



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
AKADEMSKE DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA PRODOR U ĆELIJE I TKIVA I
FARMAKODINAMIKU DOKSORUBICINA**

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Mentori:

Prof. dr Karmen Stankov

Prof. dr Momir Mikov

Kandidat:

dr Bojan Stanimirov

Novi Sad, 2017. godina

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Bojan Stanimirov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Karmen Stankov, Redovni professor Prof. dr Momir Mikov, Redovni profesor
Naslov rