije lipida.

1.2.3. Posljedice oksidativnog stresa na srce

Oksidativni stres je uključen u razvoj i napredovanje kliničke i eksperimentalne srčane insuficijencije i AKS (43-46). Oksidativni stres se definiše kao disregulacija između proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i endogenih antioksidativnih odbrambenih mehanizama, tzv. „redoks stanje“. Kada je prisutan u niskim koncentracijama, ROS igra kritičnu funkciju u ćelijskoj homeostazi. Međutim, višak ROS izaziva ćelijsku disfunkciju, peroksidaciju proteina i lipida, oštećenje DNK i na kraju dovodi do nepovratnog oštećenja ćelije i smrti. Ovo je takođe očigledno u srcu gdje su visoko osjetljivi testovi troponina pokazali povećanje oslobađanja troponina tokom progresije srčane insuficijencije, što ukazuje na postepeni gubitak kardiomiocita (47).

U srcu, prevelika količina ROS može dovesti do razvoja i progresije neprilagođenog remodeliranja miokarda i srčane insuficijencije (slika 5). ROS direktno oštećuje elektrofiziologiju i kontraktilnu strukturu kardiomiocita modifikujući proteine koji su centralni za vezu ekscitacije i kontrakcije, uključujući kalcijumove kanale L-tipa, natrijumove kanale, kalijumove kanale i natrijum-kalcijum pumpu. ROS takođe može da

promijeni aktivnost sarkoplazmatski retikulum Ca^{2+} -adenozin trifosfataze (SERCA) kao i smanjuju osjetljivost miofilamenta na kalcijum. Štaviše, ROS indukuje energetski deficit utičući na funkciju proteina uključenih u energetski metabolizam. Konačno, ROS ima profibrotičku funkciju, izazivanjem srčane proliferacije fibroblasta i matriks metaloproteinaze koje rezultuju ekstracelularnim remodeliranjem (48).



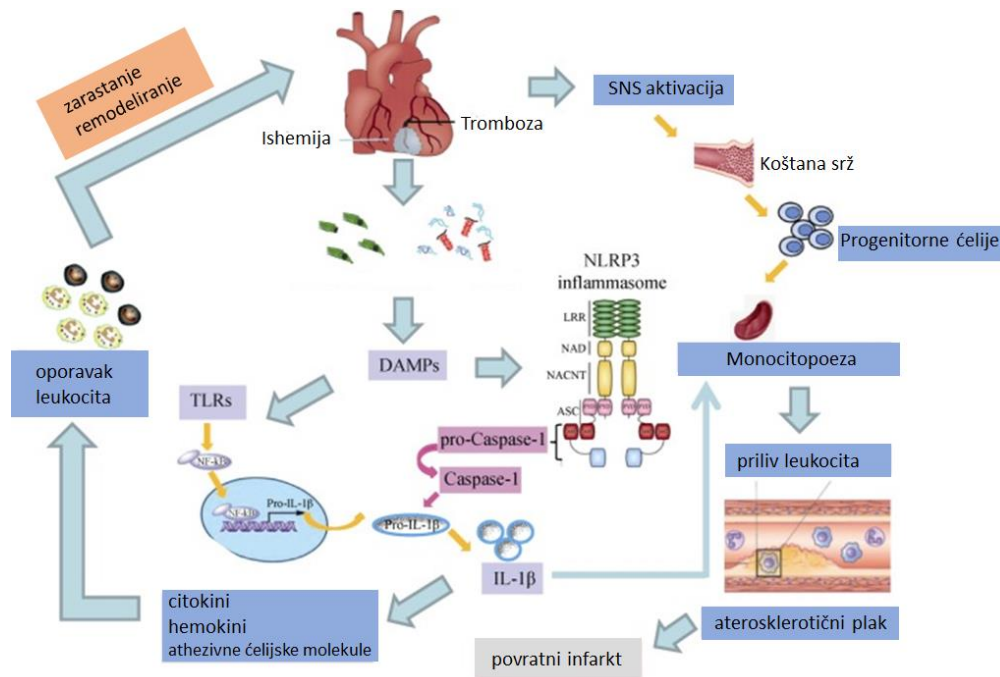
Slika 5. Efekti prekomjernog oksidativnog stresa na miokard (93)

Legenda: Kao rezultat povrede srca dolazi do teške akumulacije oksidativnog stresa (reaktivne vrste kiseonika, ROS), što ima nekoliko štetnih efekata na miokard:

1. Elektrofiziologija kardiomiocita je ozbiljno pogođena povećanim ROS. ROS obrće funkciju $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpe (NKP), što dovodi do priliva Ca^{2+} i izliva Na^+ . ROS takođe povećava priliv Ca^{2+} preko L-tipa kalcijumskih kanala.
2. Prekomjerni ROS podstiče aktivnost rijanodin receptora 2 (RiR2) i inhibira aktivnost Ca^{2+} -adenozin trifosfataze 2 (SERCA2) sarkoplazmatskog retikuluma, što dovodi do preopterećenja kalcijumom i smanjene osjetljivosti miofilamenta na kalcijum, što na kraju dovodi do kontraktilne disfunkcije.
3. Mitohondrije reaguju na ishemijsku povredu tako što proizvode povećane nivoe ROS, međutim prevelika količina ROS obrnuto dovodi do dalje disfunkcije mitohondrijalnog i energetskog metabolizma.
4. Povećanje ROS-a je takođe odgovorno za povećanu fibrozu koja je rezultat povećanja tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP) i smanjenja ekspresije matriksne metaloproteinaze (MMP).

1.3. Inflamacija kod oštećenja srca

Kao što je ilustrovano na slici 6, akutna nekroza miokarda i oštećeni matriks oslobađaju endogene alarmne signale koji se nazivaju molekularni obrasci povezani sa oštećenjem (DAMP), koji aktiviraju kaskadu komplementa i stimulišu receptore (TLR)/interleukin-1 (IL-1) signalizaciju, što rezultuje aktivacijom sistema nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) i indukcijom citokina, hemokina i molekula adhezije. Interakcije između hemokina i molekula ćelijske adhezije na endotelnim ćelijama i njihovih receptora na leukocitima dovode do regrutovanja i ekstravazacije neutrofila i mononuklearnih ćelija u miokardu (49). Inflamatorni odgovor nakon IM služi za olakšavanje zarastanja rana i formiranja ožiljaka, ali pretjerani inflamatorni odgovor uzrokuje nepovoljno remodeliranje i srčanu insuficijenciju.



Slika 6. Pokretanje inflamatornog odgovora nakon AIM (72)

Legenda: AIM pokreće intenzivan inflamatorni odgovor uključujući povećanje medijatora upale i regrutovanje inflamatornih ćelija putem DAMPs/TLR/IL-1 signalizacije. Inflamazomi takođe prepoznaju signale opasnosti i aktiviraju kaspazu-1 i oslobađaju aktivni IL-1 β . Inflamatorni odgovor služi za remodeliranje srca, ali prekomjerna upala dovodi do nepovoljnog remodeliranja LV i srčane insuficijencije. AIM je takođe povezan sa aktivacijom koštane srži preko aktivacije SNS i monocytopoeze slezine, što dovodi do povećanog priliva leukocita koji pogoršava aterosklerozu i doprinosi rekurentnom IM. Monocytopoezu slezine takođe reguliše IL-1 β . AIM: akutni infarkt miokarda; DAMP: molekularni obrasci povezani sa oštećenjem; IL-1: interleukin-1; LV: lijeva komora; TLR: tolični receptor; SNS: simpatički nervni sistem.

TLR služe kao receptori za prepoznavanje obrazaca unutar urođenog imunog sistema (50). Od 13 poznatih TLR-a sisara, TLR4 je identifikovan kao ključni receptor u posredovanju inflamatornog odgovora u infarktnom srcu. TLR4 je proksimalni signalni receptor u urođenim imunim odgovorima na lipopolisaharide gram-negativnih patogena i takođe djeluje kao senzor stresa i prepoznaje DAMP kao odgovor na neinfektivnu povredu tkiva. Miševi sa nedostatkom TLR4 su zadobili manje infarkte i ispoljili su manje upale (manje infiltracije neutrofila/monocita, smanjena proizvodnja citokina/hemokina i manje depozicije komplementa) nakon AIM (51, 52). Brisanje TLR4 je takođe dovelo do značajnog smanjenja nivoa u serumu. TNF- α , IL-1 β i IL-6 (53). Dakle, TLR4 igra važnu ulogu u posredovanju lokalnog i sistemskog inflamatornog odgovora kod AIM.

Inflamatorni odgovor izazvan oštećenjem tkiva kod AIM je takođe posredovan inflamazomima. Inflamazomi su višestruki kompleksi citoplazmatskih proteina koji služe kao molekularne platforme za aktiviranje kaspaze-1 i oslobađanje IL-1 β . Većina inflamazoma obično sadrži jedan od proteina porodice NLR, a inflamazom NLRP3 je najopsežnije proučavan u literaturi, za koji se pokazalo da prepoznaje opasnost, signalizira i indukuje sterilne inflamatorne odgovore u IM (54, 55). NLRP3 inflamazom sadrži NLRP3 koji stupa u interakciju sa adapterskim molekulom ASC, koji regrutuje i aktivira kaspazu-1. Poznato je da kaspaza-1 obrađuje pro-IL-1 β do njegovog aktivnog zrelog oblika i indukuje poptozu srčanih ćelija. IL-1 β , kao čuvar inflamacije, je rani i istaknuti posrednik za inflamatorni odgovor kod IM (56). Indukcija oslobađanja IL-1 β takođe zahtjeva drugi signal, to je indukcija transkripcije pro-IL-1 β putem TLR/NF κ B puta. Prethodne studije su pokazale da je inflamazom NLRP3 bio pretežno pojačano regulisan u srčanim fibroblastima ishemijskog miokarda na životinjskim modelima sa IM (57, 58). Inhibicija NLRP3 sačuvala je funkciju miokarda i smanjila veličinu infarkta nakon IM u životinjskim modelima, (59) što sugerira da ciljanje na NLRP3 inflamazom može biti potencijalna i efikasna terapijska strategija za liječenje IM.

Proinflamatorni citokini stimulišu hemokine i molekule adhezije i aktiviraju urođeni i adaptivni imuni sistem. Brojne studije su prijavile povišene nivoe različitih citokina/hemokina u plazmi. Među različitim inflamatornim markerima, C-reaktivni protein (CRP) je najopširnije istražen (60). CRP je snažan prediktor neželjenog ishoda kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom (AKS), (61, 62). Povišeni nivoi faktora tumorske nekroze (TNF)- α i IL-6 u plazmi su takođe prediktori mortaliteta i neželjenih ishoda kod pacijenti sa AKS (63-65). Često se otkriva da su nivoi IL-6 u korelaciji sa nivoima

CRP, pošto je IL-6 glavni stimulans za proizvodnju CRP u jetri. IL-1 β , kao čuvar inflamacije, je rani i istaknuti posrednik za inflamatorni odgovor kod IM. Povećani nivoi IL-1 β u plazmi bili su snažno povezani sa oštećenom funkcijom miokarda i hipertrofijom LV nakon reperfuznog IM (66). Naročito, ističe se ulogu faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF) u akutnom IM (67-69). MIF je važan regulator inflamatornog i imunološkog odgovora.

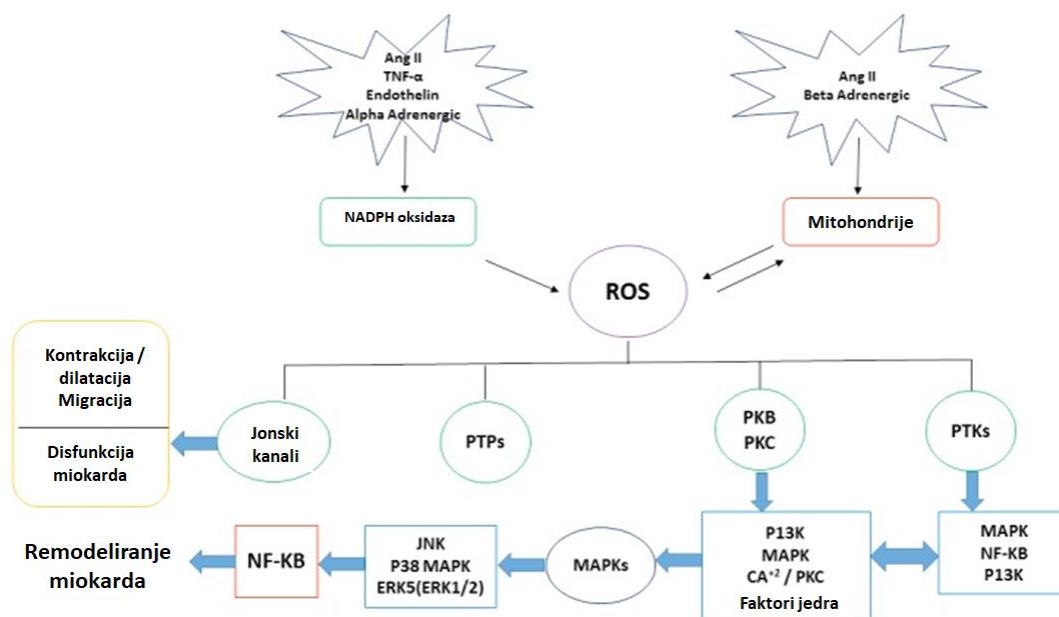
Regrutovanje inflamatornih ćelija je ključni korak inflamatornog odgovora nakon AIM, koji je posredovan interakcijama između hemokina i molekula ćelijske adhezije koji se eksprimiraju na aktiviranim endotelnim ćelijama i njihovim receptorima na inflamatornim ćelijama. CC hemokini monocitni hemoatraktantni protein-1 (MCP-1) indukuje infiltraciju mononuklearnih fagocita dok CXC hemokini kao što su IL-8 i C5a posreduju u infiltraciji infarkta neutrofilima. Fractalkine/CKS3CR1 regrutuje limfocite i monocite, a RANTES/CCR5 je hemokin koji posreduje u prometu i homingu T limfocita, monocita i NK ćelija. Prethodne studije su izvjestile da su nivoi hemokina u plazmi povećani kod AIM, (70-72) i da su imali prognostičke vrijednosti za neželjeno remodelovanje LV i rekurentni IM (73,74). Molekuli ćelijske adhezije uključujući selektine i superporodicu imunoglobulina (ICAM-1, VCAM-1, itd.) su indikatori aktivacije endotelnih ćelija, leukocita i trombocita. Selektini posreduju u hvatanju i kotrljanju leukocita na površini endotela. Interakcija između ICAM-1 i integrina posreduje čvrstu adheziju leukocita na endotelni sloj. Transmigracija aktiviranog leukocita zavisi od nekoliko molekula adhezije, uključujući ICAM-1, članove familije spojnih adhezionih molekula i vaskularno-endotelni-kadherin. Prethodne studije su izvjestile da su cirkulišući molekuli ćelijske adhezije povećani kod AIM i da su potencijalni prediktori povećanog rizika za naredne kardiovaskularne događaje (73-75).

1.4. Remodelovanje srca nakon oštećenja

Uobičajeni fenotip povezan sa srčanom insuficijencijom je razvoj srčane hipertrofije. Hipertrofija se definiše kao fiziološko povećanje veličine srca kako bi se nadoknadilo povećanje srčanog opterećenja. Srce se smatra veoma prilagodljivim organom koji, nakon povećanja potrebe za reperfuzijom miokarda ili nakon gubitka srčane reperfuzije, može da nadoknadi povećanjem stimulacije simpatičkog nervnog sistema (SNS) i aktivacijom adrenergičkih receptora kako bi se povećao minutni volumen srca. U akutnom stanju ovi

adaptivni mehanizmi mogu spasiti srce, međutim hronična stimulacija srca uz ograničenu rezervu kapaciteta će izazvati opsežne morfološke promene i pogoršati srčanu disfunkciju.

Uporna aktivacija kinaza i fosfataza kao što su protein kinaza A, C (PKA, PKC) i kalcineurin (PP2B) kao rezultat hronične stimulacije beta-adrenergičkih receptora (β -AR) dovodi do aktivacije prohipertrofičnih gena (slika 7). Aktivacija ovih gena pokreće remodeliranje srca, koje se karakteriše promjenama u kardiomiocitima, fibroblastima, vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, vaskularnim endotelnim ćelijama i inflamatornim ćelijama, pored promjena u veličini, obliku, geometriji i funkciji srca. Na primjer, smanjena PKA-zavisna fosforilacija troponina I, proteina koji vezuje srčani miozin-C i fosfolambana kod srčane insuficijencije je povezana sa povećanjem ventrikularnog remodeliranja. Kalcineurin defosforiliše transkripcioni faktor NFATc izazivajući njegovu translokaciju u jedro (76).



Slika 7. ROS i molekularni signalni putevi remodeliranja srca (76)

Legenda: Opšti dijagram predstavlja hipertrofiju srca i proces remodeliranja do ROS-aktiviranih molekularnih signalnih puteva u srčanim miocitima. Putevi uključuju nerekceptorske proteinske kinaze (PTK), proteinske fosfataze (PTP), proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPKS) i nuklearni faktor NF-KB). Skraćenice: PTKs: Non-receptor protein kinaza; PKB: Protein kinaza B; PKC: Protein kinaza C; PTPs: proteinske fosfataze; MAPKS: Mitogen-Aktivirane Protein Kinaze; NF-KB: Nuklearni faktor KB; P13K: Fosfoinozimid 3-kinaza; ERK: Ekstracelularne signalno regulisane kinaze; Ang II: Angiotenzin II; TNF- α : Faktor nekroze tumora Alfa; JNK: Jun Nuklearna Kinaza.

Iako je kompletna slika procesa remodeliranja srca još uvijek nejasna, predložen je sljedeći scenario. Kada se miociti protežu, oslobađanje angiotenzina, norepinefrina i endotelina će se povećati (76). Shodno tome, ove promjene će stimulisati ekspresiju izmijenjenih proteina i hipertrofiju miocita. Posljednji korak ovog procesa biće u vidu daljeg pogoršanja srčanih performansi i kontinuiranog povećanja neurohormonske aktivacije (77). Dodatno, povećana aktivacija citokina i aldosterona će igrati ulogu u stimulaciji sinteze kolagena, što će dovesti do fibroze i remodeliranja ekstracelularnog matriksa (78).

Nekoliko studija je otkrilo implikacije koje bi mogle nastati usljed prekomjerne stimulacije renin-angiotenzin sistema (RAS) kroz doprinos lancu događaja, koji igraju ulogu u patogenezi kardiovaskularnih bolesti (slika 7), uključujući razvoj srčanih bolesti (70). Osnovni mehanizam kardiovaskularne patologije povezan je sa djelovanjem angiotenzina II (Ang II). Aktivacija receptora Ang II tip 1 (AT1) će stimulisati vaskularno remodelovanje, što će dovesti do povećanja krvnog pritiska, kao i učešća u patologiji hronične bolesti aktivacijom srčanih fibroblasta, stimulacijom hipertrofije kardiomiocita, promocijom endotelne disfunkcije i povećanjem taloženje kolagena (79). Neke studije sugerišu povezanost između RAS sistema i srčanog oštećenja kroz ulogu Ang II kao modulatora imunoloških mehanizama kod hipertenzije (80). Ang II je uključen u svaki korak u patogenezi kardiovaskularnih bolesti, počevši od ateroskleroze do remodeliranja srca i završne srčane insuficijencije (82).

A-kinaza sidreni proteini (AKAP) su raznolika grupa proteina koji oblikuju višeproteinske komplekse i kombinuju cAMP signalizaciju sa različitim efektorskim proteinima kao što su protein kinaze (83). Mnogi AKAP su identifikovani u srcu, gdje igraju značajnu ulogu u regulisanju procesa remodeliranja srca u tri glavne oblasti. Prvi je uključivanje AKAP-a u modulaciju spajanja ekscitacije-kontrakcije kroz regulaciju homeostaze kalcijuma, uključujući izoforme AKAP15/18 (koji ciljaju PKA na L-tip Ca^{2+}) i mišićno-specifični A-kinazni protein za sidrenje (mAKAP) koji cilja na PKA u blizini RiR2. Pored toga, AKAP igraju glavnu signalnu ulogu u procesu sarkomerne regulacije i indukciji patološke hipertrofije. Uprkos ovoj ulozi AKAP-a, još uvijek nije u potpunosti shvaćeno kako se AKAP signalni kompleksi mijenjaju i menjaju tokom progresije srčane bolesti i kako to može uticati na proces remodeliranja srca (84).

MiRNA (MicroRNA) su kratke nekodirajuće RNK koje funkcionišu u regulaciji ekspresije gena nakon transkripcije (85). Oni obično pokreću utišavanje vezivanjem za

posebna ciljna mjesta (neprevedeni region) koji se nalaze unutar 3'UTR ciljane mRNK. Mnoge studije su pokazale disregulisanu ekspresiju miRNA u mnogim životinjskim modelima srčane hipertrofije izazvane jednim od sljedećih mehanizama: aktiviranjem signalizacije kalcineurina ili torakalno-aortalnim trakama (86). Analiza takve disregulirane ekspresije miRNA pokazala je da miRNA mogu imati regulatorne efekte na srčane hipertrofične puteve bilo na pozitivan ili negativan način. Na primjer, neke studije su razjasnile ulogu miR-1 u srčanoj hipertrofiji predlažući inverzni odnos između njegove ekspresije i progresije srčane hipertrofije (87). Druge studije su raspravljale o ulozi miR-133 u regulisanju srčane hipertrofije demonstrirajući njegovu ulogu u indukciji srčane hipertrofije (88,89).

Multifunkcionalna Ca^{2+} /kalmodulin zavisna protein kinaza (CaMKII) igra značajnu i centralnu ulogu u kontraktilnosti i strukturi kardiomiocita (90). CaMKII ima kratkoročni efekat koji se odnosi na održavanje sprege ekscitacije-kontrakcije u srcu (91), kao i dugoročni efekat u vezi sa transkripcijom gena u kardiomiocitima (92). Aktivnost CaMKII se značajno povećava kod IM i zatajenih srca i, shodno tome, promovise proces srčane hipertrofije i upale. S druge strane, hipertrofija srca je takođe povezana sa redoks signalizacijom koja razdvaja aktivaciju CaMKII od zavisnosti od Ca^{2+} /kalmodulina. Zbog toga bi CaMKII mogao da predstavlja čvornu tačku za integraciju inflamatorne i hipertrofične signalizacije u kardiomiocitima (93).

Dugo se smatralo da se aktivnost transkripcionog faktora NF- κ B povećava kod hipertrofije srca. Nuklearni faktor NF- κ B se smatra prototipskim proinflamatornim signalnim putem (95) koji ima fundamentalnu ulogu u imunitetu pored regulisanja ekspresije gena koji kontrolišu opstanak ćelija. Postoje dva načina za aktivaciju nuklearnog faktora NF- κ B: kanonski (klasični) i nekanonski putevi (96). Kanonska (klasična) signalizacija koristi podjedinice RelA, p50 i c-Rel. U međuvremenu, nekanonski put je posredovan RelB i p100/p52. Prethodne studije su predložile korelaciju između kanonske NF- κ B signalizacije i podložnosti i progresije srčane bolesti posmatranjem povećanog nivoa RelA u zatajenim srcima i povezanosti između polimorfizama gena NFKB1 i povećane osjetljivosti na razvoj srčane hipertrofije (97).

1.5. Apoptoza

Apoptoza je tip programirane ćelijske smrti. Za razliku od nekroze, apoptoza je aktivan proces regulisan različitim signalnim putevima, aktivacijom kaskade proteina i modulacijom genske ekspresije (98). Proces apoptoze se odvija preko 3 najznačajnija puta i bez obzira o kojem putu se radi svi se oni završavaju aktivacijom kaspaza (familije cistein-zavisnih aspartatskih proteaza) koji su efektori apoptozne pojave, tj. obavljaju degradaciju ćelije (99,100). Apoptozni putevi su:

- unutrašnji put apoptoze koji dovode do poremećaja metabolizma na nivou mitohondrija,
- spoljašni put koji se pokreće aktivacijom receptora ćelijske smrti koji se nalaze na membrani površine ćelije (ti receptori pripadaju tipu 1 transmembranskih proteina superfamilije faktora tumorske nekroze-TNF- *Tumor Necrosis Factor*) i
- alternativni mehanizam apoptoze koji se aktivira procesima stresa endoplazmatskog retikuluma koji se karakteriše poremećajem metabolizma proteina i homeostaze kalcijuma u lumenu endoplazmatskog retikuluma (ER), (101,102).

Analizirajući humane žučne kiseline, hidrofilitnost slobodnih i konjugovanih žučnih kiselina (žučnih soli) se smanjuje u sledećem redoslijedu: UDCA (ursodeoksiholna kiselina) > CA (holna kiselina) > CDCA (henodeoksiholna kiselina) > DCA (deoksiholna kiselina) > LCA (litolna kiselina); taurinske soli žučnih kiselina > glicinske soli žučnih kiselina > slobodne žučne kiseline (103). Zadržavanje i povećanje hidrofobnih žučnih kiselina u tokuolestaze dovodi do oštećenja ćelijske membrane i generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), sledstveno tome i do oštećenja funkcije hepatocita i smrti ćelije. Niže koncentracija hidrofobnih žučnih kiselina može da indukuje apoptozu, dok veća količina indukuje nekrozu ćelije. Takođe, istraživanja su pokazala da akumulacija hidrofobnih žučnih kiselina u sistemske cirkulaciji može da ispolji neželjene efekte na nivou drugih ekstrahepatičkih tkiva, uključujući kardiomiocite (104,105). Toksična dejstva žučnih kiselina su u korelaciji sa njihovom hidrofobnošću (npr. henodeoksiholna kiselina-CDCA), nasuprot tome hidrofилne žučne kiseline, npr. urodeoksiholna kiselina (UDCA) inhibicijom apoptoze pokazuje svoj protektivni mehanizam (106). Svoj antiapoptotski mehanizam hidrofилna UDCA i njeni konjugati tj. soli, tauro i gliko-UDCA pokazuje višestruko. U literaturi, antiapoptozni mehanizmi su već navedena inhibicija stvaranja ROS potom

modulacija mitohondrijalnog puta apoptoze u smislu morfološke i funkcionalne stabilizacije ove organele, prevencija apoptoze spoljašnim putem preko receptora ćelijske smrti i regulacija apoptoze indukovanu stresom endoplazmatskog retikuluma (ER), (107-109).

1.6. Citotoksičnost i citoprotektivnost žučnih kiselina

Žučne kiseline (ŽK) su glavne organske supstance u žuči i uključene su u nekoliko važnih funkcija u jetri i crijevima. Glavne žučne kiseline u ljudskom organizmu možemo podijeliti na:

- primarne žučne kiseline: holna kiselina (CA) i henodeksikolna kiselina (CDCA); njihovi konjugati glicina (GCA i GCDCA) i taurina (TCA i TCDCA); i
- sekundarne žučne kiseline: deoksiholna kiselina (DCA) i litholna kiselina (LCA), te njihovi konjugati glicina (GDCA i GLCA) i taurina (TDCA i TLCA).

Submilimolarne koncentracije citotoksičnih žučnih kiselina indukuju ćelijsku smrt putem apoptoze. S druge strane, pokazalo se da nekoliko citoprotektivnih ŽK sprečava apoptozu u istom obimu koncentracija. S tim u vezi, žučne kiseline s visokim indeksom hidrofilnosti (ursodeoksiholna kiselina UDCA i CA) manje su toksične za ćelije, dok su hidrofobne žučne kiseline (henodeoksiholna - CDCA, DCA i LCA) obično citotoksične u koncentracijama $> 200 \mu\text{M}$.

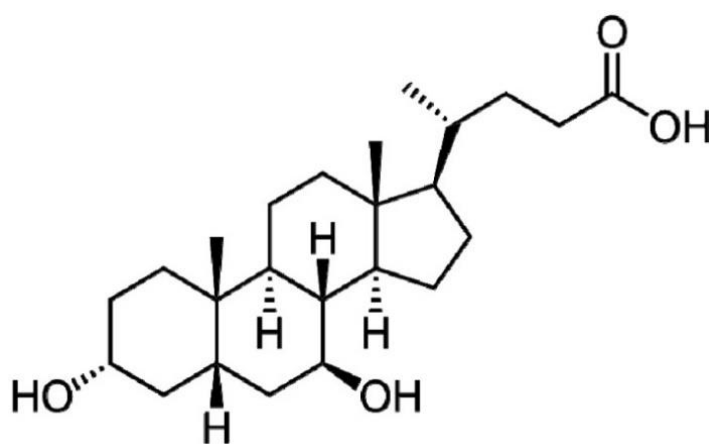
Citotoksičnost hidrofobnih žučnih kiselina se ispoljava direktnim oštećenjem ćelijske membrane, interakcijom sa membranskim receptorima medijatorima ćelijske smrti (TNF receptori) te posljedičnom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i oštećenja ili smrti ćelije. ROS uzrokuje oksidativnu oksidaciju membranskih fosfolipida mijenjajući permeabilnost iste te dovodi do alteracije aktivnosti G- protein spregnutih receptora (TGR5) i signalnih molekula vezanih za membranu. Takođe ROS djeluje na mitohondrijalnu DNK (mtDNK) koja je veoma vulnerabilna na dejstvo reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS), tako da dolazi do smanjenja produkcije mitohondrijalnih proteina i komponenti elektron transportnog sistema (ETS) odnosno umanjuje se bioenergetski kapacitet organele.

Žučne kiseline imaju sposobnost aktivacije protektivnih signala za preživljavanje ćelije i inhibicije citotoksičnosti. Navedeni protektivni mehanizmi uključuju nuklearni faktor- κB (NF- κB - dovodeći do njegove inhibicije), i dovodeći do stimulacije

fosfatidilinozitol 3kinaze (PI3K) i mitogenima-aktivisanu protein kinazu (MAPK) (64). Stimulusi za preživljavanje pokreću intracelularne signale aktivacijom transmembranskih receptora. Žučne kiseline balansiraju između stimulacije receptora ćelijske smrti i citoprotektivnih staničnih puteva, pri čemu balans ili prevaga na jednu stranu zavisi od same vrste žučne kiseline.

Ursodeoksiholna kiselina (UDCA) je fiziološka hidrofilna dihidroksi žučna kiselina, koja je prvi put okarakterisana u žuči kineskog crnog medvjeda (110), a prisutna je kod čovjeka u koncentraciji od oko 3% od ukupnih žučnih kiselina(111).

UDCA je $3\alpha,7\beta$ -dihidroksi- 5β -holan-24-ova kiselina (slika 8), koja je sekundarna žučna kiselina koja ima hidrofilna svojstva. Formira se 7β -epimerizacijom primarne žučne kiseline henodeoksiholne kiseline u crijevima od strane crijevnih bakterija. Žučne kiseline su steroidne kiseline koje emulguju crijevne lipide. Žučne kiseline se dobijaju oksidacijom holesterolu posredovanom citokromom P450. Žučne kiseline su deterdženti, surfaktanti, ometaju unos slobodnih masnih kiselina dugih lanaca u jetri posredovano proteinima i potencijalno su hepatotoksične (110-113).



Slika 8. Struktura ursodeoksiholne kiseline (UDCA), (Autor)

Oko 90% terapijske doze UDCA se apsorbira u tankom crevu nakon oralne primene. Nakon apsorpcije, UDCA ulazi u portalnu venu i podvrgava se efikasnoj ekstrakciji iz krvi portala od strane zdrave jetre gde se konjuguje sa glicinom ili taurinom. UDCA u žuči se koncentriše u žučnoj kesi i izbacuje u duodenum. Samo male količine UDCA se pojavljuju u sistemskej cirkulaciji, u plazmi se UDCA vezuje za proteine i veoma male količine se izlučuju u urinu (114).

Osim konjugacije, UDCA se ne mijenja ili kataboliše značajno u jetri ili crijevnoj sluzokoži. UDCA se tipično oksiduje i redukuje na 7-ugljeniku, dajući ili 7-keto-litoholnu kiselinu/ili litoholnu kiselinu. Litoholna kiselina indukuje lomljenje lanca DNK, jedinstveno je ko-mutagena, promoviše transformaciju ćelija, dovodi do segmentnog oštećenja, otkazivanja ćelija i smrti(115-118).Poluživot UDCA je značajno dug, procijenjen na 3,5 do 5,8 dana.

Apoptoza je kao što smo ranije naveli suštinski ključni proces za uklanjanje oštećenih ćelija, održavanje homeostaze broja ćelija i proces kojim nestaju miofibroblasti jetre (119-121).Jednom kada su ćelije oštećene izvan mogućnosti puteva popravke DNK (122,123), osuđene su na nepovratno mirovanje (starenje), (124-126), smrt (apoptoza) ili prolaze kroz neregulisanu ćelijsku diobu (formiranje tumora).

UDCA je anti-apoptotik (124,125). UDCA anti-apoptoza nije ograničena na hepatocite, jer je hidrofilna sa većom sistemskom diseminacijom. UDCA anti-apoptoza je posredovana utišavanjem p53, inhibicijom ciklina D1 (126) i mehanizmom nezavisnom od kaspaze (127). UDCA takođe indirektno blokira apoptozu oštećenih ćelija, blokiranjem apoptoze izazvane citotoksičnom žučnom kiselinom - deoksiholnom kiselinom. UDCA potiskuje aktivnost vezivanja DNK proteina aktivatora-1 i dovodi do regulacije aktivnosti kinaze regulisane ekstracelularnim signalom (ERK) i aktivnosti Raf-1 kinaze stimulisane izlaganjem deoksiholnoj kiselini (DCA). Takođe je utvrđeno da DCA aktivira aktivnost receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR), a UDCA to inhibira. UDCA anti-apoptoza je djelimično posredovana molekularnom modulacijom EGFR/Raf-1/ERK signalizacije (128). Štaviše, UDCA inhibira apoptozu izazvanu DCA u ćelijama pacova i nehepatičnim ćelijama in vitro modulacijom perturbacije mitohondrijalne membrane, smanjujući masu Bak proteina u mitohondrijama, kao i inhibirajući reaktivne vrste kiseonika (129).

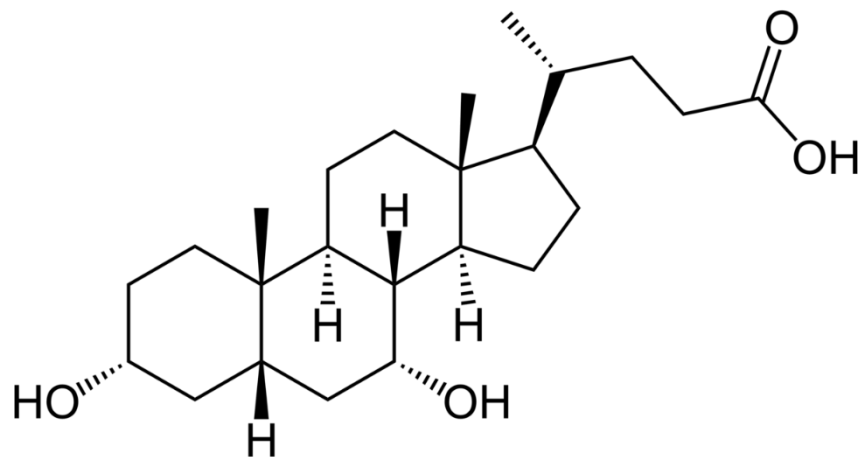
UDCA modifikuje acetilaciju histona i indukuje diferencijaciju i starenje (130, 131). Anti-apoptotičko svojstvo UDCA je efikasno čak i nakon eksternalizacije fosfatidilserina (132). U prisustvu UDCA, ćelije jetre ne stvaraju citoprotektivnu kaskadu kada su suočene sa citotoksičnošću žučnih kiselina (133,134). UDCA ometa regulaciju hepato-protektivnog citokeratina CK8 (135). Anti-apoptotička osobina UDCA je efikasna u jetrenim i ne-jetrenim ćelijama i sprečava promjene povezane sa apoptozom u mitohondrijskom transmembranskom potencijalu i proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika u kultivisanim ćelijama do 0,5% etanola koji djeluje kroz različite apoptotske puteve (136).Anti-

apoptotičko svojstvo UDCA nemilosrdno inhibira prirodnu kaskadu događaja koji obezbjeđuju pravovremenu i efikasnu regeneraciju oštećenih ćelija. Štaviše, UDCA blokira popravku DNK posredovanu poli (ADP-ribozom) polimerazom.

UDCA (slika 8) i njen derivat konjugovan sa taurinom, tauroursodeoksiholna kiselina (TUDCA) su hidrofilne ŽK koje su postale veoma popularni zbog svoje niske toksičnosti i efikasnosti u liječenju nekoliko holestatskih bolesti jetre, kao što su holelitijaza, primarna bilijarna ciroza, primarni sklerozirajući holangitis, cistična fibroza i intrahepatičnaolestaza trudnoće, a ove ŽK mogu biti korisne i za zaštitu drugih organa osim jetre (137). UDCA je pokazala da igra važnu ulogu u prevenciji oksidativnog stresa izazvanog sa nekoliko agenasa, bilo kroz direktan antioksidativni efekat ili povećanje antioksidativne odbrane (138). U tom smislu, povećanje γ -glutamilstein sintetaze na nivou transkripcije je pronađeno u izolovanim hepatocitima pacova tretiranih UDCA, što omogućava ovim ćelijama da budu otpornije na oksidativne povrede izazvane kadmijumom ili vodonik-peroksidom. Tretman UDCA kod hroničnih pacova vezanih za žučne kanale takođe dovodi do pojačane regulacije γ -glutamilstein sintetaze i sprečava značajno povećanje proizvodnje mitohondrijalnog peroksida i hidroksinonenal-proteinskih adukata uočeno tokom hroničneolestaze (139). Utvrđeno je da UDCA povećava aktivnost metionin S-adenoziltransferaze, drugog enzima uključenog u biosintezu glutaciona (GSH) u jetri pacova (140).

Hidrofobne ŽK stimulišu Kupferove ćelije, povećavajući njihov kapacitet da generišu ROS, koje zauzvrat napadaju nukleinske kiseline, tiol proteine ili membranske lipide, izazivajući peroksidaciju lipida. UDCA može da blokira hidrofobne-ŽK-indukovane ćelijske fenomene, stoga bi takođe mogla da antagonizuje aktivaciju makrofaga hidrofobnim ŽK da bi smanjila njihov kapacitet da generišu ROS (141).

Studije su pokazale da ŽK mogu regulisati vaskularnu tenziju. Uočeno je da povećane ŽK u portalnoj veni jetre pacova smanjuju vazokonstrikciju izazvanu norepinefrinom. Ovi nalazi pokazuju da su ŽK vazodilatatori. Prema dosadašnjim istraživanjima, primarni pokretač kardiovaskularnih bolesti je endotelna disfunkcija, što dovodi do disbalansa u sintezi i oslobađanju štetnih i zaštitnih medijatora (142). Utvrđeno je da aktivacija henodeoksiholne kiseline (CDCA) dovodi do smanjene ekspresije IL-1 mRNA na način koji zavisi od koncentracije. Kao što je poznato, IL-1 je najefikasniji vazokonstriktor, a njegova ekspresija inhibirana ŽK može biti suštinski faktor u sistemskoj vazodilataciji (143).



Slika 9. Struktura henodeoksiholne kiseline (CDCA), (Autor)

Povećanje ŽK može izazvati vazodilataciju, i spekulisali su da se to može desiti inhibiranjem prolaska kalcijuma kroz membranske kanale. Ovaj efekat nema veze sa blokatorima ili uklanjanjem endotela. Međutim, na njega snažno utiče tip ŽK, a vjerovatnije je da će hidrofobna i lipofilna ŽK izazvati vazodilataciju. U literaturi se spekulise o mehanizmu kojim ŽK postiže ovaj efekat i zaključuje da moraju direktno da stupaju u interakciju sa komponentama ćelijske membrane, naglašavajući ulogu komponenti ŽK, a ne samo koncept da je povećanje koncentracije od suštinskog značaja za kardiovaskularnu funkciju.

Zahvaljujući amfifilnoj strukturi žučne kiseline imaju tendenciju agregacije u micelle (144). Hepatociti sadrže cjelokupan set od 17 enzima neophodnih za modifikaciju holesterolskog steroidnog jezgra (145). Glavni biosintetski put sinteze žučnih kiselina (poznat kao neutralan ili klasičan) inicira 7α -hidroksilaza citokrom P-450 (CYP7A1)- ovim putem se produkuje 90% ukupne količine žučnih kiselina (146). Alternativni ili kiseli put inicira sterol 27-hidroksilaza (CYP27A1)- sintetise se manje od 10% ukupne količine žučnih kiselina. Kod ljudi klasični put proizvodi CA i CDCA u približno jednakim količinama, dok kiseli put uglavnom proizvodi CDCA. Postoji i treći put biosinteze žučnih kiselina poznat još kao Yamasaki 25-hidroksilacioni put biosinteze žučnih kiselina, sa malim procentom sinteze žučnih kiselina u odnosu na ukupnu produkciju istih (147,148).

U tankom crijevu žučne kiseline su podvrgnute deamidaciji i 7α -dehidroksilaciji crijevnom mikrobiotom, dajući sekundarne žučne kiseline koji se zatim apsorbuju u distalnom ileumu dovršavajući ciklus „enterohepatične cirkulacije“. U svakom ciklusu dio žučnih kiselina dostiže sistemsku cirkulaciju i djelomično se izlučuje putem bubrega (146).

Hidrofilna / hidrofobna svojstva žučnih kiselina čine veliki dio njihove uloge u apsorpciji hranjivih materija. Indeks hidrofilnosti zavisi od broja i položaja OH grupa i o tome je li amidacija bočnog lanca glicinom ili taurinom. Žučne kiseline konjugovane s taurinom više su hidrofilne od onih konjugirane s glicinom, a trihidroksilirane žučne kiseline više su hidrofilne od dihidroksiliranih. Žučne kiseline s visokim indeksom hidrofilnosti (UDCA i CA) manje su toksične za stanice, dok su hidrofobne žučne kiseline (CDCA, DCA i LCA) obično citotoksične u koncentracijama $> 200 \mu\text{M}$. Koncentracije žučnih kiselina u plazmi obično su $< 10 \mu\text{mol/L}$ (146). Žučne kiseline se sve više prepoznaju kao regulatorni signali tj. djeluju kao signalni molekuli koji svoju funkciju vrše i van enterohepatičnih tkiva aktivirajući mrežu membranskih i nuklearnih receptora (146-150).

Najbolje okarakterisani od ovih receptora su membranski receptori povezani sa G-proteinima i to receptori aktivirani žučnim kiselinama, GPBAR1 (poznat i kao TGR5 receptor- membranski G protein spregnuti receptor žučnih kiselina), muskarinski receptori te nuklearni receptori od kojih je najznačajniji receptor za farnesoid-X (FXR). Ovi receptori pored hepatocita i enterocita takođe su otkriveni u srcu i vaskularnom sistemu i njihova aktivacija posreduje u vazodilatatornim učincima žučnih kiselina u sistemskoj cirkulaciji (151).

FXR je detektovan 1995. godine kao protein aktiviran pomoću farnezola, ali važno otkriće je postignuto 1999. godine kada su žučne kiseline, označene kao najpotentniji endogeni ligandi ovog receptora u dijelu fizioloških koncentracija. CDCA je najpotentniji endogeni agonista dok su za hidrofilnu UDCA studije pokazale da ili ne ispoljava efekte prema FXR ili je slab modulator funkcije ovog nuklearnog receptora (152). Žučne soli (konjugati) čine 98% svih žučnih speciesa u bilijarnom sistemu, i one mogu aktivirati FXR u svim tipovima ćelija koje imaju transmembranske transportne proteine dok nekonjugovane žučne kiseline slobodno difunduju kroz ćelijsku membranu i mogu aktivirati receptor u svim tipovima ćelija (153).

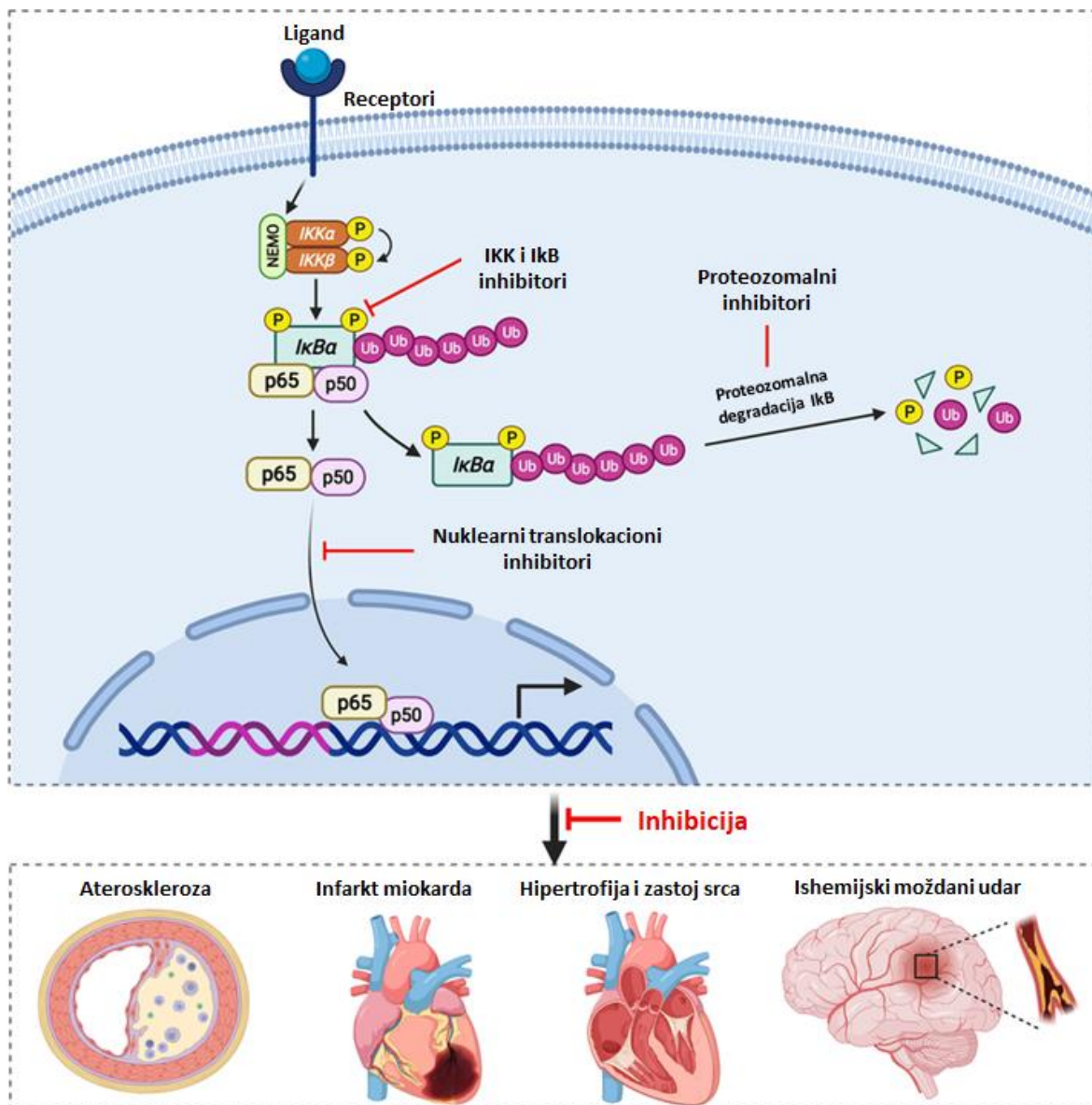
Primarna hidrofobna žučna kiselina CDCA aktivira FXR. FXR može povećati proizvodnju NO (azotnog oksida) vršeći genomske i negenomske učinke na eNOS (endotelna azot oksidna sintetaza). FXR je takođe u stanju indukovati transkripciju CSE (cystationin- γ -lijaze)- enzima koji sudjeluje u stvaranju sumporovodika (H_2S), aktivirajući određeni reaktivni element u promotoru CSE-a. CDCA također direktno aktivira Ca^{2+} -aktiviranim K kanale- BK Ca (Ca^{2+} -activated K^+ channels BKCa) na VSMC-ima tj.

vaskularnim ćelijama glatkih mišića (vascular smooth muscle cells (VSMC)). Konačno, međudjelovanjem H₂S i NO nizvodno aktivacije receptora takođe bi moglo dovesti do recipročne regulacije proizvodnje dva gasovita posrednika. GPBAR1 i njegova aktivacija uzrokuje eNOS i CSE aktiviranje što je rezultiralo generiranje NO i H₂S (vazodilatacijskih gasovitih molekula), (151). Dakle, regulatorna aktivnost koju žučne kiseline vrše na eNOS barem dijelom ovisi o FXR (154). Pored ovog genomskog učinka, postoje dokazi da aktivacija FXR-a može uzrokovati eNOS fosforilaciju. Doista, osim na transkripcijskom nivou, aktivnost eNOS-a može se regulirati i na posttranskripcijskom nivou putem fosforilacije, S- nitrozilacije i interakcije eNOS-a s drugim proteinima poput kaveolina (155).

Nuklearni FXR ima centralnu ulogu i u održavanju homeostaze žučnih kiselina regulacijom svakog aspekta njihovog metabolizma uključujući sintezu, transport, enterohepatičku recirkulaciju i detoksikaciju (156,157). Hidrofobnost žučnih kiselina determiniše citotoksična (npr. hidrofobna henodeoksiholna kiselina- CDCA) ali i citoprotektivna (npr. hidrofilna ursodeoksiholna kiselina- UDCA) svojstva žučnih kiselina. Prema stepenu hidrofobnosti žučne kiseline se mogu rangirati u sledećem rastućem nizu: UDCA < CA < CDCA < DCA < LCA.

1.7.Uloga NFκB kod infarkta miokarda

Nuklearni faktor-κB (NF-κB) je glavni faktor transkripcije povezan sa kardiovaskularnim zdravljem i bolestima. Učestvuje u oslobađanju proinflamatornih faktora i apoptozi kardiomiocita. Nedavne studije su pokazale da inhibicija NF-κB igra zaštitnu ulogu u akutnoj hipoksiji i reperfuzionoj povredi (158). Različite studije su dokumentovale snažnu ulogu porodice transkripcionih faktora nuklearnog faktora-κB (NF-κB) u regulaciji preživljavanja srčanih miocita kroz potiskivanje apoptotske ćelijske smrti izazvane hipoksijom ili ishemijskom povredom miokarda (159-161). Na primjer, transgeni eksperimentalni miševi koji u srčanom tkivu imaju specifičnu ekspresiju NF-κB inhibitora (IκBα) pokazuju 50% veću veličinu infarkta sa značajno višim nivoima postinfarktne apoptoze (161). Ove studije snažno sugerišu zaštitnu ulogu za NF-κB tokom patološkog remodeliranja srca nakon akutne povrede srca.



Slika 10. NF- κ B signalizacija igra patogenu ulogu u različitim KVB, uključujući ateroskleroza, infarkt miokarda, reperfuzionu povredu, srčanu insuficijenciju, hipertrofiju i ishemijski moždani udar; NF- κ B inhibitori utiču na različite terapeutske mete u NF- κ B-zavisnoj signalizaciji. Na primjer, Vinpocetin potiskuje razvoj aterosklerota kod apoE^{-/-} miševa blokiranjem IKK α/β , I κ B α fosforilacije i posljedično aktivnosti NF- κ B (147)

Međutim, tačna uloga porodice NF- κ B u srcu ostaje izvor kontroverzi, gdje je uloga NF- κ B opisana i kao adaptivna i neprilagođena u određenim ćelijskim kontekstima. S tim u vezi, nakon ishemije i reperfuzije u srcu, opisana su najmanje dva talasa aktivnosti NF- κ B tokom prvih 6 sati reperfuzije, a različiti ksperimentalni dokazi sugerišu da se aktivnost NF- κ B može održati nedjeljama nakon koronarne ligacije (162,163).U ovom kontekstu,

hronična aktivacija NF- κ B može izazvati ekspresiju inflamatornih citokina i proizvesti štetne posljedice, uključujući smrt srčanih ćelija.

NF- κ B je prvobitno identifikovan kao nuklearni faktor koji vezuje promotor lakog lanca imunoglobulina κ B u B limfocitima. Od ovog početnog otkrića, NF- κ B i srodni signalni putevi su intenzivno proučavani u više tipova ćelija, posebno u kontekstu urođenog ćelijskog imuniteta i onkogeneze. Super familija transkripcionih faktora NF- κ B sisara sastoji se od najmanje 5 gena koji kodiraju članove RelA (p65), RelB, c-Rel, p50, i p52.24. Svi članovi porodice su očuvani tokom evolucije i dijele očuvani Rel homološki domen (RHD) na svom N kraju, koji posreduje u vezivanju DNK i dimerizaciji između članova porodice (164).

1.7.1. Kardioprotektivna uloga NF- κ B u srčanom tkivu

Kardioprotektivna uloga NF- κ B signalizacije je očigledna već nekoliko godina. S tim u vezi, Bcl-2 potiskuje ćelijsku smrt ventrikularnih miocita putem mehanizma koji uključuje IKK β posredovanu aktivaciju NF- κ B (165,166). U kultivisanim srčanim miocitima, prisilna ekspresija nefosforilabilnog I κ B α dizajniranog da inaktivira NF- κ B signalizaciju je rezultirala je povećanom osjetljivošću na apoptozu indukovanu TNF α . Specifična ekspresija sličnog mutanta I κ B α za srce povećala je osjetljivost miocita na apoptozu nakon akutne koronarne okluzije *in vivo*, dok je p50 $^{-/-}$ kardijalna funkcija kod eksperimentalnih miševa pojačana (167). Ovaj nalaz je podržan procjenom prirodnog polimorfizma kod ljudi u p50 genu koji je povezan sa povećanim funkcionalnim pogoršanjem kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom (168). Ovi nalazi su dodatno podržani delecijom NEMO gena specifičnih za srce, u kojoj eksperimentalni miševi razvijaju kardiomiopatiju povezanu sa starenjem praćenu povećanim oksidativnim stresom i apoptozom (169). Intrinzična smrt ćelija izazvana hipoksijom i defekti mitohondrija se mogu potpuno prevazići prisilnom ekspresijom IKK β u kultivisanim srčanim miocitima (170). Otkriveno je da IKK β promovise opstanak ćelija u hipoksičnim uslovima potiskivanjem ekspresije proapoptotičkog člana porodice Bcl-2, Bnip3, kroz fizičku interakciju sa HDAC1 (171).

Detaljna analiza ovog molekularnog „prekidača“ koji reguliše smrt ćelije i preživljavanje ćelija otkrio je da hipoksični uslovi indukuju ekspresiju faktora transkripcije ćelijskog ciklusa E2F-1, koji se oslobađa represijom retinoblastoma (Rb). Aktivni E2F-1 se

vezuje za cis element unutar bnip3 proksimalnog promotorskog regiona da bi indukovao ekspresiju Bnip3 i promovisao ćelijsku smrt. Ovi rezultati su potvrđeni u kontekstu intaktnog hromatina u primarnim srčanim miocitima korišćenjem imunoprecipitacije hromatinom, gdje je hipoksija indukovana E2F-1 vezivanje za bnip3 promotor, dok je prisilna ekspresija Rb eliminisala vezivanje E2F-1 i smanjila ekspresiju Bnip3 (172).

U serijama eksperimenata, prisilna ekspresija IKK β zaštitila je srčane miocite od smrti izazvane E2F-1 izmještanjem E2F-1 iz regiona promotora bnip3. Štaviše, koristeći testove imunoprecipitacije hromatina, identifikovano je da p65 zauzima κ B mjesto unutar bnip3 promotora pod bazalnim normoksičnim uslovima i ekspresija Bnip3 je potisnuta; međutim, kada su srčani miociti pod stresom sa hipoksijom, p65 je zamijenjen E2F-1 što dovodi do povećane ekspresije Bnip3 i intrinzične apoptotske smrti. Ne samo da ovi eksperimenti potvrđuju kardioprotektivnu ulogu p65 tokom akutne hipoksije, već takođe sugerišu da kod najmanje dva različita skupa p65 postoje unutar srčanih miocita. Jedan bazen unutar citosola vezan za I κ B α , koji prolazi kroz bazalnu nuklearnu/citosolnu vezu, ali je osjetljiv na stimulaciju preko IKK β . Drugi bazen, koji je vjerovatno manje bogat, lako se kreće između citoplazme i jezgra da bi regulisao ekspresiju gena. Iako nije dokazano, bazalno nuklearno prisustvo p65 može biti važno za regulisanje gena koji promovišu smrt, kao što je Bnip3 (173).

1.7.2. Kardiotoksična uloga NF κ B u srčanom tkivu

Kontroverze oko proapoptičke prirode i štetnih karakteristika NF- κ B signalizacije u srcu jednake su samo kontroverznoj ulozi TNF α signalizacije u srcu. Na primjer, rane studije koje su istraživale ulogu TNF α u srčanoj insuficijenciji zaključile su da je TNF α bio uključen u neprilagođeni odgovor koji dovodi do srčane insuficijencije (174), ali studije ciljanja gena koje koriste nulte mutacije u TNFR1 i/ili -2 genima su zaključile da TNF α štiti srca od ishemije i apoptoze izazvane reperfuzijom (175). Štaviše, p50 $^{-/-}$ eksperimentalni miševi pokazuju zaštitu od kardiomiopatije izazvane TNF α i poboljšanu srčanu funkciju nakon infarkta miokarda (175). Međutim, ovaj kasniji rezultat je osporila druga istraživačka grupa (167). Važno je, i kao što je gore navedeno, pokazalo se da signalizacija TNF α receptora u više ćelijskih sistema istovremeno aktivira i proapoptičke kaskade JNK, p38 i kaspaze 8, zajedno sa kanonskom NF- κ B signalizacijom, i da TNFR1 i -2 mogu imati

suprotne efekte o remodelovanju srca (176). Stoga se čini vjerovatnim da će ćelijski odgovor zavisiti od dodatnih kriterijuma, kao što su vrijeme i trajanje signalizacije, kao i drugi znakovi iz okruženja uključujući hipoksiju i druge inflamatorne signale. Na primjer, genetska ablacija TNF α kod miševa smanjila je veličinu infarkta nakon ishemije/reperfuzije i smanjila ekspresiju proinflamatornih hemokina, kao što su IL-6 i monocitni hemoatraktantni protein-1 (MCP-1). Interesantno, NF-vezani za DNK κ B je takođe smanjen nakon ishemije/reperfuzije kod TNF α -null miševa, a autori sugerišu da bi smanjena aktivacija NF- κ B mogla biti mehanizam za poboljšani ishod i smanjen inflamatorni odgovor u ovom modelu.

Hipoteza da bi aktivacija NF- κ B mogla proizvesti hronični inflamatorni odgovor makrofaga i inflamatornih ćelija sa štetnim posljedicama nije nova i podržana je činjenicom da su brojni ciljni geni NF- κ B proinflamatorni, kao što su IL-194 i IL-6, 95 dok se pokazalo da drugi indukuju intrinzičnu apoptozu u mnogim tipovima ćelija, kao što su TNF α , 96 i p53 (177). Zaista, poznato je da aktivacija NF- κ B nizvodno od TNF α izaziva apoptozu.

1.8. TNF- α i njegova uloga kao posrednika u infarktu miokarda

Tokom infarkta miokarda (IM), uključeno je više faktora na nivou ćelije. Među njima, inflamatorni imuni odgovor se javlja u infarktnom miokardu i susjednim tkivima. Ovaj imuni odgovor se manifestuje kao akutna nekroza, hipertrofija, apoptoza kardiomiocita i naknadno ventrikularno remodeliranje. Proces remodeliranja ponekad može dovesti do kongestivne srčane insuficijencije. Istraživači su pokazali da faktor nekroze tumora- α (TNF- α), kao ključni regulacioni faktor u inflamatornoj reakciji, ne samo da je djelovao u kombinaciji sa svojim ligandom kao posrednik u inflamatornom imunološkom odgovoru, već je radio i nezavisno u podešavanju remodeliranja miokarda.

TNF- α ima dva oblika u organizmu: TNF- α povezan sa membranom (mTNF- α) i izlučeni TNF- α (sTNF- α) sa molekulskom težinom od 26 i 17 kD. sTNF- α se generalno smatra aktivnim oblikom mTNF- α ; ovu aktivaciju iz mTNF- α u sTNF- α omogućava enzim koji pretvara TNF (TACE). TNF- α je sveprisutni citokin. Mnoge ćelije imaju sposobnost da ga proizvode i oslobađaju, uključujući monocite-makrofage, limfocite, ćelije glatkih mišića, fibroblaste, endotelne ćelije, epitelne ćelije i osteoblaste. TNF- α mRNA se takođe eksprimira u plućima, jetri, slezini, timusu i bubrezima u fiziološkim uslovima. Inflamatorni faktori kao

što su invazija bakterija i virusa mogu brzo da indukuju srce, pankreas i druge organe da sintetišu i eksprimiraju TNF- α (178). Mnoga istraživanja srca su pokazala da različite povrede i upalna stanja, kao što su IM, ishemija miokarda, reperfuzija, operacija srčane bajpasa i hronična srčana insuficijencija (HF), mogu podstaći proizvodnju TNF- α od strane kardiomiocita (179-181). Biološka aktivnost TNF- α se ostvaruje kombinacijom TNF- α i njegovog receptora, TNF- α receptora (TNFR), koji se eksprimira u ćelijskim membranama. TNFR je podijeljen na dva tipa, odnosno TNFR1 i TNFR2, sa molekulskom težinom od 55 i 75 kD. TNFR1 se eksprimuje na većem dijelu površine ćelijske membrane, dok je TNFR2 uglavnom eksprimiran na površini endotelnih ćelija i hematopoetskih ćelija.

TNF- α , koji stupa u interakciju sa TNFR poslije IM, ima široku biološku aktivnost. Kada se TNF- α kombinuje sa TNFR1, povećava se lučenje proteina povezanih sa apoptozom (npr. FADD i TRADD) i inflamatornih faktora, što promovise napredak ventrikularnog remodeliranja (182). TNF- α u kombinaciji sa TNFR1 indukuje lučenje proteina povezanih sa apoptozom sa zavisnošću od RIP1 (receptor interacting protein 1), što bi moglo biti blokirano aktivacijom TAK1 (TGF β -aktivirana kinaza-1). Takođe, TNF- α u kombinaciji sa TNFR1 može aktivirati NF- κ B put, intenzivirati endotelne ćelije da eksprimiraju VCAM-1 i ICAM-1 i povećati infiltraciju neutrofila u područje infarkta, pa čak i uzrokovati odloženo stvaranje toksičnih supstanci kao što su superoksid i perforin i ozbiljno utiču na kontrakciju miokarda i oporavak od IM (183).

Dok se NF- κ B aktivira kombinacijom TNF- α i TNFR2, ekspresija inflamatornih citokina IL-6 i IL-1 β je smanjena da bi se smanjila povreda koja je rezultat inflamatorne reakcije. Pored toga, povećana je ekspresija angiogenih faktora rasta VEGF i bFGF da bi se ubrzala neovaskularizacija, čime se poboljšava prognoza IM. Štaviše, smanjeni TNFR2 može izazvati povećanje TNFR1 (181). Kombinacija TNF- α i TNFR1/2 može izazvati oštećenje DNK u različitim ćelijama uključujući T limfocite, ali inhibitori NF- κ B i IL-10 mogu značajno smanjiti oštećenje DNK. Stoga se spekulisalo da mehanizam oštećenja DNK može biti neravnoteža redoks reakcije usled reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) proizvedenih interakcijom TNF- α i TNFR. Međutim, da li se ovaj mehanizam zaista javlja u kardiomiocitima tokom IM tek treba da se razjasni.

Kombinacija adiponektina, eksprimiranog u adipocitima, i njegovog liganda AdipoR1, koji se nalazi na površini kardiomiocita, može povećati unos glukoze, pojačati metabolizam lipida, povećati osjetljivost kardiomiocita na insulin i anti-aterosklerozu;

oslabiti inflamatornu reakciju i apoptozu kardiomiocita i smanjiti oksidativni stres; i održavaju i poboljšavaju rad srca. Međutim, nakon IM, povećani TNF- α u kombinaciji sa TNFR1 povećava sekreciju ATF3 (aktivirajući faktor transkripcije 3), inhibitora ekspresije adiponektina koji smanjuje lučenje adiponektina, dok TNF- α u kombinaciji sa TNFR2 smanjuje ekspresiju ATF3 kako bi se povećala lučenje adiponektina. Dakle, ukupan uticaj ATF3 na adiponektin zavisi od ravnoteže između kombinacije TNF- α sa TNFR1 i TNFR2 (184,185).

Primjetno je da TNF- α može da igra zaštitnu ulogu nezavisno od svojih receptora. Nakon IM, niske koncentracije TNF- α *in vivo* inhibiraju KCL-indukovanu migraciju Ca²⁺ u kardiomiocite, čime se poboljšava sistolna funkcija miokarda. Male doze TNF- α mogu inhibirati funkciju disanja mitohondrijalnog stanja nakon povrede kardiomiocita anoksijoreoksigencijom, smanjiti oslobađanje proteina za razdvajanje koji zavisi od curenja protona i transmembranski potencijal, oslabiti dah zavisan od glutamata, i povećavaju oporavak mitohondrijalne brzine disanja, čime se poboljšava funkcija mitohondrija. Ovaj zaštitni mehanizam se ostvaruje regulacijom ROS-a kao i sfingomijelinskog puta (186). Određena količina TNF- α *in vivo* takođe može da inhibira lučenje leptina kako bi se smanjila povreda izazvana ishemijom/reperfuzijom miokarda.

1.9.Regulator apoptoze BAX i infarkt miokarda

Regulator apoptoze BAX, takođe poznat kao protein 4 sličan bcl-2, je protein koji je kod ljudi kodiran BAX genom (187). BAX je član porodice gena Bcl-2. Članovi porodice BCL2 formiraju hetero- ili homodimere i deluju kao anti- ili pro-apoptotički regulatori koji su uključeni u širok spektar ćelijskih aktivnosti. Ovaj protein formira heterodimer sa BCL2 i funkcioniše kao apoptotički aktivator. Ovaj protein interaguje i povećava otvaranje mitohondrijalnog anjonskog kanala zavisnog od napona (VDAC), što dovodi do gubitka membranskog potencijala i oslobađanja citokroma c. Ekspresiju ovog gena reguliše tumor supresor P53 i pokazalo se da je uključen u apoptozu posredovanu P53 (188).

Kao što je ranije pomenuto, apoptoza je visoko regulisan proces u kojem nekoliko regulatornih proteina igra ulogu i u kojem ravnoteža između niza regulatornih proteina odlučuje o sudbini ćelije. Ekspresija dva takva regulatorna proteina, bcl-2 i BAX, proučavana je u srcima pacijenata koji su umrli od AIM (189). Bcl-2, inhibitor apoptoze,

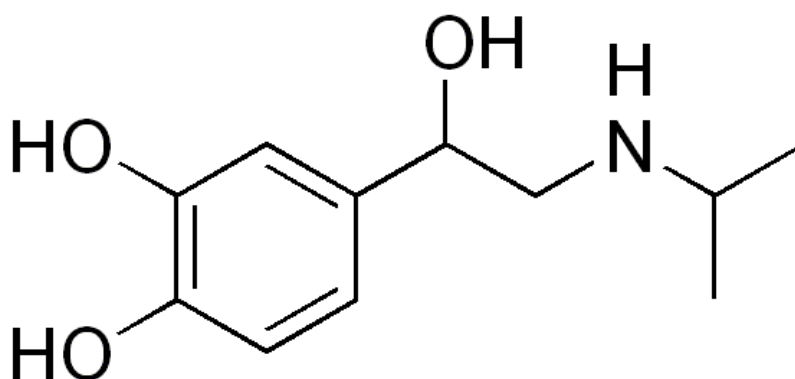
nije izražen u neinfarktnom tkivu miokarda (190), ali je izražen u kardiomiocitima koji okružuju infarktna područja ubrzo nakon pojave infarkta. Međutim, u samom infarktnom području nije pronađen bcl-2. BAX je član porodice bcl-2 i, kada je prekomjerno izražen, ubrzava apoptozu. Takođe se suprotstavlja aktivnosti represora smrti bcl-2 (191). Za razliku od bcl-2, BAX ima nisku bazalnu ekspresiju u ljudskim srcima bez srčanih bolesti (189). Prekomerna ekspresija BAX pronađena je u dva od 15 srca u akutnoj fazi infarkta (između šest sati i 20 dana nakon pojave infarkta miokarda (IM)). U starom stadijumu (više od mjesec dana nakon pojave IM) prekomjerna ekspresija BAX je nađena u 10 od 12 srca, pretežno u oblastima koje okružuju infarktna područja. U ovim oblastima je nestala ekspresija bcl-2, prisutna u akutnoj fazi. Stoga je odnos BAX prema bcl-2 visok i može biti povezan sa apoptotičnom smrću ćelija u ovim oblastima u starom infarktu.

U eksperimentu *in vivo* na pacovima, prekidi lanaca DNK su uočeni već tri sata nakon okluzije koronarne arterije (192). Apoptoza je bila praćena smanjenjem vrijednosti bcl-2 proteina i povećanjem ekspresije BAX, što ukazuje na ulogu ovih proteina u regulaciji ishemijom izazvane apoptoze kod pacova. U drugom *in vivo* modelu pacova otkriveno je da je EAT/mcl-1, neposredni rani gen povezan sa bcl-2, snažno pojačan već 30 minuta nakon okluzije koronarne arterije (193). U skladu sa ovim, kod transgenih miševa koji prekomjerno ekspresiraju humani bcl-2, smanjena je reperfuziona povreda miokarda (194). Ovo smanjenje reperfuzione povrede je u korelaciji sa značajnim smanjenjem apoptoze, mjereno samo pomoću TUNEL metode bojenja. Kod eksperimentalnih životinja reperfuzija je rezultovala smanjenom ekspresijom bcl-2 i povećanom ekspresijom BAX u ishemijskom području, dok se nakon trajne ishemije vrijednosti bcl-2 i BAX nisu mijenjale (195).

1.10. Eksperimentalni model akutnog infarkta srca izazvanog izoprenalinom

U eksperimentalnim istraživanjima postoje raznovrsni životinjski modeli akutnog oštećenja srca, a jedan od najčešćih je supkutana aplikacija izoprenalina (izoproterenol-ISO) u velikim dozama, što dovodi do izazivanja intenzivnog oksidativnog stresa i oštećenja srčanog mišića eksperimentalnih životinja. Patofiziološke i morfološke aberacije nastale u srcima miokardijalnog nekrotičnog modela pacova mogu se uporediti sa onim koje se javljaju u infarktu miokarda (IM), (158,159).

Izoprenalin/Izoproterenol 4- [1-hidroksi-2- (izopropilamino) etil] benzen-1,2-diol hidroklorid (ISO) sintetički je kateholamin i neselektivni simpatomimetički β_1 i β_2 - adrenergički agonist koji uzrokuje jak stres u miokardu i rezultuje IM kada se primjenjuje iznad maksimalnih doza. Strukturno je sličan adrenalinu. U modelu pacova ISO proizvodi nekrozu miokarda koja dovodi do srčane disfunkcije, povećane peroksidacije lipida i povećane nivoa lipida u miokardu te promijenjenih aktivnosti srčanih enzima i antioksidansa. Predloženi mehanizmi za objašnjenje induciranoog IM uključuju stvaranje visoko citotoksičnih slobodnih radikala kroz autoksidaciju kateholamina.

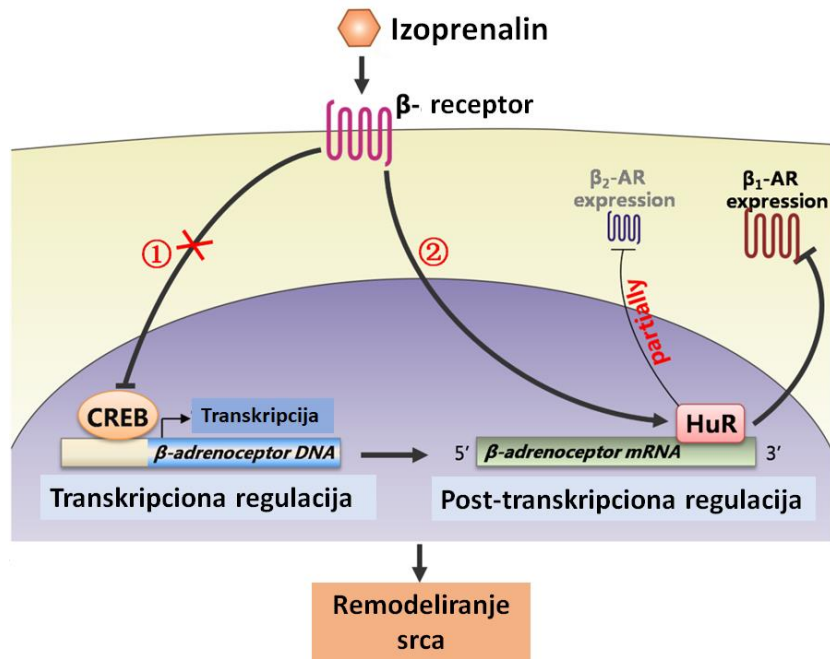


Slika 10. Struktura izoprenalina (Autor)

Ti slobodni radikali djeluju na polinezasićene masne kiseline (*polynsaturated fatty acids*- PUFA) unutar membrana, gradeći peroksilne radikale. Tada radikali mogu napadati susjedne masne kiseline, uzrokujući lančanu reakciju peroksidacije lipida (LPO). Krajnji proizvodi lipidnog hidroperoksida štetni su i mogu pridonijeti povećanoj propusnosti membrane, što dovodi do razvoja kardiomiopatije (159).

Drugi mehanizmi predloženi za objašnjenje oštećenja miokarda izazvanog izoproterenolom, uključuje: neravnotežu između opskrbljivanja i potražnje kardiomiocita iznutra, što je povezano s hiperfunkcijom miokarda zbog povećanja hronotropizma i inotropizma, kao i hipotenzije u koronarnom slivu. Drugo, takođe postoji porast prekomjernog punjenja Ca^{2+} unutar ćelije. U dodatku, taj je jon (Ca^{2+}) povezan s aktivacijom enzima adenilat ciklaze i iscrpljenjem nivoa ATP tokom događaja. Na kraju dolazi do povećanja oksidativnog stresa (160).

Dakle, izoprenalin je neselektivni agonist beta adrenergičkih receptora. Agonizam beta-1 i beta-2 adrenergičkih receptora uzrokuje da alfa podjedinica receptora vezanih za G-protein razmenjuje GMP za GTP, aktivirajući ih i dozvoljavajući alfa podjedinici da se odvoji od beta i gama podjedinice (slika 11).



Slika 11. Grafički rezime kako su β-AR bili smanjeni u ISO-indukovanom remodelovanju srca
(Autor na osnovu izvora 158, 159, 160)

Legenda: Trajna β-AR aktivacija izoproterenolom je povećala ekspresiju HuR, a ne inhibirala ekspresiju i aktivaciju CREB, što je smanjilo ekspresiju β₁-AR i djelimično regulisalo ekspresiju β₂-AR u modelu remodeliranja srca.

II. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati efekte izoprenalinom (ISO) indukovano oštećenja srca pacova:
 - koncentracije srčanih biomarkera u serumu pacova (visoko senzitivni troponin I- hsTnI, laktat dehidrogenazu- LDH, aspartat aminotransferazu- AST);
 - enzimske markere oksidativnog stresa i remodelovanja u homogenatu srca pacova (superoksid dismutazu - SOD, katalazu - CAT, glutation - GSH), reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS);
 - funkcionalne i biohemijske pokazatelje srčane aktivnosti (proinflamatorne povezane citogenske gene i gene koji regulišu apoptozu): BAX, TNF, NF- κ B, BCL2;
 - biohemijske markere u serumu pacova: glukozealanin aminotransferaza- ALT, alkalna fosfataza- AP, lipidni status (HDL-holesterol, LDL-holesterol, ukupni holesterol, trigliceridi), homocistein, glukozu, D-dimer, von Willebrandov faktor- vWF, fibrinogen;
 - patohistološke promjene u srcu pacova (prisustvo neutrofila u polju oštećenja, površina polja oštećenja).
2. Ispitati efekte ursodeoksiholne (UDCA) kiseline na modelu oštećenja srca izazvanog ISO na navedene parametre.
3. Ispitati efekte henodeoksiholne (CDCA) na modelu oštećenja srca pacova izazvanog ISO na navedene parametre.
4. Ispitati efekte propilen glikola (PG) na modelu oštećenja srca pacova izazvanog ISO na navedene parametre.

III. HIPOTEZE

1. Primjenom izoprenalin (ISO) dolazi do oštećenja srca pacova na koje ukazuju:
 - Porast koncentracije srčanih biomarkera u serumu pacova (visoko senzitivni troponin I- hsTnI, laktat dehidrogenazu- LDH, aspartat aminotransferazu- AST);
 - Promjena enzimske aktivnosti enzima oksidativnog stresa i remodelovanja srca pacova (superoksid dismutazu - SOD, katalazu - CAT, glutation - GSH), reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS);
 - Promjena pokazatelja srčane aktivnosti uključujući: BAX, TNF, NF- κ B i BCL2;
 - Porast biokemijskih markera u serumu pacova: glukozealanin aminotransferaza- ALT, alkalna fosfataza- AP, lipidni status (HDL-holesterol, LDL-holesterol, ukupni holesterol, trigliceridi), homocistein;
 - Pojava patohistoloških promjena u srcu pacova (prisustvo neutrofila u polju oštećenja, površina polja oštećenja).
2. Primjena ursodeoksiholne (UDCA) kiseline smanjuje stepen oštećenja tkiva srca izazvanog izoprenalinom (ISO) i dovodi do promjene vrijednosti funkcionalnih i biokemijskih pokazatelja srčane aktivnosti
3. Primjena henodeoksiholne (CDCA) smanjuje stepen oštećenja tkiva srca izazvanog izoprenalinom (ISO) i dovodi do promjene vrijednosti funkcionalnih i biokemijskih pokazatelja srčane aktivnosti
4. Primjena propilen glikola (PG) ne utiče na stepen oštećenja tkiva srca izazvanog izoprenalinom (ISO) i ne dovodi do promjene vrijednosti funkcionalnih i biokemijskih pokazatelja srčane aktivnosti

IV. MATERIJAL I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje je urađeno kao eksperimentalna studija na pacovima soja *Wistar albino*, starosti 3-4 sedmice i početne tjelesne mase oko 200-250g na početku eksperimenta. Životinje su aklimatizovane 7 dana prije intervencije i čuvane u pleksiglas-transparentnim kavezima sa žičanim poklopcem (dvije životinje po kavezu) sa dnom obloženim šuškom, sa hranom i vodom dostupnom *adlibitum* i konstantnim ambijentalnim uslovima (temperatura 21 ± 2 °C; vlažnost vazduha 55 ± 5 %; ciklusom svjetlo-tama na 12 sati sa početkom svijetlog perioda u 08:00h i tamnog perioda u 20:00h). Istraživanje je sprovedeno u skladu sa dozvolom Etičke komisije/odbora za zaštitu dobrobiti eksperimentalnih životinja, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, uz poštovanje Pravilnika o čuvanju, načinu njege, postupanju i lišavanju života eksperimentalnih životinja.

4.2. Eksperimentalni protokol

Model oštećenja miokarda pacova je zasnovan na aplikaciji izoprenalina (ISO) u predjelu leđa subkutano u dozi od 85 mg/kg TM, rastvoren u 1ml/kg tjelesne mase (TM) 0,9% NaCl-a, dva puta u intervalu od 24 sata (160). Eksperimentalni model oštećenja miokarda kod pacova je dokazan analizom dinamike produkcije biomarkera oštećenja srca u serumu (serum je dobijen uzorkovanjem krvi nakon žrtvovanja životinje), kao i potvrđivanjem odgovarajućim patohistološkim nalazom na srcu (takođe nakon žrtvovanja životinje). *In vivo* ogled je podrazumijevao formiranje dva različita eksperimentalna modela: kontrolnu grupu i eksperimentalnu grupu. Kontrolna grupa je imala 1 grupu (podgrupu). Eksperimentalna grupa je imala ukupno 5 grupa (podgrupa).

4.2.1. Formiranje grupa

Ukupan broj životinja bio je 45 (n=45), i one su podijeljene kako je već navedeno u dvije grupe, kontrolnu i eksperimentalnu.

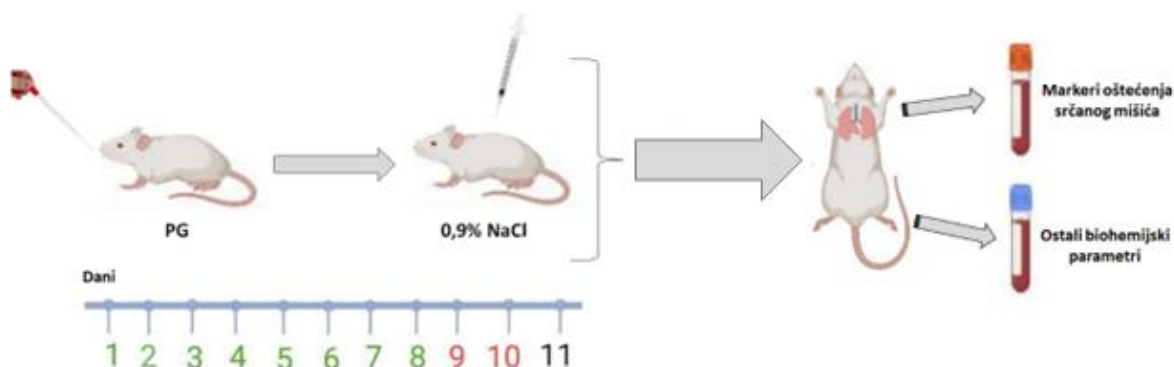
4.2.2. Kontrolna grupa

Kontrolna grupa (C) - broj životinja je 6 (n=6). Ovoj grupi je aplikovano tokom 10 dana vehikulum za žučne kiseline- propilen glikol (PG) *per os*, s tim da je 9-og i 10-og dana dat i 0,9% NaCl s.c. u predjelu leđa, dva puta u razmaku od 24 h u dozi 1 ml/kg tjelesne težine. Nakon toga (24 h nakon zadnje aplikacije fiziološkog rastvora tj. 11-og dana) vršeno je žrtvovanje životinje uz prethodnu anesteziju.

Tabela 1. Tabela prikaz eksperimentalne procedure kod kontrolne grupe (C)

Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG + 0,9% NaCl	PG + 0,9% NaCl	Eutanazija	
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

n=6



Slika 11. Dizajn studije primjene propilen glikola kod kontrolne grupe eksperimentalnih životinja – pacova (C)

PG – propilen glikol; 0.9% NaCl – fiziološki rastvor

4.2.3. Eksperimentalne grupe

Eksperimentalne grupe su podijeljene u 5 podgrupa. Ukupan broj životinja u ovoj grupi je 39. Podgrupe su sljedeće:

- Igrupa– broj životinja je 8 (n=8). Ovoj grupi je aplikovano tokom 10 dana vehikulum za žučne kiseline- propilen glikol (PG) *per os*, s tim da je 9-og i 10-og dana dat i izoprenalin (ISO) s.c. u predjelu leđa, dva puta u razmaku od 24h u dozi 85 mg/kg tjelesne težine. Nakon toga (24 h nakon zadnje aplikacije ISO tj. 11-og dana) vršeno je žrtvovanje životinje uz prethodnu anesteziju.

Tabela 2. Tabelarni prikaz eksperimentalne procedure kod I grupe

Dan1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG + ISO	PG + ISO	Eutanazija	
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

n=8

- UDCA grupa – broj životinja je 6 (n=6). Ovoj grupi je aplikovano tokom 10 dana ursodeoksiholna kiselina (UDCA) *per os* u dozi od 25mg/kg tjelesne težine, s tim da je 9-og i 10-og dana dat i 0,9% NaCl 0 s.c. u predjelu leđa, dva puta u razmaku od 24 h u dozi 1 ml/kg tjelesne težine. Nakon toga (24h nakon zadnje aplikacije fiziološkog rastvora tj. 11-og dana) vršeno je žrtvovanje životinje uz prethodnu anesteziju.

Tabela 3. Tabelarni prikaz eksperimentalne procedure kod UDCA grupe

Dan1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA + 0,9% NaCl	UDCA + 0,9% NaCl	Eutanazija	
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

n=6

- CDCA grupa – broj životinja je 6 (n=6). Ovoj grupi je aplikovano tokom 10 dana henodeoksiholna kiselina (CDCA) *per os* u dozi od 25mg/kg tjelesne težine, s tim da je 9-og i 10-og dana dat i 0,9% NaCl s.c. u predjelu leđa, dva puta u razmaku od 24h u dozi 1 ml/kg tjelesne težine. Nakon toga (24h nakon zadnje aplikacije fiziološkog rastvora tj. 11-og dana) vršeno je žrtvovanje životinje uz prethodnu anesteziju.

Tabela 4. Tabelarni prikaz eksperimentalne procedure kod CDCA grupe

Dan1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA + 0,9% NaCl	CDCA + 0,9% NaCl	Eutanazija	
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

n=6

- UDCA I grupa – broj životinja je 10 (n=10). Ovoj grupi je aplikovano tokom 10 dana ursodeoksiholna kiselina (UDCA) *per os* u dozi od 25mg/kg tjelesne težine, s tim da je 9-og i 10-og dana dat i izoprenalina (ISO) s.c. u predjelu leđa, dva puta u razmaku od 24h u dozi 85 mg/kg tjelesne težine. Nakon toga (24h nakon zadnje aplikacije ISO tj. 11-og dana) vršeno je žrtvovanje životinje uz prethodnu anesteziju.

Tabela 5. Tabelarni prikaz eksperimentalne procedure kod UDCA I grupe

Dan1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA	UDCA + ISO	UDCA + ISO	Eutanazija	
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

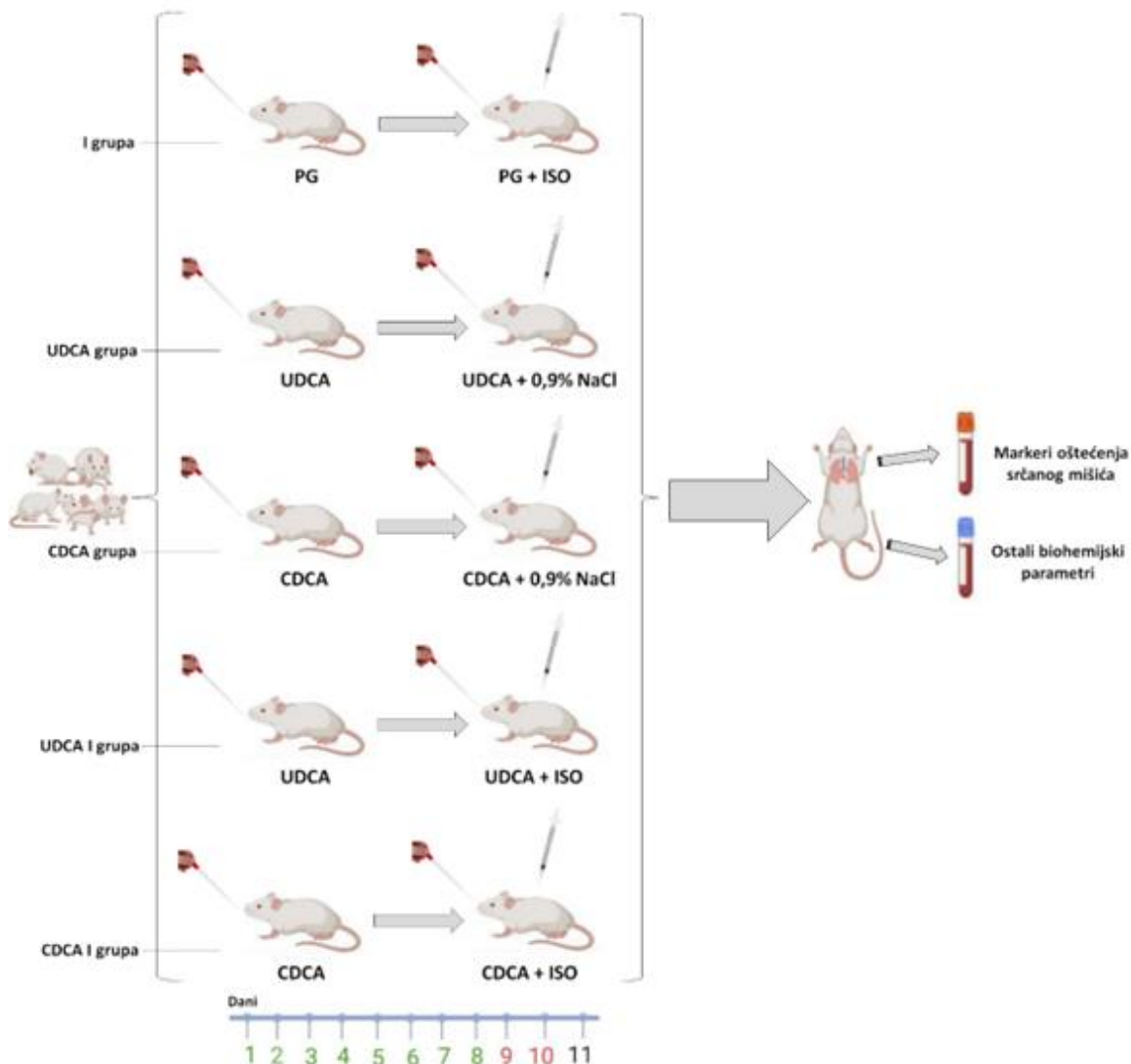
n=10

- CDCA I grupa – broj životinja je 9 (n=9). Ovoj grupi je aplikovano tokom 10 dana henodeoksiholna kiselina (CDCA) *per os* u dozi od 25mg/kg tjelesne težine, s tim da je 9-og i 10-og dana dat i izoprenalilin (ISO) s.c. u predjelu leđa, dva puta u razmaku od 24 h u dozi 85 mg/kg tjelesne težine. Nakon toga (24 h nakon zadnje aplikacije ISO tj. 11-og dana) vršeno je žrtvovanje životinje uz prethodnu anesteziju.

Tabela 6. Tabelarni prikaz eksperimentalne procedure kod UDCA I grupe

Dan1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA	CDCA + ISO	CDCA + ISO	Eutanazija	
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

n=9



Slika 12. Dizajn studije kod eksperimentalne grupe eksperimentalnih životinja sa podgrupama

PG – propilen glikol; UDCA – ursodeoksiholna kiselina; CDCA - henodeoksiholna kiselina; ISO - izoprenalin; 0.9% NaCl – fiziološki rastvor

4.3. Postupak uzorkovanja i analize krvi

Na jedanaesti dan, 24h poslije posljednje oralne ili parenteralne primjene sredstva, pacovi se stavljaju u anesteziju mješavinom ketamina u količini od 30 mg/kg tt i ksilazina u količini od 5 mg/kg. Sredstvo se daje intraperitonealno radi brže apsorpcije. Kod ovako anesteziranih životinja vrši se otvaranje grudnog koša i uzimaju se uzorci krvi iz aorte koji se skupljaju u vakutajner epruvetama za serum i epruvetama za plazmu koje sadrže natrijum

citrat kao antikoagulans. Ovi uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 20 minuta dok se ne stvori ugrušak, a zatim su se centrifugirali 5 minuta na 3 000 okretaja u minuti. Uzorci plazme su se centrifugirali 10 minuta na 3 000 okretaja u minuti. Lizat eritrocita (ER) se dobivao nakon odvajanja plazme. Tako izdvojeni Er su se ispirali tri puta, u tri zapremine hladnog 0,9% fiziološkog rastvora. Ovi uzorci su se čuvali na temperaturi od -80°C do konačnog mjerenja. Uzorci seruma su se upotrebljavali za:

- mjerenje markera oštećenja srčanog mišića (visoko senzitivnog troponina I- hsTnI, laktat dehidrogenaze- LDH, aspartat aminotransferaze-AST),
- druge biohemijske parametre: glukozu, homocistein-Hcy, ukupni holesterol (total cholesterol - TC), holesterol visoke gustine (high density lipoprotein - HDL), holesterol niske gustine (low density lipoprotein – LDL), trigliceride (triglycerides - TG). Uzorci plazme su se upotrebljavali za mjerenje markera oksidativnog stresa: tiobarbiturne kiseline reaktivne supstance (TBARS), H₂O₂ i O₂. Uzorci lizata Er su se upotrebljavali za mjerenje: markera oksidativne zaštite- SOD, CAT, GSH.
- Numeričke vrijednosti sljedećih parametara: AST, ALT, LDH, glukoze, TC, HGL, LDL i TG su određivane na aparatu Abbot Alinity ci-series metodom hemiluminiscentnog imunoasaja (*chemiluminescence immunoassay* - CLIA).
- Homocistein- Hcy i hs TnI su određivani na aparatu Abbot Alinity ci-series metodom hemiluminiscentnog imunoasaja mikropartikula (*chemiluminescent microparticle immunoassay* - CMIA).

Prooksidansi TBARS kao i antioksidansi (SOD, CAT i GSH) su određivani spektrofotometrijski na aparatu Shimadzu UV 1800, proizvedenom u Japanu. TBARS kao pokazatelj lipidne peroksidacije određivan je u reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) i malondialdehida. Nakon što se plazma pomiješa sa 1% tiobarbiturnom kiselinom i 0,05% NaOH, određivanje je vršeno na talasnoj dužini od 530 nm. Koncentracije SOD, CAT i GSH su određivane metodama po Beutler-u. Aktivnost SOD je određivana nakon miješenja lizata Er sa karbonatnim puferom, a zatim i sa noradrenalinom. Određivanje je vršeno na 470 nm talasne dužine. Za određivanje aktivnosti CAT je korišten vodeni rastvor H₂O₂, katalaza pufer i razrijeđeni uzorak lizata. Određivanje aktivnosti ovog enzima je vršeno na talasnoj dužini od 360 nm. Koncentracija redukovano glutationa se temelji na oksidaciji GSH sa 5,5-ditio-bis-6,2-nitrobenzoičnom kiselinom (DTNB) metodom po Beutler-u. Određivanje količine GSH je vršeno na 420 nm.

V. REZULTATI

5.1. Efekti primjene UDCA i CDCA na biokemijske parametre i serumske srčane markere

Najosetljiviji marker oštećenja miokarda je srčani troponin - troponina I. Rezultati su pokazali da je nivo hsTnI značajno povećan u I grupi u odnosu na S ($p=0,029$), što je dokazalo da izoprenalin indukuje IM (Tabela 7). Prethodni tretmansa UDCA i CDCA ublažio je oštećenje kardiomiocita, ali zbog visokog SD razlika nije bila značajna. Vrijednosti D-dimera i vWF nisu pokazale značajnu razliku između grupa. Vrijednosti fibrinogena su bile različite između grupa ($p=0,028$). U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti fibrinogena su bile značajno veće u CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,011$). Vrijednosti Hcy su bile različite između grupa ($p<0,001$).

U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti homocisteina su bile značajno niže u CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,046$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, nije bilo značajne razlike između grupa.

Tabela 7. Biohemijski parametri seruma kod pacova tretiranih izoprenalinom i CDCA ili UDCA

Parametri	Grupe - mean (SD)					
	PG + C	PG + I	CDCA + S	CDCA + I	UDCA + S	UDCA + I
Fibrinogen (p)(g/L)*	0.80 (0.00)	0.80 (0.14)	0.98 (0.27)	1.94 (1.00)†	1.00 (0.31)	1.54 (1.12)
D-dimer (p)(mg/L)**	0.17 (0.00)	0.17 (0.00)	0.17 (0.01)	0.22 (0.09)	0.31 (0.23)	0.19 (0.07)
vWF (p)(%)*	19.20 (3.76)	12.50 (2.14)	11.70 (3.61)†††	13.10 (4.29)	16.00 (3.16)	17.70 (2.50)††
Glukoza (mmol/L)**	17.9 (4.11)	15.3 (3.66)	18.3 (4.30)	15.4 (4.99)	19.2 (6.05)	15.5 (3.39)
hs-TnI (pg/mL)*¶	224.8 (359.5)	12659.7 (11757.4)	149.7 (171.0)	4736.4 (2850.2)	375.4 (522.0)	4678.9 (2599.7)
AST (U/L)**	253.5 (112.9)	576.9 (422.3)	260.3 (158.3)	358.6 (97.5)	394.3 (335.1)	421.3 (95.4)
ALT (U/L)**	92.5 (74.6)	268 (423.0)	76.3 (24.4)	120.7 (84.6)	98.2 (79.5)	165.1 (226.0)
LDH (U/L)**	1259.2 (737.7)	1436.4 (399.2)	1195.0 (985.1)	1249.7 (356.6)	2053.2 (2111.9)	1432.0 (794.9)
Hcy (μmol/L)*	7.20 (1.85)	14.70 (2.47)	6.82 (1.17)	10.90 (2.15)¶¶	7.95 (1.11)	12.10 (2.20)

AST: aspartat aminotransferaza; ALT: alanin aminotransferaza; LDH: laktat dehidrogenaza; Hcy - homocistein; C: fiziološki rastvor; PG: propilen glikol; CDCA: henodeoksiholna kiselina; UDCA: ursodeoksiholna kiselina; Tretman: CDCA (25 mg/kg *per os*) ili UDCA (25 mg/kg *per os*) ili PG (1 mL/kg *per os*) tokom 10 dana. 9. i 10. dana pacovi su tretirani izoprenalinom (I: 85 mg/kg *sc*) ili fiziološkim rastvorom (C: 1 mL/kg *sc*). * Opšta statistička značajnost (Kruskal-Wallisov test) – $p < 0,05$, ** $p > 0,05$.

Iz tabele 7 možemo vidjeti da su u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti vVF su bile značajno veće u UDCA grupi u poređenju sa CDCA grupom ($p=0,027$), kao i PG grupom ($p<0,001$). Pored toga vrijednosti fibrinogena u grupama koje su primale izoprenalin značajno veće u CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,011$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti vVF su bile značajno niže u CDCA u poređenju sa UDCA grupom ($p=0,041$), kao i PG grupom ($p=0,015$).

U grupama koje su primale izoprenalin i ne-izoprenalinskim grupama, nema značajne razlike između grupa. Takođe, u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti homocisteina su bile značajno niže u CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,046$). U grupama koje nisu primale izoprenalin nije bilo značajne razlike između grupa.

Profil lipida je analiziran da bi se istražili efekti UDCA i CDCA na metabolizam lipida. Opšta statistička značajnost (Kruskal-Wallisov test) utvrđena je za vrijednosti LDL i TG ($p=0,037$ i $p=0,004$), (Tabela 8). U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti LDL su bile značajno veće u PG u odnosu na CDCA grupu ($p=0,046$), kao i grupu UDCA ($p=0,011$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, nije bilo značajne razlike između grupa. U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti TG su bile značajno niže u PG u odnosu na CDCA grupu ($p=0,027$), kao i grupu UDCA ($p=0,008$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, nije bilo značajne razlike između grupa.

Tabela 8. Profil lipida u serumu kod pacova tretiranih izoprenalinom i CDCA ili UDCA

Parametri	Grupe - mean (SD)					
	PG + C	PG + I	CDCA + S	CDCA + I	UDCA + S	UDCA + I
TC (mmol/L)**	1.20 (0.23)	1.72 (0.16)	1.27 (0.33)	1.34 (0.36)	1.22 (0.29)	1.40 (0.35)
HDL (mmol/L)**	0.50 (0.09)	0.65 (0.11)	0.53 (0.16)	0.54 (0.15)	0.45 (0.12)	0.53 (0.15)
LDL (mmol/L)*	0.15 (0.05)	0.29 (0.06) [†]	0.13 (0.05)	0.16 (0.07)	0.13 (0.05)	0.13 (0.05)
TG (mmol/L)*	1.30 (0.53)	0.49 (0.22) ^{††}	1.32 (0.59)	0.80 (0.32)	0.87 (0.39)	0.80 (0.30)

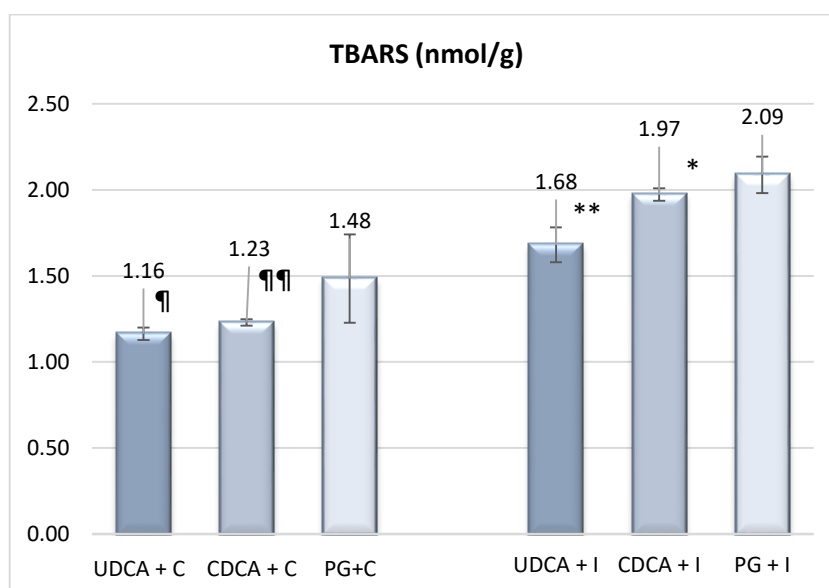
TC: ukupan holesterol; HDL: lipoprotein visoke gustine; LDL: lipoprotein niske gustine; TG: trigliceridi; C: fiziološki rastvor; PG: propilen glikol; CDCA: henodeoksiholna kiselina; UDCA: ursodeoksiholna kiselina; Tretman: CDCA (25 mg/kg *per os*) ili UDCA (25 mg/kg *per os*) ili PG (1 mL/kg *per os*) tokom 10 dana. 9. i 10. dana pacovi su tretirani izoprenalinom (I: 85 mg/kg s.c.) ili fiziološkim rastvorom (C: 1 mL/kg s.c.). *Opšta statistička značajnost (Kruskal-Wallisov test) – $p < 0,05$, ** $p > 0,05$.

Iz tabele 8 možemo vidjeti da su u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti LDL-a su bile značajno veće, kada je riječ o PG u poređenju sa CDCA grupom ($p=0,046$), kao i grupom UDCA ($p=0,011$). U grupama koje nisu primale izoprenalin nije bilo značajne razlike između grupa. Pored toga u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti Tgl su

bile značajno niže kod grupe PG u poređenju sa grupom CDCA ($p=0,027$), kao i grupom UDCA ($p=0,008$). U grupama koje nisu primale izoprenalin nije bilo značajne razlike između grupa.

5.2. Efekti CDCA i UDCA na markere oksidativnog stresa

TBARS, kao marker peroksidacije lipida, pokazao je značajno povećanje u grupi tretiranoj izoprenalinom ($p=0,07$), što ukazuje na učešće izoprenalina u oksidativnom stresu (grafikon 1). Postojala je značajna razlika između grupa (Kruskal-Wallisov test $p<0,001$). U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže kod grupe tretirane sa UDCA u odnosu na PG grupu ($p<0,001$), kao i kod CDCA u odnosu na PG grupu ($p=0,006$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže UDCA u poređenju sa CDCA ($p=0,024$) i PG grupom ($p=0,024$), kao i CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,024$).



Slika 13. Markeri oksidativnog stresa – TBARS – kod pacova tretiranih izoprenalinom i CDCA ili UDCA

C: fiziološki rastvor; PG: propilen glikol; CDCA: henodeoksiholna kiselina; UDCA: ursodeoksiholna kiselina; Tretman: CDCA (25 mg/kg *per os*) ili UDCA (25 mg/kg *per os*) ili PG (1 mL/kg *per os*) tokom 10 dana. 9. i 10. dana pacovi su tretirani izoprenalinom (I: 85 mg/kg s.c.) ili fiziološkim rastvorom (C: 1 mL/kg s.c.). Opšta statistička značajnost (Kruskal-Wallisov test) – $p < 0,001$.

U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže u **UDCA u poređenju sa PG grupom ($p<0,001$), kao i *CDCA u poređenju sa PG grupom

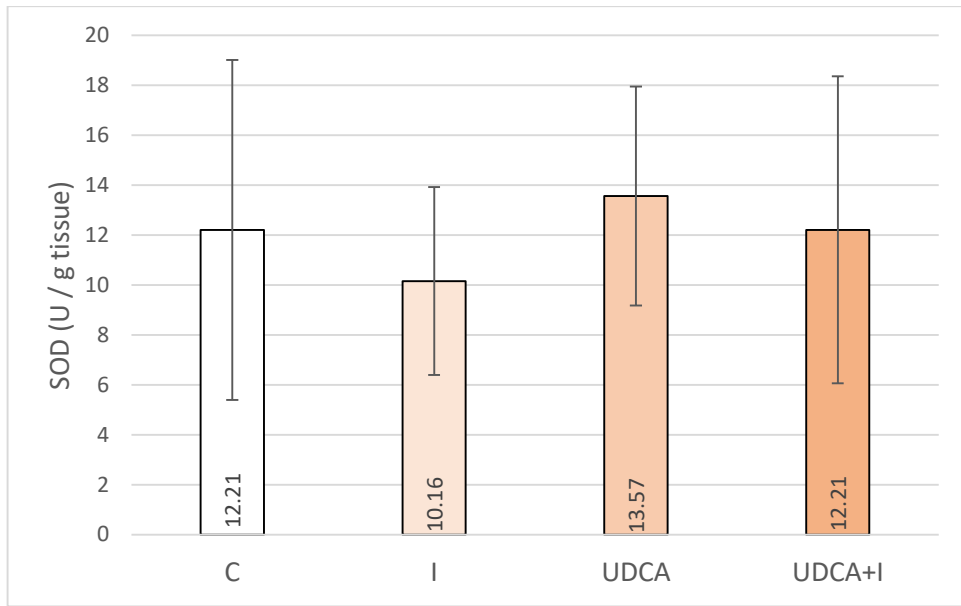
($p=0,006$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže u UDCA u poređenju sa CDCA ($p=0,024$) i PG grupom ($p=0,024$), kao i CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,024$).

SOD, CAT i GSH su analizirani kao antioksidativna odbrana organizma. SOD, CAT i GSH su pokazali smanjenje u grupi koja je tretirana izoprenalinom (Grafikon 2A, 2B, 2C, 2D). Opšta statistička značajnost (Kruskal-Wallisov test) SOD, CAT i GSH: $p=0,124$, $p=0,123$ i $p<0,001$, pokazuje značajnu razliku samo u vrijednostima GSH. Post Hoc analiza je pokazala da su u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti GSH bile značajno veće u CDCA u poređenju sa UDCA ($p=0,006$) i PG grupom ($p=0,002$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti GSH su bile značajno veće u CDCA u poređenju sa UDCA ($p=0,026$) i PG grupom ($p=0,002$).

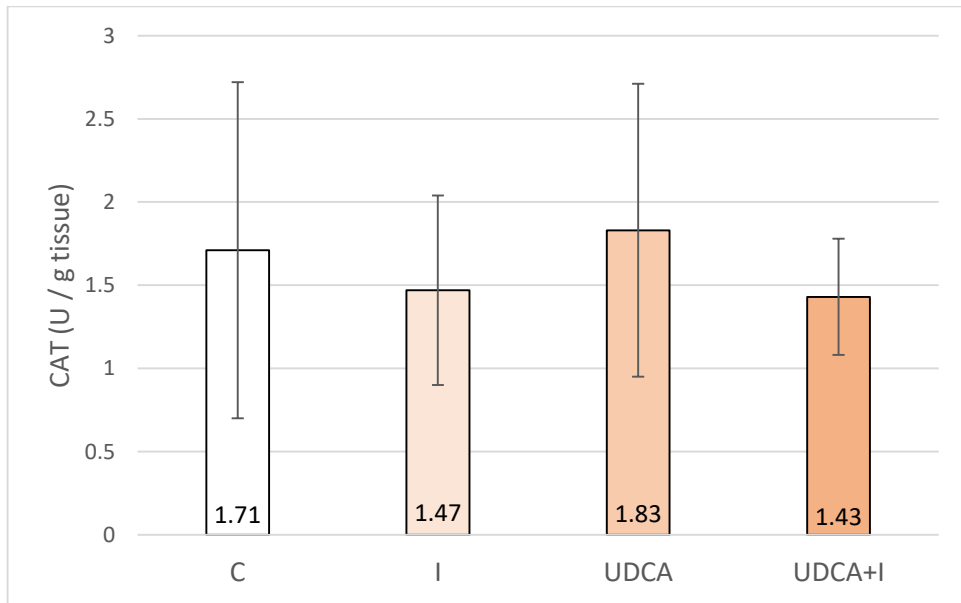
Tabela 9. Efekti UDCA i CDCA na markere oksidativnog stresa i aktivnost antioksidativnih enzima u srčanom tkivu

Parametri	Grupe (mean \pm SD)					
	PG-C	PG-I	UDCA-C	UDCA-I	CDCA-C	CDCA-I
TBARS (nmol/g srčano tkivo)	1.38 \pm 0.10	2.09 \pm 0.11†††	1.16 \pm 0.35	1.68 \pm 0.10***	1.23 \pm 0.02	1.97 \pm 0.38**
SOD (U/g srčano tkivo)	12.21 \pm 6.81	10.16 \pm 3.77	13.57 \pm 4.39	12.21 \pm 6.15	13.55 \pm 4.20	12.21 \pm 4.46
CAT (U/g srčano tkivo)	1.71 \pm 1.01	1.47 \pm 0.57	1.83 \pm 0.88	1.43 \pm 0.35	2.73 \pm 0.75	2.03 \pm 0.91
GSH (μ mol/g srčano tkivo)	73058.2 \pm 382.24	70297.6 \pm 825.63††	75433.9 \pm 526.2	71368.1 \pm 343.3*	76818.1 \pm 560.6	74266.1 \pm 507.7**

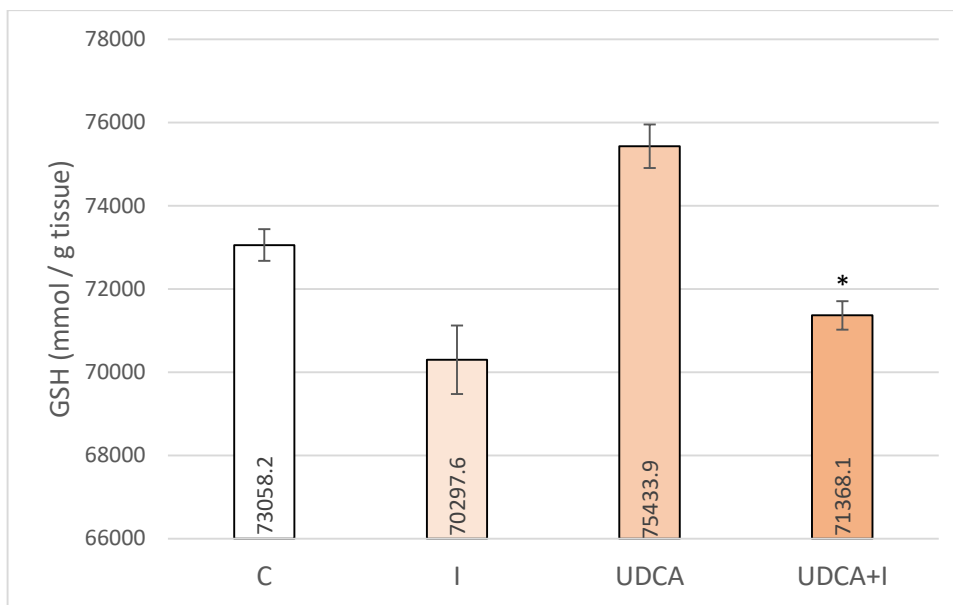
TBARS- tiobarbituratna kiselina; SOD- superoksid dismutaza; CAT- katalaza; GSH -Gluthation; Podaci u tabeli su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD ili srednja vrijednost \pm SE. PG-C- kontrolna grupa; PG-I- grupa tretirana izoprenalinom; UDCA-C grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA-I- grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i izoprenalinom; CDCA-C grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA-I- henodeoksiholna kiselina i grupa tretirana izoprenalinom. Urađeni su jednosmerni ANOVA, Bonferoni test i Mann-Whitney test i zvjezdica (*) ukazuje na značajne razlike u poređenju sa PG-I grupom * $p < .05$, *** $p < 0,001$ i znak (†) ukazuju na značajne razlike u poređenju sa PG-C grupom † $p < 0,05$; †† $p < .01$; ††† $p < .001$.



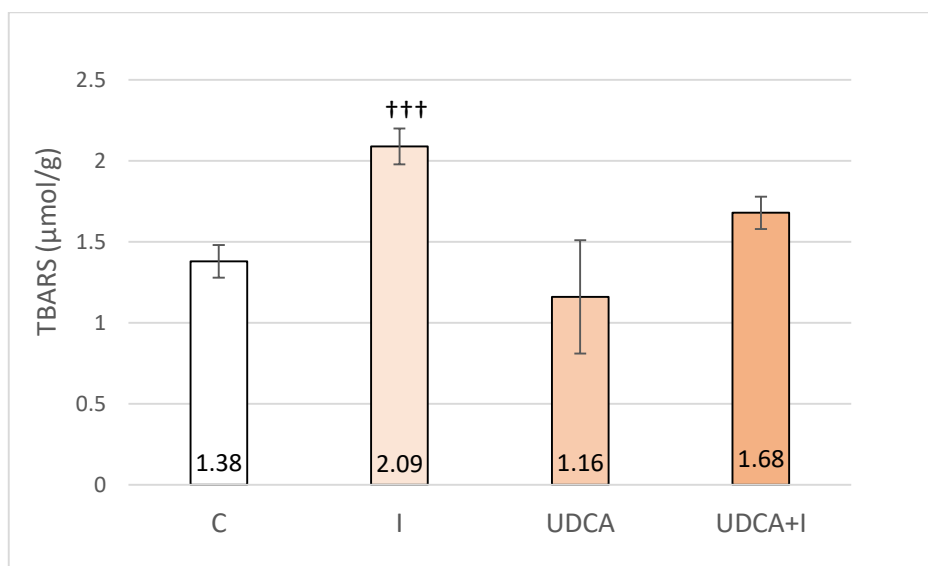
(A)



(B)



(C)



(D)

Slika 14. Aktivnost antioksidativnih enzima kod pacova tretiranih izoprenalinom i UDCA, (A) Aktivnost SOD u lizatu eritrocita; (B) CAT aktivnost u lizatu eritrocita; (C) Nivo GSH u lizatu eritrocita; (D) Nivo TBARS

C: fiziološki rastvor; PG: propilen glikol; UDCA: ursodeoksiholna kiselina; Tretman: CDCA (25 mg/kg *per os*) ili UDCA (25 mg/kg *per os*) ili PG (1 mL/kg *per os*) tokom 10 dana. 9. i 10. dana pacovi su tretirani izoprenalinom (I: 85 mg/kg s.c.) ili fiziološkim rastvorom (C: 1 mL/kg s.c.). Opšta statistička značajnost (Kruskal-Wallisov test) SOD, CAT i GSH: $p=0,124$, $p=0,123$ i $p<0,001$.

U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti GSH su bile značajno veće u *CDCA u poređenju sa UDCA (p=0,006) i PG grupom (p=0,002). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti GSH su bile značajno veće u **CDCA u poređenju sa UDCA (p=0,026) i PG grupom (p=0,002), (grafikon 2 A,B,C, D).

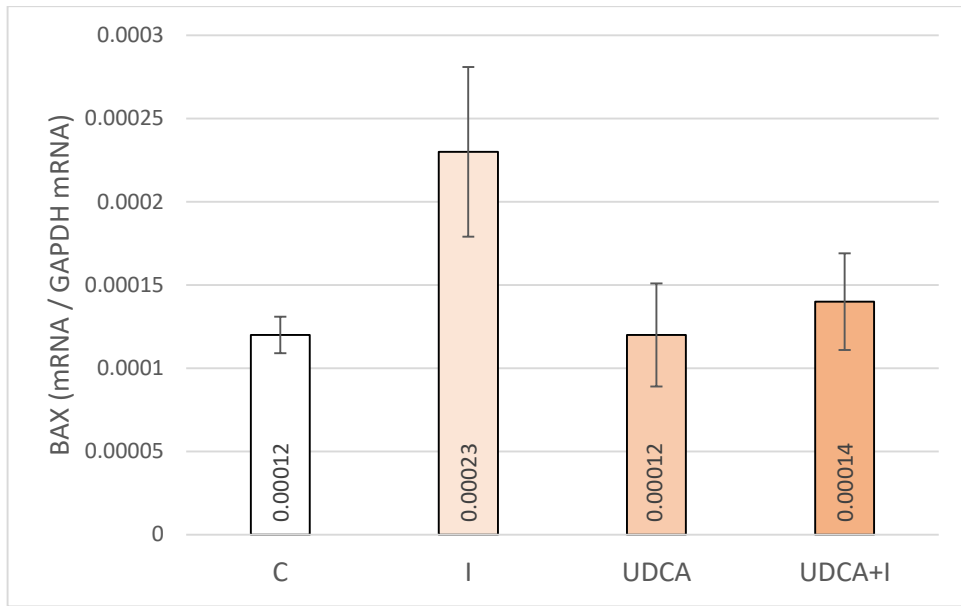
5.3.Efekti UDCA i CDCA na proinflatatorne povezane citokinske gene i gene koji regulišu apoptozu

U ovom dijelu eksperimenta urađeni su jednosmjerni ANOVA, Bonferroni test i Mann-Whitney test. Zvezdica (*) ukazuje na značajne razlike u poređenju sa PG-I grupom * p < .05, ***p < 0,001 i znak (†) ukazuju na značajne razlike u poređenju sa PG-C grupom † p < 0,05; †† p < .01; ††† p < .001 (tabela 10).

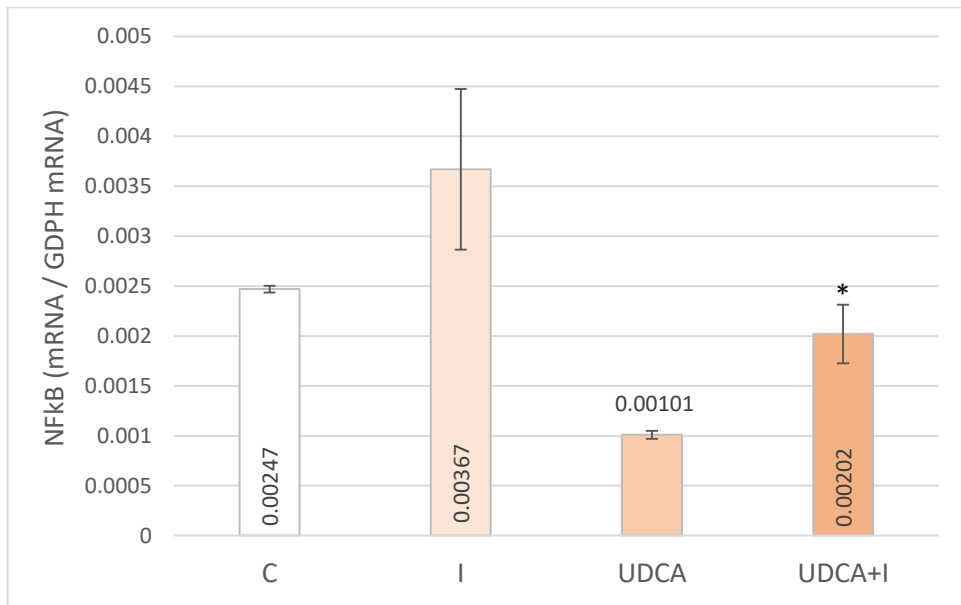
Tabela 10. Efekti UDCA i CDCA na proinflatatorne povezane citokinske gene i gene koji regulišu apoptozu

Parametri	Groups (mean ± SD)					
	PG-C	PG-I	UDCA-C	UDCA-I	CDCA	CDCA-I
BAX (g/g)	.00012 ± .000011	.00023 ± .000051†††	.00012 ± .000031	.00014 ± .000029***	.00018 ± .000021	.00021 ± .000030**
TNF (g/g)	.00012 ± .000033	.00059 ± .000058†††	.00012 ± .000077	.00059 ± .000029	.00017 ± .000020	.00019 ± .000035***
NFκB (g/g)	.00247 ± .000034	.00367 ± .000806†	.00101 ± .000041	.00202 ± .000293*	.00343 ± .001228	.00243 ± .000278
BLC2(g/g)	.00432 ± .001535	.00284 ± .000846††	.00160 ± .000103	.00347 ± .000482	.00453 ± .001529	.00384 ± .001216

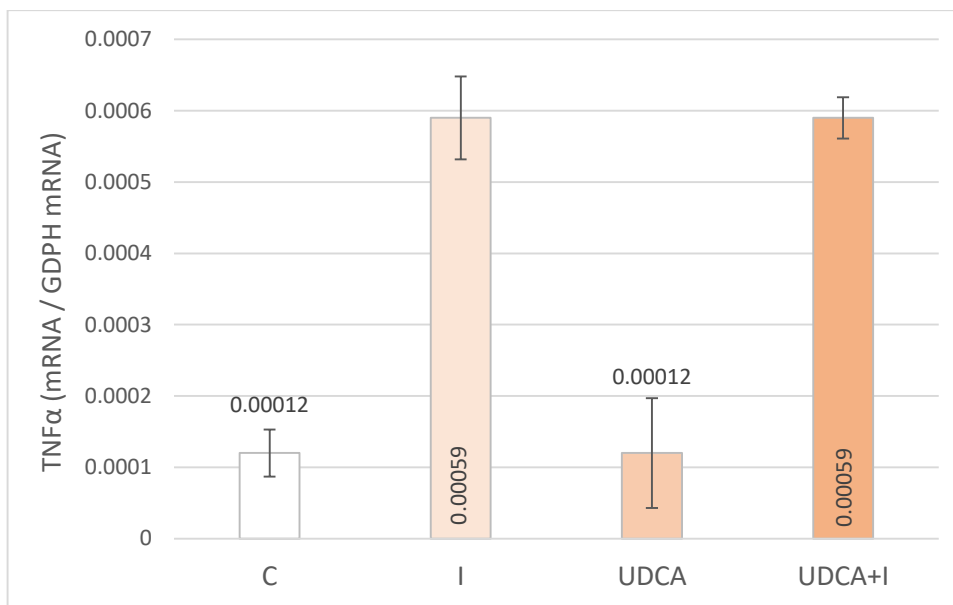
Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD ili srednja vrijednost ± SE. ; PG-C- kontrolna grupa; PG-I- grupa tretirana izoprenalinom; UDCA- grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA-I- grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i izoprenalinom; CDCA- grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA-I- henodeoksiholna kiselina i grupa tretirana izoprenalinom.



(A)



(B)



(C)

Slika 15. Efekti UDCA na proinflamatorne povezane citokinske gene i gene koji regulišu apoptozu:

(A) BAX; (B) NFkB; (C) TNFalfa

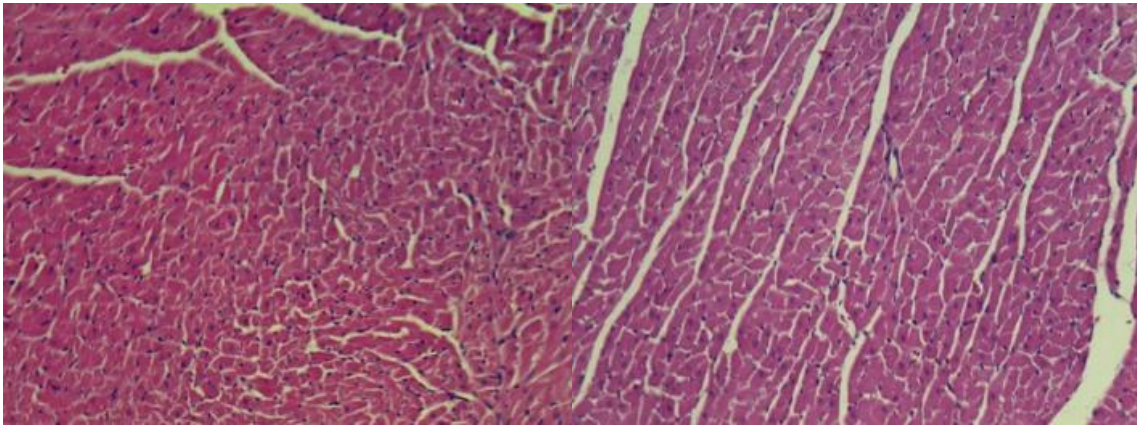
PG-C- kontrolna grupa; PG-I- grupa tretirana izoprenalinom; UDCA- grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA-I- grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i izoprenalinom; CDCA- grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA-I- henodeoksiholna kiselina i grupa tretirana izoprenalinom.

5.4. Efekti UDCA i CDCA u prevenciji nastanka patohistoloških promjena na miokardu

Za patohistološku analizu korištena je jedna polovina srca pacova. Nakon 24h fiksacije u 10% formaldehidu izvršena je obrada tkiva u tkivnom procesoru Laica TP 1020. Uzorci su kalupljeni u parafinske blokove i rezani na rezove debljine 5 μ m. Svi rezovi su obojeni klasičnim bojenjem sa hematoxilinom i eozinom. Analiza dobijeni uzoraka vršena je binokularnom mikroskopu Leica DM 6000B, opremljenog sa Leica DFC310FX kamerom na deset vidnih polja. Analizirana je vrsta i intezitet oštećenja miokrada kao i stepen inflamatorne infiltracije miokarda. Prema stepenu oštećenja miokarda promjene su skorovane u 4 grupe, score 1 bez promjena, scor 2 blago ostećenje (fokalna ostećenja miokarda ili multifokalan degenracija miokradiocita sa blagom infiltracijom), scor 3, umjereno ostećenje (izražena mifibrilarna degenercija i/ili difuzni inflamatorni proces), scor 4, značajno ostećenje (nekroza sa inflmatornim procesom), (slika 16).

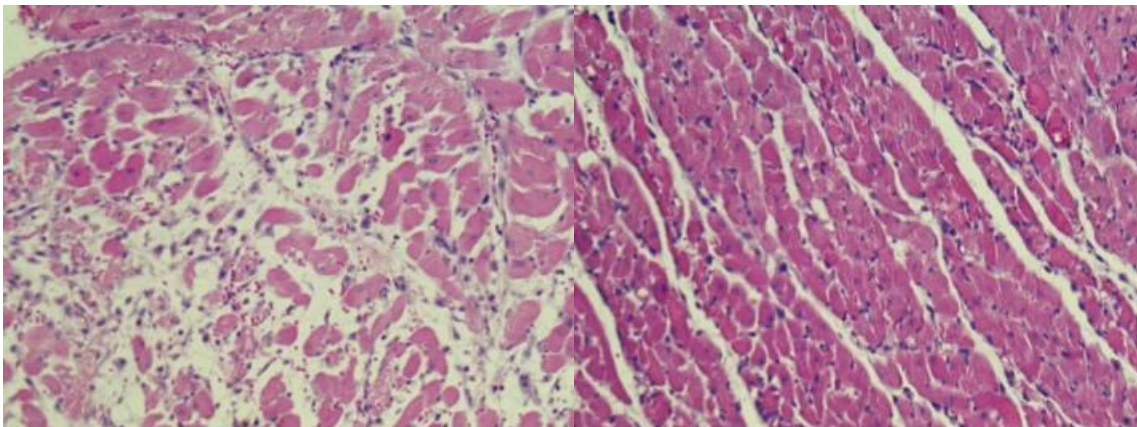
Skor 1

Skor 2



Skor 3

Skor 4



Slika 16. Histološki preparat miokarda (Autor)

Legenda: Skor 1 (PG-C), Skor 2 (CDCA I), Skor 3 (UDCA I), Skor 4 (u potpunosti očuvana normalna građa miokarda).

CDCA I - u potpunosti izmijenjena morfologija svih dijelova miokarda. Prisutna je nekroza sa izraženim inflamatornim procesom, izražen intersticijali edem, endomizijum u potpunosti ispunjen gustim infiltratom sastavljenim predominantno od neutrofila. Kardiomiociti su fragmentisani i prisutna su žarišta krvarenja.

UDCA I - Najveća oštećenja je pretrpio zid desne komore, dok je zid lijeve polovine srca većim dijelom očuvan. Izražena je miofibrilarna degeneracija na svim vidnim poljima dok su u predjelu desne komore prisutne i fokalne polimoronuklearne infiltracije.

PG-C- U području zida desne komore prisutna su fokalne infiltracije polimorfonuklearnih ćelija, fragmentacija kardiomiocita i krvarenje. U ostalim vidnim poljima uočava se multifokalna degeneracija kardiomicita.

VI. DISKUSIJA

Provedena studija je dokazala da je nivo troponina I (hsTnI) kaonajosjetljivijeg markera oštećenja miokarda značajno povećan u I grupi u odnosu na primjenu 0,9% NaCl ($p=0,029$), što je dokazalo da izoprenalin (ISO) indukuje infarkt miokarda. Infarkt miokarda izazvan ISO pokazuje mnoge metaboličke i morfološke aberacije u srčanom tkivu eksperimentalnih životinja slične onima uočenim kod infarkta miokarda kod ljudi (161). Tretman sa ISO kod eksperimentalnih životinja izaziva tipičnu ekspresiju srčanih gena sličnu onoj uočenoj kod srčane hipertrofije uzrokovane preopterećenjem pritiskom. Zbog nekoliko mehanizama koji su predloženi da se objasni oštećenje miokarda izazvano izoprenalinom, moglo bi se reći da se dešava neravnoteža između snabdjevanja i potrebe kardiomiocita kiseonikom, što je povezano sa hiperfunkcijom miokarda zbog povećanja kako hronotropizma i inotropizma, tako i hipotenzije u srčanom tkivu(162).

Drugo, u literaturi se navodi da djelovanjem izoprenalina dolazi do povećanja Ca^{++} unutar ćelije (163). Pored toga, taj jon je povezan sa aktivacijom enzima adenilat ciklaze i smanjenjem nivoa ATP u toku samog infarkta miokarda(164). Nakon primjene dolazi do povećanja oksidativnog stresa zbog nekoliko metaboličkih proizvoda koji potiču iz izoprenalina, pored geneze slobodnih radikala (165).U ovoj studiji vrijednosti D-dimera i vVF nisu pokazale značajnu razliku između grupa eksperimentalnih životinja. Pored toga studija je pokazala da su u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti fibrinogena bile značajno veće u CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,011$).

Navedeno, koje je dokazano u ovoj studiji potvrđuju i literaturni izvori u kojima se navodi da izoprenalin pokazuje kardiotsične lezije čak i pri niskim dozama, a sameproizvedene lezije zavise od doze (203). U prilog tome idu i podaci da iniske doze izoprenalina (32 $\mu\text{g}/\text{kg}$) pokazuju abnormalne histopatološke promjene već tri sata nakon injekcije (203). Umjerena doza izoprenalina (85 mg/kg) pokazuje značajne promjene u biohemijskim parametrima i umjerenu nekrozu u srcu (204). Povreda miokarda postaje ekstenzivnija sa većom dozom izoprenalina (205). Literatura potvrđuje da izoprenalin kod eksperimentalnih životinja proizvodi leziju nalik infarktu sličnu ljudskom IM (206).

Isto tako literaturni izvori dokazuju i teorijska polazišta ovog rada da izoprenalin izaziva promjene u hemodinamskim, biohemijskim, histopatološkim i markerima oksidativnog stresa, što je pokazano i samim eksperimentalnim istraživanjem sadržanim u

ovom radu(207). Detaljnije, same histopatološke promjene se mogu vidjeti u subendokardnom sloju, miokardu apeksa, lijeve komore, papilarnog mišića i interventrikularnog septuma (203,208). Takođe, prema prethodnim istraživačima, nivo srčanog troponina u serumu je kod eksperimentalnih životinja je višikada se izoprenalin daje supkutano u poređenju sa intraperitonealnim putem, pa je s tim u vezi ovaj but i izabran u toku našeg eksperimenta(209).

Adekvatnost eksperimentalne metodologije koja je primjenjivana u našem radu potvrđuju i široki literaturni dokazu u kojima se navodi da je metoda IM izazvana izoprenalinom široko korišćena u istraživanju zaštitnog efekta različitih supstanci koje mogu da spriječe oštećenje miokardne nekroze (210) kod eksperimentalnih životinja poput miševa (211) i pacova (207). Da bi se procijenio kardioprotektivni efekat pojedinih supstanci, izoprenalin se najčešće daje u dozi od 85 mg/kg dva uzastopna dana miševima i pacovima da bi se izazvaoIM (212).

Studija je dokazala da prethodni tretman sa CDCA i UDCA ublažava oštećenje kardiomiocita, ali zbog visoke standardne devijacije razlika nije bila značajna. Navedeno djelimično zbog ograničenja studije potvrđuje prvu pomoćnu hipotezu rada koja je pretpostavljala da pretretman sa UDCA i CDCA u grupama eksperimentalnih životinja koje su primale izoprenalin smanjuje vrijednosti troponina I.

Studija je pokazala da su vrijednosti homocisteina (Hcy) bile različite između grupa ($p < 0,001$). U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti homocisteina su bile značajno niže u CDCA u poređenju sa PG grupom ($p = 0,046$), dok u grupama koje nisu primale izoprenalin, nije bilo značajne razlike između grupa. Eksperimentalno je dokazano da su vrijednosti fibrinogena u grupama koje su primale izoprenalin značajno veće u CDCA u poređenju sa PG grupom ($p = 0,011$). Pored toga u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti vVF su bile značajno veće u UDCA grupi u poređenju sa CDCA grupom ($p = 0,027$), kao i PG grupom ($p < 0,001$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti vVF su bile značajno niže u CDCA u poređenju sa UDCA grupom ($p = 0,041$), kao i PG grupom ($p = 0,015$).

Značaj ispitivanja nivoa fibrinogena u plazmi u eksperimentalnim studijama je dokazana u mnogobrojnim studijama gdje se široko navodi da je serumski fibrinogen glavna determinanta agregacije trombocita i viskoziteta krvi. Literaturni izvori potvrđuju veliki značaj ispitivanja Hcy u toku ovakvih ili sličnih eksperimenata, pa se tako navodi da je

toksični efekat Hcypredstavlja rezultat sledećeg: inhibicije Na⁺, K⁺ ATPaze, oksidativnog stresa, inhibicije acetilholinesteraze, inhibicije proizvodnje gasotransmitera (NO, CO, H₂S), prekomjerne stimulacije n-metil-D-aspartata (NMDA) receptore i inhibiciju srčanog tkiva (213). Hcy se determinisan u eksperimentu kod IM izazvanog izoprenalomom može pojaviti u nekoliko oblika, uključujući miješane homocistein disulfide i s-homocisteinilirane proteine. Smanjeni oblik homocisteina čini manje od 1% ukupne Hcy. Oksidovani oblici (s-homocisteinilovani proteini i n-homocisteinilovani proteini) čine približno 80% ukupne Hcy. Prekursor n-homocisteinilovanih proteina je homocistein tiolakton (HTL), (214). U fiziološkim uslovima, koncentracija HTL je niska. Međutim, hiperhomocisteinemiju (HHcy) karakteriše veća količina HTL. Reakcija koja vodi do HHcy je katalizovana metionil-tRNA sintetazom (MetRS), (213,215). In vitro studije su pokazale da HTL prolazi kroz dvije reakcije: homocisteinilaciju proteina na ostatku lizina i enzimsku hidrolizu do Hcy pomoću hidrolitičkog enzima zavisnog od kalcijuma zvanog paraoksonaza 1 (PON1), (215,216). Povišena koncentracija Hcy kod eksperimentalnih životinja utiče na krvne sudove i može biti odgovorna za pogoršanje oštećenja zida krvnih sudova (217). U literaturi nalazimo da su endotelne ćelije osjetljive čak i na umjerene koncentracije Hcy. Povišena koncentracija Hcy može da promijeni funkcije vaskularnog endotela — njegova površina mijenja svoje karakteristike iz antikoagulantne u prokoagulantno stanje (218). HHcy aktivira faktor koagulacije V, što dovodi do oštećenja aktivacije proteina C i ekspresije trombomodulina. Povišena koncentracija Hcy smanjuje efikasnost antikoagulantnih supstanci i inhibira njihovu sintezu DNK (219). Hcy i Hcy jedinjenja takođe izazivaju depresiju kontraktilnosti srca i koronarnog protoka (220,221) i smanjuju potrošnju kiseonika (222). In vitro studija je pokazala da inkubacija izolovane arterije pacova sa Hcy oštećuje vaskularni endotel putem diskretnog ili izraženog prekida endotelne ćelije (223). Autooksidisane sulfhidrilne grupe Hci stimulišu proizvodnju ROS, što zauzvrat dovodi do deaktivacije endotelne azot monoksida (NO).

Visoke koncentracije Hcy utiču na aktivnost glutamat-cistein ligaze (ranije poznate kao gama-glutamilcistein sintetaza). Ovaj enzim je odgovoran za *de novo* sintezu glutationa (224). Shodno tome, koncentracija glutationa se smanjuje, što dovodi do smanjenja detoksikacije ROS. Kako glutation smanjuje proizvodnju ROS i stimuliše proizvodnju NO, smanjena koncentracija glutationa može, stoga, direktno i indirektno da izazove hiperkoagulabilno stanje na površini endotela (225). HHcy stimuliše proliferaciju ćelija glatkih mišića u intimi krvnih sudova (i povećavaju sintezu kolagena). To dovodi do

nepravilnog formiranja ekstracelularnog matriksa, što utiče na pojavu i pogoršanje IM(226,227). Glatke mišićne ćelije povećavaju sintezu kolagena u prisustvu Hcy. Visoke koncentracije Hcy izazivaju stanje slično upali usljed interakcije između endotelnih ćelija i neutrofila, kao i migracije neutrofila (226).

U ovoj studiji profil lipida je analiziran da bi se istražili efekti CDCA i UDCA na metabolizam lipida. Opšta statistička značajnost utvrđena je za vrijednosti LDL i TG ($p=0,037$ i $p=0,004$). U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti LDL su bile značajno veće u PG u odnosu na CDCA grupu ($p=0,046$), kao i grupu UDCA ($p=0,011$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, nije bilo značajne razlike između grupa. U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti TG su bile značajno niže u PG u odnosu na CDCA grupu ($p=0,027$), kao i grupu UDCA ($p=0,008$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, nije bilo značajne razlike između grupa. U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti LDL-a su bile značajno veće, kada je riječ o PG u poređenju sa CDCA grupom ($p=0,046$), kao i grupom UDCA ($p=0,011$). U grupama koje nisu primale izoprenalin nije bilo značajne razlike između grupa. Pored toga u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti Tgl su bile značajno niže kod grupe PG u poređenju sa grupom CDCA ($p=0,027$), kao i grupom UDCA ($p=0,008$). U grupama koje nisu primale izoprenalin nije bilo značajne razlike između grupa. Lipidi igraju važnu ulogu u IM, ne samo doprinoseći razvoju ateroskleroze, već i modifikovanjem sastava, strukture i stabilnosti ćelijske membrane. Visok nivo cirkulišućeg holesterola i njegova akumulacija u srčanom tkivu su povezani sa kardiovaskularnim oštećenjem (196). Pacovi tretirani sa ISO su pokazali značajno povećanje nivoa lipida u serumu, kao što je prikazano i u različitim studijama (197).

Generalno, mehanizam djelovanja lipolitičkih hormona, uključujući ISO, na masne ćelije posreduje cAMP kaskada, u kojoj lipolitički hormoni aktiviraju adenilat ciklazu, čime se povećava formiranje cAMP. Nakon toga, cAMP promovira lipolitičku aktivnost aktiviranjem cAMP zavisne protein kinaze, koja fosforira lipazu osjetljivu na hormone (198). Ovo dovodi do hidrolize uskladištenog triacilglicerola, što može doprineti hiperlipidemiji (199). Visoki nivoi LDL i TG su u pozitivnoj korelaciji sa IM (200). Predtretman sa CDCA i UDCA, međutim, značajno poboljšava ove promjene, čime se održava normalna fluidnost i funkcija membrane miokarda. Polifenoli se takođe mogu vezati sa žučnim kiselinama kako bi povećali njihovo izlučivanje, što je pretpostavljeno kao mogući mehanizam za snižavanje nivoa holesterola u plazmi (201).

Test reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS) je još jedan metod za otkrivanje peroksidacije lipida. Ovaj test mjeri malondialdehid (MDA), koji je podijeljeni proizvod endoperoksida nezasićenih masnih kiselina koji nastaje oksidacijom lipidnih supstrata. TBARS je kao marker peroksidacije lipida, pokazao značajno povećanje u grupi eksperimentalnih životinja koje su bile tretirane izoprenalinom ($p=0,07$), što ukazuje na učešće izoprenalina u oksidativnom stresu. Studija je dokazala da postoji značajna razlika između grupa (Kruskal-Wallisov test $p<0,001$). U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže kod grupe tretirane sa UDCA u odnosu na PG grupu ($p<0,001$), kao i kod CDCA u odnosu na PG grupu ($p=0,006$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže UDCA u poređenju sa CDCA ($p=0,024$) i PG grupom ($p=0,024$), kao i CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,024$).

U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže u UDCA u poređenju sa PG grupom ($p<0,001$), kao i CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,006$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti TBARS su bile značajno niže u UDCA u poređenju sa CDCA ($p=0,024$) i PG grupom ($p=0,024$), kao i CDCA u poređenju sa PG grupom ($p=0,024$). Navedeno potvrđuje drugu pomoćnu hipotezu prema kojoj se prepostavljalo da će se vrijednost TBARS smanjiti kod grupe eksperimentalnih životinja koje nisu primale izoprenalin. U literaturi nalazimo potvrdu da je izoproterenol (ISO) sintetički adrenergički agonist koji dovodi do oksidativnog stresa, uzrokujući značajno oštećenje miokarda. Razvoj oksidativnog stresa stvaranjem slobodnih radikala uspostavio je mehanizam patogeneze za oštećenje miokarda (228,229).

Postoji nekoliko dostupnih enzima antioksidanata kao što su GSH, CAT i SOD za prevenciju oksidativnog stresa u tkivu srca, s tim u vezi u ovoj studiji SOD, CAT i GSH su analizirani kao antioksidativna odbrana organizma. SOD, CAT i GSH su pokazali smanjenje u grupi koja je tretirana izoprenalinom. Opšta statistička značajnost (Kruskal-Wallisov test) SOD, CAT i GSH: $p=0,124$, $p=0,123$ i $p<0,001$, pokazuje značajnu razliku samo u vrijednostima GSH. Analiza je pokazala da su u grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti GSH bile značajno veće u CDCA u poređenju sa UDCA ($p=0,006$) i PG grupom ($p=0,002$). Navedeno potvrđuje treću pomoćnu hipotezu u kojoj se prepostavlja da će u grupi eksperimentalnih životinja koje su primale UDCA i CDCA doći do porasta antioksidanasa (CAT, GSH i SOD). GSH kao značajn parametar u eksperimentalnim studijama gdje se navodi da u situacijama kada je srce pod stresom kao što je slučaj sa dejstvom izoprenalona,

poremećena redoks homeostaza GSH, što se manifestuje značajnim smanjenjem sadržaja GSH i akumulacijom u miokardu.

Nekoliko kliničkih studija je otkrilo da potrošnja GSH postoji kod infarkta miokarda i lijevoj komori srca kod srčane insuficijencije(230-232). Pored toga, obrnuto redoks stanje je značajno dokazano gdje se pokazuje da je prisutna aktivnost GSH u miokardu različitih životinjskih modela sa povredama miokarda (233-236). Razlozi za ove promjene, osim viška ROS koji dovodi do povećanog iscrpljivanja GSH u kardiomiocitima, su i poremećaji u anaboličkom procesu GSH, koji izazivaju dalje smanjenje intracelularnog GSH sadržaja kod eksperimentalnih životinja. Mnoge pretkliničke studije su pokazale da je ekspresija ključnih enzima za sintezu GSH (GCL, SLC7A11, GS) i enzima povezanih sa redukcijom GSSG (G6PD, NADPH i GR) smanjena u miokardijumu izloženom patološkim faktorima, a posebno kada je riječ i o dejstvu izoprenalona(158,159,233-243). Međutim, pojačana ekspresija GGT i MRP1, koji su povezani sa γ -glutamil ciklusom, primjećena je u oštećenom miokardu (244,245).Kroz ovu studiju u grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti GSH su bile značajno veće u CDCA u poređenju sa UDCA ($p=0,026$) i PG grupom ($p=0,002$).U grupama koje su primale izoprenalin, vrijednosti GSH su bile značajno veće u CDCA u poređenju sa UDCA ($p=0,006$) i PG grupom ($p=0,002$). U grupama koje nisu primale izoprenalin, vrijednosti GSH su bile značajno veće u CDCA u poređenju sa UDCA ($p=0,026$) i PG grupom ($p=0,002$). Navedeno potvrđuje i četvrtu pomoćnu hipotezu prema kojoj se pretpostavlja da će vrijednosti GSH biti značajno više u CDCA I u odnosu na UDCA I i grupu eksperimentalnih životinja koje su primale izoprenalin.

U dijelu eksperimenta u kojem je vršena procjena BAX,TNF,NF- κ B iBLC2urađeni su jednosmjerni ANOVA, Bonferroni test i Mann-Whitney test. Dokazane su značajne razlike u poređenju sa PG-I grupom ($p < .05$, $p < 0,001$). Pored toga dokazane su značajne razlike u poređenju sa PG-C grupom ($p < 0,05$; $p < .01$; $p < .001$).U radu je potvrđena glavna hipoteza prema kojoj se davanjem henodeoksiholne (CDCA) i ursodeoksiholne (UDCA) kiseline može se uticati na vrijednosti funkcionalnih i biohemijskih pokazatelja srčane aktivnosti, kao i na stepen oštećenja tkiva srca izazvanog izoprenalinom (ISO).

U literaturi se takođe eksperimentalno i teorijski iskazuje široka potvrda značaju ispitivanja BAX,TNF,NF- κ B iBLC2 kao funkcionalnih i biohemijskih pokazatelja srčane aktivnosti, pa se navodi dageneracija perzistentno reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) zajedno sa disfunkcijom važnih antioksidativnih odbrambenih mehanizama može izazvati upalu miokarda kroz aktiviranje BAX,TNF,NF- κ B iBLC2i može pokrenuti stimulaciju pro-

apoptotičkih faktora u kardiomiocitima, koji posreduju od kaspaze zavisne i nezavisne apoptotske ćelije smrt (246). Stoga, ublažavanje oksidativnog stresa i upale, i aktivacija citoprotektivnih puteva, kao što je signalni put faktora 2 (Nrf2) povezan sa nuklearnim faktorom eritroidom 2, može biti vrijedna strategija kao dokaz za prevenciju i/ili liječenje IM i možda drugih KVB.

Zaista, Nrf2 je važan faktor nuklearne transkripcije koji reguliše redoks homeostazu aktiviranjem raznih antioksidativnih i detoksikacionih enzima (247). Nekoliko studija je pokazalo da je aktivacija Nrf2 direkto vezanih za BAX, TNF, NF- κ B i BCL2 spriječila srčanudisfunkciju i oslabila oksidativnu povredu tkiva, inflamatorne odgovore, hipertrofiju i smrt ćelija kod životinja intoksikiranih sa ISO (248-253). Višestruki dokazi pokazuju da je nekoliko jedinjenja ili supstanci pokazalo preventivna i terapijska svojstva protiv povreda srca izazvanih ISO kroz modulaciju prekomjerne proizvodnje ROS, upale i signalizacije Nrf2/heme oksigenaze-1 (HO-1), (248,249,254-256). U literaturu se dokazalo da UDCA i CDCA sprečavaju oštećenje srca izazvano sa ISO kod eksperimentalnih životinja, a kroz smanjenje oksidativnog stresa. Štaviše, UDCA i CDCA ublažavaju oštećenje miokarda izazvano ishemijom/reperfuzijom tako što smanjuju oksidativni stres i modulirao apoptotički put (114,124-126,129-131,133,134).

Nedavna istraživanja (257) potvrđuju ključnu ulogu oksidativnog stresa u aktivaciji proteina BAX, TNF, NF- κ B i BCL2, što rezultuje pro-apoptotičkim procesima u kardiomiocitima. Studije su pokazale da generacija reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), u kombinaciji sa disfunkcijom antioksidativnih sistema, može izazvati upalu miokarda i srčanu disfunkciju (258, 259). Oksidativni stres, kroz aktivaciju puta Nrf2, koji je važan faktor transkripcije povezan sa regulacijom redoks homeostaze, dokazano smanjuje oštećenje tkiva izazvano ishemijom/reperfuzijom (260). Uloga Nrf2 signalizacije direktno je povezana sa regulacijom BAX, TNF i NF- κ B, a aktivacija ovog puta smanjuje oksidativnu povredu i upalne procese u srcu, čime se ublažava hipertrofija i smrt ćelija izazvana isoprenalinom kod eksperimentalnih životinja (261). Osim toga, nekoliko jedinjenja koja djeluju putem Nrf2 puta, kao što su ursodeoksiholna (UDCA) i kenodeoksiholna kiselina (CDCA), pokazala su zaštitni učinak na srce smanjenjem oksidativnog stresa (262). UDCA i CDCA takođe moduliraju apoptotičke puteve, što dodatno smanjuje oštećenje miokarda kod ishemije/reperfuzije (263, 264). Zbog ovih dokaza, Nrf2/HO-1 signalizacija se sve više prepoznaje kao vrijedna strategija za prevenciju i liječenje ishemijskih bolesti srca (265, 266).

VII. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata eksperimentalne studije, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Pretretman sa ursodeoksiholnom (UDCA) i henodeoksiholnom (CDCA) kiselinom značajno smanjuje vrijednosti visoko osjetljivog troponina I, markera oštećenja srčanog tkiva, što ukazuje na njihovu sposobnost zaštite kardiomiocita.
2. UDCA i CDCA efikasno smanjuju oksidativni stres, čime se smanjuju vrijednosti reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS), što direktno doprinosi očuvanju srčanog tkiva i sprječava dodatno oštećenje.
3. UDCA i CDCA pokazuju sposobnost ublažavanja upalnih procesa u srcu, djelovanjem na ključne upalne i apoptotičke puteve, čime sprečavaju progresiju oštećenja srčanog mišića.
4. Javlja se porast antioksidativnih enzima, uključujući katalazu (CAT), glutation (GSH) i superoksid dismutazu (SOD), što potvrđuje citoprotektivni učinak ovih kiselina i njihovu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa.
5. Henodeoksiholna kiselina (CDCA) pokazuje izraženiji efekat u povećanju nivoa glutationa (GSH) u poređenju sa UDCA, što dodatno pojačava njenu ulogu u smanjenju oksidativnog oštećenja srčanog tkiva.
6. Aktivacija antioksidativnih enzima i smanjenje oksidativnog stresa direktno doprinosi sprječavanju apoptoze kardiomiocita, čime se održava integritet srčanog mišića.
7. UDCA pokazuje značajno očuvanje miokarda u poređenju sa CDCA, pri čemu su najveća oštećenja zabilježena u zidu desne komore, dok je zid lijeve komore većim dijelom očuvan, dok CDCA dovodi do potpune izmjene morfologije miokarda sa izraženom nekrozom i inflamatornim procesom.
8. Primjena CDCA i ursodeoksiholne UDCA kiseline može značajno uticati na smanjenje oštećenja srca izazvanog izoprenalinom, djelujući kroz modulaciju funkcionalnih i biohemijskih pokazatelja srčane aktivnosti, uključujući BAX, TNF, NF- κ B i BCL2, dok aktivacija Nrf2 puta pokazuje potencijal kao efikasna strategija za prevenciju i liječenje srčanih oboljenja povezanih sa oksidativnim stresom.

VIII. LITERATURA

1. Nohria R, Viera AJ. Acute Coronary Syndrome: Diagnosis and Initial Management. *Am Fam Physician*. 2024 Jan;109(1):34-42.
2. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes: Developed by the task force on the management of acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2023;44(38):3720–3826. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad191>.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J* 2019;40:237–269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>
4. Nolan JP, Soar J, Zideman AD, Biarent D, Bossaert LL, Deakin C, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010. *Resuscitation*. 2010;81:1219-76.
5. Pavlović P, Tavčioski D, Stamenković E. Agregacija trombocita, disfunkcija endotela i akutni infarkt miokarda. *Vojnosan Preg* 2009;66(4):323-27.
6. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the ACS. *Circulation* 2001;104:365-7.
7. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392:1736–1788. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32203-7)
8. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J* 2022;43:716–799. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab892>
9. Boarescu PM, Chirilă I, Bulboacă AE, Bocșan IC, Pop RM, Gheban D, et al. Effects of curcumin nanoparticles in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:7847142. <https://doi.org/10.1155/2019/7847142>.
10. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016;119(1):91-112.

11. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53(1):31–47.
12. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2011;301:H2181–H2190.
13. Tahhan A.S., Sandesara P.B., Hayek S.S., Alkholder A., Chivukula K., Hammadah M., Mohamed-Kelli H., O’Neal W.T., Topel M., Ghasemzadeh N., et al. Association between oxidative stress and atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2017;14:1849–1855.
14. Baradaran A., Nasri H., Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J. Res. Med. Sci.* 2014;19:358–367.
15. Kattoor A.J., Pothineni N.V.K., Palagiri D., Mehta J.L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2017;19:42.
16. Liochev S.I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2013;60:1–4.
17. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>.
18. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011;194:7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>.
19. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120:483–495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>.
20. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
21. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013;1830:3217–3266.
22. Van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress In heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(4):425–35.
23. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 2007;49(2):241–8.
24. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 2009;50(9):1721–34.
25. Benjamin, E.J.; Blaha, M.J.; Chiuve, S.E.; Cushman, M.; Das, S.R.; Deo, R.; de Ferranti, S.D.; Floyd, J.; Fornage, M.; Gillespie, C.; et al. Heart Disease and Stroke

- Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2017, 135, e146–e603.
26. Al Hariri, M.; Zibara, K.; Farhat, W.; Hashem, Y.; Soudani, N.; Al Ibrahim, F.; Hamade, E.; Zeidan, A.; Husari, A.; Kobeissy, F. Cigarette smoking-induced cardiac hypertrophy, vascular inflammation and injury are attenuated by antioxidant supplementation in an animal model. *Front. Pharmacol.* 2016, 7, e397.
 27. Dikalov, S.; Itani, H.; Richmond, B.; Vergeade, A.; Rahman, S.M.J.; Boutaud, O.; Blackwell, T.; Massion, P.P.; Harrison, D.G.; Dikalova, A. Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 2019, 316, H639–H646.
 28. Gupta, S.C.; Hevia, D.; Patchva, S.; Park, B.; Koh, W.; Aggarwal, B.B. Upsides and downsides of reactive oxygen species for Cancer: The roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox Signal* 2012, 16, 1295–1322.
 29. Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* 2014, 94, 909–950.
 30. Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D.; et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* 2018, 13, 757–772.
 31. Sharifi-Rad, M.; Kumar, N.V.A.; Zucca, P.; Varoni, E.M.; Dini, L.; Panzarini, E.; Rajkovic, J.; Fokou, P.V.T.; Azzini, E.; Peluso, I.; et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* 2020, 11, 694.
 32. Dubois-Deruy, E.; Cuvelliez, M.; Fiedler, J.; Charrier, H.; Mulder, P.; Hebbar, E.; Pfanne, A.; Beseme, O.; Chwastyniak, M.; Amouyel, P.; et al. MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1–10.
 33. Strassburger, M.; Bloch, W.; Sulyok, S.; Schüller, J.; Keist, A.F.; Schmidt, A.; Wenk, J.; Peters, T.; Wlaschek, M.; Krieg, T.; et al. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, 38, 1458–1470.
 34. Li, X.; Lin, Y.; Wang, S.; Zhou, S.; Ju, J.; Wang, X.; Chen, Y.; Xia, M. Extracellular Superoxide Dismutase Is Associated With Left Ventricular Geometry and Heart

- Failure in Patients with Cardiovascular Disease. *J. Am. Heart Assoc.* 2020, 9, e016862.
35. Tehrani, H.S.; Moosavi-Movahedi, A.A. Catalase and its mysteries. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2018, 140, 5–12.
 36. Detienne, G.; De Haes, W.; Mergan, L.; Edwards, S.L.; Temmerman, L.; Van Bael, S. Beyond ROS clearance: Peroxiredoxins in stress signaling and aging. *Ageing Res. Rev.* 2018, 44, 33–48.
 37. Kuzuya K, Ichihara S, Suzuki Y, Inoue C, Ichihara G, Kurimoto S, Oikawa S. Proteomics analysis identified peroxiredoxin 2 involved in early-phase left ventricular impairment in hamsters with cardiomyopathy. *PLoS One.* 2018;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192624>.
 38. Ibarrola J, Arrieta V, Sádaba R, Martínez-Martínez E, García-Peña A, Álvarez V, et al. Galectin-3 down-regulates antioxidant peroxiredoxin-4 in human cardiac fibroblasts: A new pathway to induce cardiac damage. *Clin Sci (Lond).* 2018;132:1471–1485. <https://doi.org/10.1042/CS20180263>.
 39. Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, et al. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *J Proteome Res.* 2008;7:5004–5016. <https://doi.org/10.1021/pr8003586>.
 40. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013, 1, 244–257.
 41. Park, T.J.; Park, J.H.; Lee, G.S.; Lee, J.Y.; Shin, J.H.; Kim, M.W.; Kim, Y.S.; Kim, J.Y.; Oh, K.J.; Han, B.S.; et al. Quantitative proteomic analyses reveal that GPX4 downregulation during myocardial infarction contributes to ferroptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Dis.* 2019, 10, 835.
 42. Tsutsui, H.; Kinugawa, S.; Matsushima, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc. Res.* 2008, 81, 449–456.
 43. Karimi Galougahi K, Antoniades C, Nicholls SJ, Channon KM, Figtree GA. Redox biomarkers in cardiovascular medicine. *Eur Heart J* 2015;36:1576–1582
 44. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H2181-2190.
 45. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The

- Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:891–975. <https://doi.org/10.1002/ejhf.592>.
46. Wolfram R, Oguogho A, Palumbo B, Sinzinger H. Enhanced oxidative stress in coronary heart disease and chronic heart failure as indicated by an increased 8-epi-PGF 2 α . *Eur J Heart Fail* 2005;7:167–172.
 47. Sato Y, Fujiwara H, Takatsu Y. Cardiac troponin and heart failure in the era of high-sensitivity assays. *J Cardiol* 2012;60:160–167.
 48. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* 2007;49:241–248.
 49. Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63:185–195.
 50. Feng Y, Chao W. Toll-like receptors and myocardial inflammation. *Int J Inflamm.* 2011;2011:170352.
 51. Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res.* 2008;102:257–264.
 52. Oyama J, Blais C, Jr, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004;109:784–789.
 53. Kim SC, Ghanem A, Stapel H, et al. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol.* 2007;7:5.
 54. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2011;123:594–604.
 55. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J.* 2014;55:101–105.
 56. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 2011;41:1203–1217.
 57. Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2013;99:164–174.

58. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:19725–19730.
59. Calabro P, Golia E, Yeh ET. CRP and the risk of atherosclerotic events. *Semin Immunopathol*. 2009;31:79–94.
60. Orn S, Breland UM, Mollnes TE, et al. The chemokine network in relation to infarct size and left ventricular remodeling following acute myocardial infarction. *Am J Cardio*. 2009;104:1179–1183.
61. Gonzalez-Quesada C, Frangiannis NG. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes. *Curr Atheroscler Rep*. 2009;11:131–138.
62. Steppich BA, Moog P, Matissek C, et al. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis*. 2007;190:443–451.
63. Postadzhiyan AS, Tzontcheva AV, Kehayov I, et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. *Clin Biochem*. 2008;41:126–133.
64. Liu WH, Yang CH, Yeh KH, et al. Circulating levels of soluble P-selectin in patients in the early and recent phases of myocardial infarction. *Chang Gung Med J*. 2005;28:613–620.
65. Luc G, Arveiler D, Evans A, et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis*. 2003;170:169–176.
66. Nunez J, Nunez E, Bodi V, et al. Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardio*. 2008;101:747–752.
67. Wettinger SB, Doggen CJ, Spek CA, et al. High throughput mRNA profiling highlights associations between myocardial infarction and aberrant expression of inflammatory molecules in blood cells. *Blood*. 2005;105:2000–2006.
68. Guasti L, Dentali F, Castiglioni L, et al. Neutrophils and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularisation. A systematic review on more than 34,000 subjects. *Thromb Haemost*. 2011;106:591–599.

69. Lacraz S, Isler P, Vey E, et al. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem.* 1994;269:22027–22033.
70. Bauters A, Ennezat PV, Tricot O, et al. Relation of admission white blood cell count to left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction. *Am J Cardio.* 2007;100:182–184.
71. Aoki S, Nakagomi A, Asai K, et al. Elevated peripheral blood mononuclear cell count is an independent predictor of left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *J Cardio.* 2011;57:202–207.
72. Fang L, Du XJ, Gao XM, et al. Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction. *Clin Sci.* 2010;119:175–183.
73. Mariani M, Fetiveau R, Rossetti E, et al. Significance of total and differential leucocyte count in patients with acute myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty. *Eur Heart J.* 2006;27:2511–2515.
74. Hong YJ, Jeong MH, Ahn Y, et al. Relationship between peripheral monocytosis and nonrecovery of left ventricular function in patients with left ventricular dysfunction complicated with acute myocardial infarction. *Circ J.* 2007;71:1219–1224.
75. Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, et al. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:241–246.
76. Schirone L., Forte M., Palmerio S., et al. A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017;2017:3920195.
77. Florea V.G., Cohn J.N. The autonomic nervous system and heart failure. *Circ. Res.* 2014;114(11):1815–1826.
78. Cohn J.N., Ferrari R., Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000;35(3):569–582.
79. Mehta P.K., Griendling K.K. Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;292(1):C82–C97.

80. Johar S., Cave A.C., Narayanapanicker A., Grieve D.J., Shah A.M. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J.* 2006;20(9):1546–1548.
81. Delcayre C., Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002;34(12):1577–1584.
82. Billet S., Aguilar F., Baudry C., Clauser E. Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. *Kidney Int.* 2008;74(11):1379–1384.
83. Ferrario C.M. Cardiac remodelling and RAS inhibition. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2016;10(3):162–171.
84. Carnegie G.K., Means C.K., Scott J.D. A-kinase anchoring proteins: From protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life.* 2009;61(4):394–406.
85. Carnegie G.K., Burmeister B.T. A-kinase anchoring proteins that regulate cardiac remodeling. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011;58(5):451–458.
86. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J. miRBase: MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D140–D144.
87. Doetschman T., Azhar M. Cardiac-specific inducible and conditional gene targeting in mice. *Circ. Res.* 2012;110(11):1498–1512.
88. Lin Z., Murtaza I., Wang K., Jiao J., Gao J., Li P.F. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(29):12103–12108.
89. Oury C., Servais L., Bouznad N., Hego A., Nchimi A., Lancellotti P. MicroRNAs in valvular heart diseases: Potential role as markers and actors of valvular and cardiac remodeling. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(7):E1120.
90. Wang J., Liew O.W., Richards A.M., Chen Y.T. Overview of microRNAs in cardiac hypertrophy, fibrosis, and apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(5):E749.
91. Mattiazzi A., Bassani R.A., Escobar A.L., et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015;308(10):H1177–H1191.
92. Grimm M., Brown J.H. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: Role of CaMKII. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;48(2):322–330.

93. Singh M.V., Kapoun A., Higgins L., et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II triggers cell membrane injury by inducing complement factor B gene expression in the mouse heart. *J. Clin. Invest.* 2009;119(4):986–996.
94. Singh M.V., Anderson M.E. Is CaMKII a link between inflammation and hypertrophy in heart? *J. Mol. Med. (Berl.)* 2011;89(6):537–543.
95. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009;1(6):a001651.
96. Frantz S., Fraccarollo D., Wagner H., et al. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2003;57(3):749–756.
97. Gaspar-Pereira S., Fullard N., Townsend P.A., et al. The NF-kappaB subunit c-Rel stimulates cardiac hypertrophy and fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2012;180(3):929–939.
98. Barrasa JI, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J. Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(2):964-77.
99. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *J Cell Death.* 2016;9:19-29.
100. Fesik S. W., Shi Y. Controlling the caspases. *Science.* 2001;294(5546):1477–1478.
101. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *J Cell Death.* 2016;9:19-29.
102. Stankov K, Bogdanovic G, Stankov S, Draskovic D, Grubor-Lajsic G, SpasicM, et al. Expression analysis of genes involved in apoptosis, proliferation and endoplasmic reticulum stress in ionomycin/PMA treated Jurkat cells. *J BUON.* 2012;17(2):369-76.
103. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life sci.* 2013;7(3-4):112-22.
104. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009;15(14):1677-89.
105. Masubuchi N, Sugihara M, Sugita T, Amano K, Nakano M, Matsuura T. Oxidative stress markers, secondary bile acids and sulfated bile acids classify the clinical liver injury type: Promising diagnostic biomarkers for cholestasis. *Chem Biol Interact.* 2016;255:8391.

106. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci*. 2011;121(12):523-44.
107. Rodrigues CM, Sola S, Sharpe JC, Moura JJ, Steer CJ. Tauroursodeoxycholic acid prevents Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C release in isolated mitochondria. *Biochemistry*. 2003;42(10):3070-80.
108. Azzaroli F, Mehal W, Soroka CJ, Wang L, Lee J, Crispe IN, et al. Ursodeoxycholic acid diminishes Fas-ligand-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology*. 2002;36(1):49-54.
109. Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The unexpected uses of urso- and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. *Glob Adv HealthMed*.
110. Hagey L.R., Crombie D.L., Espinosa E., Carey M.C., Igimi H., Hofmann A.F. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: Biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J. Lipid. Res*. 1993;34:1911–1917.
111. Hofmann A.F. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scand. J. Gastroenterol*. 1994;204:S1–S15.
112. Nie B., Park H.M., Kazantzis M., Lin M., Henkin A., Ng S., Song S., Chen Y., Tran H., Lai R., et al. Specific bile acids inhibit hepatic fatty acid uptake. *Hepatology*. 2012;24.
113. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*. 2009;15:1677–1689. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1677>.
114. Schiedermaier P., Hansen S., Asdonk D., Brensing K., Sauerbruch T. Effects of ursodeoxycholic acid on splanchnic and systemic hemodynamics. A double-blind, cross-over, placebo-controlled study in healthy volunteers. *Digestion*. 2000;61:107–112.
115. Fedorowski T., Salen G., Tint G.S., Mosbach E. Transformation of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid by human intestinal bacteria. *Gastroenterology*. 1979;77:1068–1073.
116. Bazzoli F., Fromm H., Sarva R.P., Sembrat R.F., Ceryak S. Comparative formation of lithocholic acid from chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids in the colon. *Gastroenterology*. 1982;83:753–760.

117. Thistle JL, Larusso NF, Hofmann AF, Turcotte J, Carlson GL, Ott BJ. Differing effects of ursodeoxycholic or chenodeoxycholic acid on biliary cholesterol saturation and bile acid metabolism in man. A dose-response study. *Dig Dis Sci.* 1982;27:161–168. <https://doi.org/10.1007/BF01296842>.
118. Angulo P. Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2002;4:37–44.
119. Guyot C, Combe C, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmoulière A. Fibrogenic cell fate during fibrotic tissue remodeling observed in rat and human cultured liver slices. *J Hepatol.* 2007;46:142–150. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.07.021>.
120. Hansell C., Nibbs R. Professional and part-time chemokine decoys in the resolution of inflammation. *Sci. STKE.* 2007;384:pe18.
121. Brenner D.A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2009;120:361–368.
122. Bakkenist C.J., Kastan M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimmer dissociation. *Nature.* 2003;421:499–506.
123. Jung D., Alt F.W. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell.* 2004;116:299–311.
124. Braig M., Schmitt C.A. Oncogene-induced senescence: Putting the brakes on tumor development. *Cancer Res.* 2006;66:2881–2884.
125. Campisi J., d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007;8:729–740.
126. Lynch MD. How does cellular senescence prevent cancer? *DNA Cell Biol.* 2006;25:69–78. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.25.69>.
127. Li M.O., Sarkisian M.R., Mehal W.Z., Rakic P., Flavell R.A. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science.* 2003;302:1560–1563.
128. Powell A.A., Akare S., Qi W., Herzer P., Jean-Louis S., Feldman R.A., Martinez J.D. Resistance to ursodeoxycholic acid-induced growth arrest can also result in resistance to deoxycholic acid-induced apoptosis and increased tumorigenicity. *BMC Cancer.* 2006;6 doi: 10.1186/1471-2407-6-219.
129. Solá S., Aranha M.M., Steer C.J., Rodrigues C.M. Game and players: Mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2007;9:123–138.

130. Castro R.E., Amaral J.D., Solá S., Kren B.T., Steer C.J., Rodrigues C.M. Differential regulation of cyclin D1 and cell death by bile acids in primary rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007;293:G327–G334.
131. Sola S., Ma X., Castro R.E., Kren B.T., Steer C.J., Rodrigues C.M. Ursodeoxycholic acid modulates E2F-1 and p53 expression through a caspase-independent mechanism in transforming growth factor beta1-induced apoptosis of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2003;278:48831–48838.
132. Im E, Martinez JD. Ursodeoxycholic acid (UDCA) can inhibit deoxycholic acid (DCA)-induced apoptosis via modulation of EGFR/Raf-1/ERK signaling in human colon cancer cells. *J Nutr.* 2004;134:483–486. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.483>.
133. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med.* 1998;4:165–178. <https://doi.org/10.1007/BF03401650>.
134. Koh H, Lee KH, Kim D, Kim S, Kim JW, Chung J. Inhibition of Akt and its anti-apoptotic activities by tumor necrosis factor-induced protein kinase C-related kinase 2 (PRK2) cleavage. *J Biol Chem.* 2000;275:34451–34458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003313200>.
135. Akare S., Jean-Louis S., Chen W., Wood D.J., Powell A.A., Martinez J.D. Ursodeoxycholic acid modulates histone acetylation and induces differentiation and senescence. *Int. J. Cancer.* 2006;119:2958–2969.
136. Rodrigues C.M., Fan G., Ma X., Kren B.T., Steer C.J. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.* 1998;101:2790–2799.
137. Perez MJ, Velasco E, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. Maternal ethanol consumption during pregnancy enhances bile acid-induced oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver. *Toxicology.* 2006;225:183–194.
138. Mitsuyoshi H, Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Inaba K, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:537–542.

139. Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Ursodeoxycholic acid suppresses extent of lipid peroxidation in diseased liver in experimental cholestatic liver disease. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1921–1928.
140. Rodríguez-Ortigosa CM, Cincu RN, Sanz S, Ruiz F, Quiroga J, Prieto J. Effect of ursodeoxycholic acid on methionine adenosyltransferase activity and hepatic glutathione metabolism in rats. *Gut.* 2002;50:701–706.
141. Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M, Bomzon A. Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut.* 1996;39:475–478.
142. Fiorucci S, Zampella A, Cirino G, Bucci M, Distrutti E. Decoding the vasoregulatory activities of bile acid-activated receptors in systemic and portal circulation: role of gaseous mediators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;312:H21–H32.
143. He F, Li J, Mu Y, Kuruba R, Ma Z, Wilson A, Alber S, Jiang Y, Stevens T, Watkins S, Pitt B, Xie W, Li S. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 2006;98:192–199.
144. Natalini B, Sardella R, Gioiello A, Ianni F, Di Michele A, Marinozzi M. Determination of bile salt critical micellization concentration on the road to drug discovery. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;87:62-81.
145. Vaz FM, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2017;56:10-24.
146. Nakagawa M, Setchell KD. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res.* 1990;31(6):1089-98.
147. Salen G, Shefer S, Cheng FW, Dayal B, Batta AK, Tint GS. Cholic acid biosynthesis: the enzymatic defect in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest.* 1979;63(1):38-44.
148. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009;50:1955–1966.
149. Fiorucci S, Distrutti E. Bile acid-activated receptors, intestinal microbiota, and the treatment of metabolic disorders. *Trends Mol Med.* 2015;21:702–714.
150. Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S. Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30:570–580.

151. Fiorucci S, Zampella A, Cirino G, Bucci M, Distrutti E. Decoding the vasoregulatory activities of bile acid-activated receptors in systemic and portal circulation: role of gaseous mediators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312(1):21-32.
152. Sepe V, Distrutti E, Fiorucci S, Zampella A. Farnesoid X receptor modulators (2011 - 2014): a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(8):885-96.
153. Vaquero J, Monte MJ, Dominguez M, Muntane J, Marin JJ. Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(7):926-39.
154. Li J, Wilson A, Kuruba R, Zhang Q, Gao X, He F, Zhang LM, Pitt BR, Xie WLi S. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2008;77:169–177.
155. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:821–861.
156. Copple BL, Li T. Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. *Pharmacol Res*. 2016;104:9-21.
157. Li S, Ni A, Feng GS. Bridging cell surface receptor with nuclear receptors in control of bile acid homeostasis. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(1):113-8.
158. Dong P, Liu K, Han H. The Role of NF- κ B in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Curr Protein Pept Sci*. 2022;23(8):535-547.
159. Mustapha S, Kirshner A, De Moissac D, Kirshenbaum LA. A direct requirement of nuclear factor-kappa B for suppression of apoptosis in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279.
160. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:1229–1235.
161. Misra A, Haudek SB, Knuefermann P, Vallejo JG, Chen ZJ, Michael LH, Sivasubramanian N, Olson EN, Entman ML, Mann DL. Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation*. 2003; 108:3075–3078.
162. Chandrasekar B, Freeman GL. Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett*. 1997; 401:30–34.

163. Hamid T, Guo SZ, Kingery JR, Xiang X, Dawn B, Prabhu SD. Cardiomyocyte NF- κ B p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2011; 89:129–138.
164. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell.* 2008; 132:344–362.
165. de Moissac D, Mustapha S, Greenberg AH, Kirshenbaum LA. Bcl-2 activates the transcription factor NF κ B through the degradation of the cytoplasmic inhibitor I κ B α . *J Biol Chem.* 1998; 273:23946–23951.
166. de Moissac D, Zheng H, Kirshenbaum LA. Linkage of the BH4 domain of Bcl-2 and the nuclear factor κ B signaling pathway for suppression of apoptosis. *J Biol Chem.* 1999; 274:29505–29509.
167. Timmers L, van Keulen JK, Hoefler IE, Meijs MFL, van Middelaar B, den Ouden K, van Echteld CJA, Pasterkamp G, de Kleijn DPV. Targeted deletion of nuclear factor κ B p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. *Circ Res.* 2009; 104:699–706.
168. Santos DGB, Resende MF, Mill JG, Mansur AJ, Krieger JE, Pereira AC. Nuclear Factor (NF) κ B polymorphism is associated with heart function in patients with heart failure. *BMC Med Genet.* 2010; 11:89.
169. Kratsios P, Huth M, Temmerman L, Salimova E, Al Banchaabouchi M, Sgoifo A, Manghi M, Suzuki K, Rosenthal N, Mourkioti F. Antioxidant amelioration of dilated cardiomyopathy caused by conditional deletion of NEMO/IKK γ in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2010; 106:133–144.
170. Regula KM, Baetz D, Kirshenbaum LA. Nuclear factor- κ B represses hypoxia-induced mitochondrial defects and cell death of ventricular myocytes. *Circulation.* 2004; 110:3795–3802.
171. Baetz D, Regula KM, Ens K, Shaw J, Kothari S, Yurkova N, Kirshenbaum LA. Nuclear factor- κ B-mediated cell survival involves transcriptional silencing of the mitochondrial death gene BNIP3 in ventricular myocytes. *Circulation.* 2005; 112:3777–3785.
172. Yurkova N, Shaw J, Blackie K, Weidman D, Jayas R, Flynn B, Kirshenbaum LA. The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes. *Circ Res.* 2008; 102:472–479.

173. Shaw J, Yurkova N, Zhang T, Gang H, Aguilar F, Weidman D, Scramstad C, Weisman H, Kirshenbaum LA. Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:20734–20739.
174. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*. 1996; 93:704–711.[LinkGoogle Scholar](#)
175. Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Feldman AM, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2005; 66:520–529.
176. Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan YT, Prabhu SD. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation. *Circulation*. 2009; 119:1386–1397.[LinkGoogle Scholar](#)
177. Wu H, Lozano G. NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem*. 1994; 269:20067–20074.
178. Meeran Nagoor M, Jagadeesh G, Selvaraj P. Catecholamine toxicity triggers myocardial membrane destabilization in rats: thymol and its counter action. *RSC Adv*. 2015;5:43338–44.
179. Afroz R, Tanvir EM, Karim N, Hossain MS, Alam N, Gan SH, et al. Sundarban Honey Confers Protection against Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Wistar Rats. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1–10.
180. Lobo Filho H, Ferreira N, Sousa R, Carvalho E, Lobo P, Lobo Filho J. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011;26(3):469-76.
181. Duong H, Masarweh OM, Campbell G, Win TT, Joolhar F. Isoproterenol causing coronary vasospasm and ST elevations during tilt table testing. *J Investig Med High Impact Case Reports* 2020;8:1–4.
182. Wang Q., Yu X., Xu H., Jiang Y., Zhao X., Sui D. Ginsenoside re attenuates isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2018. 1–8.

183. Hosseini A, Ghorbani A, Alavi MS, Forouhi N, Rajabian A, Boroumand-Noughabi S, Sahebkar A, Eid AH. *Front. Pharmacol.* 2023;14:1305816. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1305816>.
184. Shiny KS, Kumar SH, Farvin KH, Anandan R, Devadasan K. Protective effect of taurine on myocardial antioxidant status in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57:1313–1317. <https://doi.org/10.1211/0022357027204>.
185. Meena B, Anbu Rajan L, Anandan R. Protective effect of betaine on protein, glycoproteins and amino acids in isoprenaline-induced myocardial infarction in albino rats. *Biomed Prev Nutr* 2014; 4:403-409.
186. Tang YN, He XC, Ye M, Huang H, Chen HL, Peng WL, et al. Cardioprotective effect of total saponins from three medicinal species of *Dioscorea* against isoprenaline-induced myocardial ischemia. *J Ethnopharmacol.* 2015;175:451–455.
187. Webster KA, Discher DJ, Kaiser S, et al. Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J Clin Invest* 1999;104:239–52.
188. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7834–7838. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7834>.
189. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:1506–12.
190. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, et al. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6961–5.
191. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609–19.
192. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 1996;226:316–27.

193. Matsushita K, Umezawa A, Iwanaga S, et al. The EAT/mcl-1 gene, an inhibitor of apoptosis, is up-regulated in the early stage of acute myocardial infarction. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:471–8.
194. Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *Journal of Gene Medicine* 2000;2:326–33.
195. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 2000;45:651–60.
196. Salter A. M., White D. A. Effects of dietary fat on cholesterol metabolism: regulation of plasma LDL concentrations. *Nutrition Research Reviews*. 1996;9(1):241–257.
197. Gesquière L., Loreau N., Minnich A., Davignon J., Blache D. Oxidative stress leads to cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(1-2):134–145.
198. Morimoto C., Kiyama A., Kameda K., Ninomiya H., Tsujita T., Okuda H. Mechanism of the stimulatory action of okadaic acid on lipolysis in rat fat cells. *The Journal of Lipid Research*. 2000;41(2):199–204.
199. Radhiga T., Rajamanickam C., Senthil S., Pugalendi K. V. Effect of ursolic acid on cardiac marker enzymes, lipid profile and macroscopic enzyme mapping assay in isoproterenol-induced myocardial ischemic rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(11):3971–3977.
200. Buring J. E., O'Connor G. T., Goldhaber S. Z., et al. Decreased HDL2 and HDL3 cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and increased risk of myocardial infarction. *Circulation*. 1992;85(1):22–29.
201. Ngamukote S., Mäkynen K., Thilawech T., Adisakwattana S. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. *Molecules*. 2011;16(6):5054–5061.
202. Gil D, Rodriguez J, Ward B, Vertegel A, Ivanov V, Reukov V. Antioxidant activity of SOD and catalase conjugated with nanocrystalline ceria. *Bioengineering*. 2017;4:18. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4010018>.
203. Zhang J, Knapton A, Lipshultz SE, Weaver JL, Herman EH. Isoproterenol-induced cardiotoxicity in Sprague-Dawley rats: correlation of reversible and irreversible myocardial injury with release of cardiac troponin T and roles of iNOS in

- myocardial injury. *Toxicol Pathol.* 2008;36(2):277–278.
<https://doi.org/10.1177/0192623307312967>.
204. Peer PA, Trivedi PC, Nigade PB, Ghaisas MM, Deshpande AD, Goel RK. Cardioprotective effect of *Azadirachta indica* A. Juss. on isoprenaline induced myocardial injury. *Int J Cardiol.* 2008;126(1):123–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.06.061>.
205. Ribeiro D, Buttros J, Oshima C, Bergamaschi C, Campos R, Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by Isoproterenol in rats: role of nitric oxide synthase production *J Mol Histol* 2009 40(2):99-105.
206. Rona G, Kahn DS, Chappel CL. Study on the healing of cardiac necrosis in the rat. *Am J Pathol.* 1961;39(4):473–489.
207. Shikalgar TS, Naikwade NS. Evaluation of cardioprotective activity of fulvic acid against isoproterenol induced oxidative damage in rat myocardium. *Int Res J Pharm.* 2018;9(1):71–80. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.09112>.
208. Hasić S, Jadrić R, Kiseljaković E, Mornjaković Z, Winterhalter-Jadrić M, Troponin T And Histological characteristics of rat myocardial infarction induced by isoproterenol *Bosn J Basic Med Sci* 2007 7(73):212-17.
209. Brady S, York M, Scudamore C, Williams T, Griffiths W, Turton J. Cardiac Troponin I in isoproterenol-induced cardiac injury in the Hanover Wistar rat: studies on low dose levels and routes of administration. *Toxicol Pathol.* 2010;38(2):287–291. <https://doi.org/10.1177/0192623310380371>.
210. Upaganlawa A, Gandhi H, Balaraman R, Isoproterenol induced myocardial infarction: protective role of natural products *J Pharmacol Toxicol* 2011 6(1):1-17.
211. Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med.* 2009;59(4):339–343.
212. Hassan MQ, Akhtar M, Ahmed S, Ahmad A, Najmi AK. *Nigella sativa* protects against isoproterenol-induced myocardial infarction by alleviating oxidative stress, biochemical alterations and histological damage. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017;7(4):294–299. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.012>.
213. Djuric, D.; Jakovljevic, V.; Zivkovic, V.; Srejovic, I. Homocysteine and homocysteine-related compounds: An overview of the roles in the pathology of the

- cardiovascular and nervous systems. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2018, 96, 991–1003.
214. Chubarov, A.S. Homocysteine thiolactone: Biology and chemistry. *Encyclopedia* 2021, 1, 445–459.
215. Jakubowski, H. Homocysteine modification in protein structure / function and human disease. *Physiol. Rev.* 2019, 99, 555–604.
216. Perła-Kaján, J.; Włoczkowska, O.; Zioła-Frankowska, A.; Frankowski, M.; Smith, A.D.; De Jager, C.A.; Refsum, H.; Jakubowski, H. Paraoxonase 1, B vitamins supplementation, and mild cognitive impairment. *J. Alzheimer's Dis.* 2021, 81, 1211–1229.
217. Sreckovic, B.; Sreckovic, V.D.; Soldatovic, I.; Colak, E.; Sumarac-Dumanovic, M.; Janeski, H.; Janeski, N.; Gacic, J.; Mrdovic, I. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 2017, 11, 179–182.
218. Jacobsen, D.W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin. Chem.* 1998, 44, 1833–1843.
219. Lentz, S.R.; Piegors, D.J.; Fernández, J.A.; Erger, R.A.; Arning, E.; Malinow, M.R.; Griffin, J.H.; Bottiglieri, T.; Haynes, W.G.; Heistad, D.D. Effect of hyperhomocysteinemia on protein C activation and activity. *Blood* 2002, 100, 2108–2112.
220. Zivkovic, V.; Jakovljevic, V.; Djordjevic, D.; Vuletic, M.; Barudzic, N.; Djuric, D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 2012, 370, 59–67.
221. Zivkovic, V.; Jakovljevic, V.; Pechanova, O.; Srejsovic, I.; Joksimovic, J.; Selakovic, D.; Barudzic, N.; Djuric, D.M. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: The role of different gasotransmitters. *BioMed Res. Int.* 2013, 2013, 318471.
222. Uzelac JJ, Stanić M, Krstić D, Čolović M, Djurić D. Effects of homocysteine and its related compounds on oxygen consumption of the rat heart tissue homogenate: The role of different gasotransmitters. *Mol Cell Biochem.* 2018;444:143–148. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3213-7>.

223. Radenković M, Djurić D, Janković R, Prostran M. The analysis of transduction mechanisms associated with an acute action of homocysteine on isolated rat femoral artery. *Acta Physiol Hung.* 2014;101:448–460. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.3>.
224. Toroser D, Sohal RS. Age-associated perturbations in glutathione synthesis in mouse liver. *Biochem J.* 2007;405:583–589. <https://doi.org/10.1042/BJ20061633>.
225. Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M, Quyyumi AA. Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:507–514. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00216-7).
226. Zhang D, Chen Y, Xie X, Liu J, Wang Q, Kong W, Zhu Y. Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53:487–496. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.06.006>.
227. Majors A, Ehrhart A, Pezacka E. Hyperhomocysteine as a risk factor for vascular disease: Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2074–2081. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.11.2074>.
228. Shahzad S, Mateen S, Mubeena P, Mariyath M, et al. Protective effect of syringaldehyde on biomolecular oxidation, inflammation and histopathological alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:625–633. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.097>.
229. Wang M, Liu Y, Pan R, et al. Protective effects of Myrica rubra flavonoids against hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury via the regulation of the PI3K/Akt/GSK3 β pathway. *Int J Mol Med.* 2019;43(5):2133–2143. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4197>.
230. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019;21:425–35.
231. Bashar T, Akhter N. Study on oxidative stress and antioxidant level in patients of acute myocardial infarction before and after regular treatment. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2014;40:79–84.
232. Pechán I, Minárová H, Babusíková F, Rendeková V, Mizera S, Schrameková E, et al. [Parameters of oxidative stress in patients with cardiopathies] *Bratisl Lek Listy.* 1996;97:344–7.

233. Chan CY, Mong MC, Liu WH, Huang CY, Yin MC. Three pentacyclic triterpenes protect H9c2 cardiomyoblast cells against high-glucose-induced injury. *Free Radic Res.* 2014;48:402–11.
234. Liu X, Qi K, Gong Y, Long X, Zhu S, Lu F, et al. Ferulic acid alleviates myocardial ischemia reperfusion injury via upregulating AMPK α 2 expression-mediated ferroptosis depression. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2021;79:489–500.
235. Li F, Lang F, Wang Y, Zhai C, Zhang C, Zhang L, et al. Cyanidin ameliorates endotoxin-induced myocardial toxicity by modulating inflammation and oxidative stress through mitochondria and other factors. *Food Chem Toxicol.* 2018;120:104–11.
236. Li L, Pan Q, Han W, Liu Z, Li L, Hu X. Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing glutathione redox cycling. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6753–60.
237. Zhao J, Ouyang Y, Wang H, Lai H, Hu S, Tang L, et al. An energy metabolism study on the efficacy of naoxintong capsules against myocardial infarction in a rat model. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:3712500.
238. Liao H-H, Zhu J-X, Feng H, Ni J, Zhang N, Chen S, et al. Myricetin possesses potential protective effects on diabetic cardiomyopathy through inhibiting IB/NFB and enhancing Nrf2/HO-1. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8370593.
239. Sudharsan PT, Mythili Y, Selvakumar E, Varalakshmi P. Cardioprotective effect of pentacyclic triterpene, lupeol and its ester on cyclophosphamide-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 2005;24:313–8.
240. Shi L, Fu W, Xu H, Li S, Yang X, Yang W, et al. Ginsenoside Rc attenuates myocardial ischaemic injury through antioxidative and anti-inflammatory effects. *Pharm Biol.* 2022;60:1038–46.
241. Wang X, Chen XX, Zhou WQ, Men HB, Bao T, Sun YK, et al. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/NRF2 pathways. *Acta Pharm Sin B.* 2022;12:708–22.
242. Ning D, Yang X, Wang T, Jiang Q, Yu J, Wang D. Atorvastatin treatment ameliorates cardiac function and remodeling induced by isoproterenol attack through mitigation of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;574:39–47.
243. Kumar P, Osahon OW, Sekhar RV. GlyNAC (Glycine and N-Acetylcysteine) Supplementation in mice increases length of life by correcting glutathione

- deficiency, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, abnormalities in mitophagy and nutrient sensing, and genomic damage. *Nutrients*. 2022;14:1114.
244. Krause MS, Oliveira LP, Silveira EMS, Vianna DR, Rossato JS, Almeida BS, et al. MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochem Funct*. 2007;25:23–32.
245. Jungsuwadee P, Cole MP, Sultana R, Joshi G, Tangpong J, Butterfield DA, et al. Increase in Mrp1 expression and 4-hydroxy-2-nonenal adduction in heart tissue of Adriamycin-treated C57BL/6 mice. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:2851–60.
246. Von Harsdorf R., Li P.F., Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. 1999;99:2934–2941.
247. Ouyang B., Li Z., Ji X., Huang J., Zhang H., Jiang C. The protective role of lutein on isoproterenol-induced cardiac failure rat model through improving cardiac morphology, antioxidant status via positively regulating Nrf2/HO-1 signalling pathway. *Pharm. Biol*. 2019;57:529–535.
248. Abdelzاهر W.Y., Ahmed S.M., Welson N.N., Alsharif K.F., Batiha G.E.-S., Labib D.A.A. Dapsone ameliorates isoproterenol-induced myocardial infarction via Nrf2/HO-1; TLR4/TNF- α signaling pathways and the suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Front. Pharmacol*. 2021;12:669679.
249. Abukhalil M.H., Hussein O.E., Aladaileh S.H., Althunibat O.Y., Al-Amarat W., Saghir S.A., Alfwuaires M.A., Algefare A.I., Alanazi K.M., Al-Swailmi F.K. Visnagin prevents isoproterenol-induced myocardial injury by attenuating oxidative stress and inflammation and upregulating Nrf2 signaling in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol*. 2021;35:e22906.
250. Althunibat O.Y., Abduh M.S., Abukhalil M.H., Aladaileh S.H., Hanieh H., Mahmoud A.M. Umbelliferone prevents isoproterenol-induced myocardial injury by upregulating Nrf2/HO-1 signaling, and attenuating oxidative stress, inflammation, and cell death in rats. *Biomed. Pharmacother*. 2022;149:112900.
251. Velusamy P., Mohan T., Ravi D.B., Kishore Kumar S., Srinivasan A., Chakrapani L.N., Singh A., Varadharaj S., Kalaiselvi P. Targeting the Nrf2/ARE signalling pathway to mitigate isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: Plausible role of hesperetin in redox homeostasis. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2020;2020:9568278.

252. Shanmugam G., Challa A.K., Devarajan A., Athmanathan B., Litovsky S.H., Krishnamurthy P., Davidson C.J., Rajasekaran N.S. Exercise mediated Nrf2 signaling protects the myocardium from isoproterenol-induced pathological remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019;6:68.
253. Shanmugam G., Challa A.K., Litovsky S.H., Devarajan A., Wang D., Jones D.P., Darley-Usmar V.M., Rajasekaran N.S. Enhanced Keap1-Nrf2 signaling protects the myocardium from isoproterenol-induced pathological remodeling in mice. *Redox Biol.* 2019;27:101212.
254. Allam M.A.M., Khowailed A.A., Elattar S., Mahmoud A.M. Umbelliferone ameliorates oxidative stress and testicular injury, improves steroidogenesis and upregulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in type 2 diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2021;74:573–584.
255. Zhang L, Guo Z, Wang Y, Geng J, Han S. The protective effect of kaempferol on heart via the regulation of Nrf2, NF- κ B, and PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathways in isoproterenol-induced heart failure in diabetic rats. *Drug Dev Res.* 2019;80:294–309.
256. Zhang X-J, Cui Z-H, Zhao Y-X, He T-T, Wang L, Liang X-W. Ferulic acid ameliorates isoproterenol-induced heart failure by decreasing oxidative stress and inhibiting cardiocyte apoptosis via activating Nrf2 signaling pathway in rats. *Biol Pharm Bull.* 2021;44:396–403.
257. Zheng X, Ma H, Ge Q, et al. Role of oxidative stress and Nrf2 in cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2023;2023:1453896. doi:10.1155/2023/1453896.
258. Tan Y, Chen Q, Wang M, et al. Inhibition of NF- κ B signaling attenuates oxidative stress and apoptosis in cardiac injury induced by isoproterenol. *J Mol Cell Cardiol.* 2023;176:90–98. doi:10.1016/j.yjmcc.2023.01.014.
259. Zhang L, Yin J, Gao J, et al. Protective role of ursodeoxycholic acid in heart ischemia-reperfusion injury via Nrf2/HO-1 signaling pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2023;81(2):123–132. doi:10.1097/FJC.0000000000001345.
260. Patel V, Shah S, Jain K, et al. Role of BAX and TNF in mediating apoptosis in cardiomyocytes exposed to chronic isoproterenol treatment. *Exp Biol Med.* 2024;249(1):58–67. doi:10.1177/1535370223114623.

261. Lin F, Qin Y, Chen J, et al. Modulation of ROS and apoptosis by ursodeoxycholic acid in cardiomyocytes under oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2024;184:87–95. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.024.
262. Zhao Z, Liu W, Li D, et al. BAX-mediated apoptosis and Nrf2-dependent antioxidant response in cardiomyocytes treated with isoproterenol. *Cell Death Dis.* 2023;14(10):845. doi:10.1038/s41419-023-05689-w.
263. Ma J, Zhang X, Wang Y, et al. Ursodeoxycholic acid ameliorates myocardial apoptosis via inhibition of NF- κ B pathway in ISO-induced cardiac injury. *Pharmacol Res.* 2024;189:106788. doi:10.1016/j.phrs.2023.106788.
264. Hu H, Sun L, Chen L, et al. Nrf2-mediated cytoprotection in isoproterenol-induced myocardial oxidative injury in rats. *J Mol Med.* 2024;102(5):603–616. doi:10.1007/s00109-023-02375-2.
265. Deng Q, Zhang Y, Wu C, et al. Therapeutic effect of ursodeoxycholic acid on isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats through inhibition of oxidative stress and apoptosis. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2024;24(1):45–56. doi:10.1007/s40256-023-00524-8.
266. Kumar S, Gupta A, Rai R, et al. The cardioprotective effects of UDCA through regulation of apoptotic pathways and ROS production in ISO-induced cardiac damage. *Mol Cell Biochem.* 2023;488(3):251–264. doi:10.1007/s11010-023-04698-y.

LISTA SKRAĆENICA

AIM – akutni infarkt miokarda

AKAP – A-kinaza sidreni proteini

AKS – akutni koronarni sindrom

CA – holna kiselina

CA – holna kiselina

CAT – katalaza

CAT – katalaza

CDCA – henodeksikolna kiselina

CDCA – henodeoksiholna kiselina

CRP – Creaktivni protein

DAMP – molekularni obrasci povezani sa oštećenjem;

DCA – deoksiholna kiselina

DCA – deoksiholna kiselina

EKG – elektrokardiogram

ERK – Ekstracelularne signalno regulisane kinaze

ESC – National Cardiac Societies

GPKS – glutation peroksidaza

GPx – glutation peroksidaza

GSH – glutation

GSH-Pk – glutation peroksidaza

HMBG1 – nuklearni protein hromatina

hs-cTn – srčani troponin visoke osjetljivosti

IL-1 – interleukin 1

IL-18 – interleukin18

IL-6 – interleukin 6

IM – infarkt miokarda

JNK – Jun Nuklearna Kinaza

LCA – litoholna kiselina

LCA – litoholna kiselina

MAPK – mitogenima aktivirane protein kinaze

MAPKS – Mitogen-Aktivirane Protein Kinaze

MCP-1 – hemoatraktantni protein-1

NA – nestabilna angina pectoris

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NAM – nikotinamid

NF kB – nuklearni faktor kapa B

NF-κB – nuklearni faktor-κB

NO – azotni oksida

NSTE-ACS – akutni koronarni sindrom bez ST-elevacije

NSTEMI – infarkt miokarda bez ST-elevacije

Prk – peroksiredoksin

Prk – peroksiredoksin

RNS – reaktivne azotne vrste

RNS – reaktivne vrste azota

ROS – reaktivne vrste kiseonika

SNS – simpatičkinervni sistem

SOD – superoksid dismutaza

SOD – superoksid dismutaze

STEMI – infarkt miokarda sa elevacijom ST

TNF – faktora tumorske nekroze

TNF- tumor nekroza faktora

UDCA – ursodeoksiholna kiselina

UDCA – ursodeoksiholna kiselina

ŽK – žučne kiseline

BIOGRAFIJA

Ja, Dalibor (Milorad), Mihajlović, rođen sam 16. 9. 1973. godine u Banjoj Luci, gdje završavam osnovnu i srednju školu, te Medicinski fakultet.

OBRAZOVANJE:

2017 – upisao sam doktorske studije, smijer biomedicinska istraživanja na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci, trenutno sam u završnoj fazi izrade doktorske disertacije pod nazivom: Uloga henodeoksiholne i urodeoksiholne kiseline na funkcionalne i biohemijske promjene srca na modelu izoprenalinske kardiotoksičnosti pacova.

2015 – na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci branim magistarsku tezu i stičem naziv magistra medicinskih nauka.

2014 – na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci polažem specijalistički ispit i stičem zvanje specijaliste urgentne medicine.

2004 – završavam studije medicine na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci sa prosjekom ocjena 8,42 i dobijam zvanje doktora medicine.

1992 – završavam srednju medicinsku školu u Banjoj Luci sa odličnim uspjehom.

1988 – završavam osnovnu školu u Banjoj Luci sa odličnim uspjehom.

RADNO ISKUSTVO:

2019 - biran sam u zvanje višeg asistenta za užu naučnu oblast Urgentna medicina pri Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci. Prethodno sam bio angažovan na navedenoj katedri u zvanju stručnog saradnika.

2014 – završetkom specijalizacije nastavljam da radim u Službi hitne medicinske pomoći sa edukativnim centrom Doma zdravlja u Banjoj Luci u zvanju specijaliste urgentne medicine gdje i danas radim.

2005 – zapošljavam se u Domu zdravlja u Banjoj Luci u Službi hitne medicinske pomoći sa edukativnim centrom gdje radim u zvanju doktora medicine.

ČLANSTVA U UDRUŽENJIMA:

1. Komora doktora medicine Republike Srpske
2. Udruženje doktora Urgentne medicine Republike Srpske

Od 2005. godine zaposlen sam u Domu zdravlja Banja Luka, u Službi hitne medicinske pomoći sa edukativnim centrom, gdje i danas radim.

Oženjen, otac dvoje djece.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем
да је докторска дисертација

Наслов рада „Улога хенодеоксихолне и урсодеооксихолне киселине на функционлне и биохемијске промјене срца на моделу изопренилинске кардиотоксичности код пацова”

Наслов рада на енглеском језику „The role of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on functional and biochemical changes of the heart in the model of isoprenaline cardiotoxicity in rats”

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

У Бањој Луци, дана 2024. године
08.11.

Потпис докторанта


Изјава 2

Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом
„Улога хенодеоксихолне и урсодеоксихолне киселине на функционалне и биохемијске
промене срца на моделу изопреналинске кардиотоксичности код пацова”

која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

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

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

- Ауторство
- Ауторство – некомерцијално
- Ауторство – некомерцијално – без прераде
- Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
- Ауторство – без прераде
- Ауторство – дијелити под истим условима

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

У Бањој Луци, дана 2024. године
08.11.

Потпис докторанта



ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ КРЕАТИВНЕ ЗАЈЕДНИЦЕ

Ауторство (CC BY)

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

Ауторство - некомерцијално (CC BY-NC)

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дјела.

Ауторство - некомерцијално - без прерада (CC BY-NC-ND)

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, без промјена, преобликовања или употребе дјела у свом дијелу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дјела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дјела.

Ауторство - некомерцијално - дијелити под истим условима (CC BY-NC-SA)

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дијела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дјела и прерада

Ауторство - без прерада (CC BY-ND)

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, без промјена, преобликовања или употребе дјела у свом дијелу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дјела.

Ауторство - дијелити под истим условима (CC BY-SA)

Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дјела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Напомена: Овај текст није саставни дио изјаве аутора.

Више информација на линку: <http://creativecommons.org.rs/>

Изјава 3

Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Далибор Михајловић
Наслов рада „Улога хенодеоксихолне и урсодеоксихолне киселине на функционлне и биохемијске промјене срца на моделу изопреналинске кардиотоксичности код пацова”

Ментор проф. др Велибор Васовић
Коментор проф. др Ранко Шкрбић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, дана 08.11.2024. године

Потпис докторанта

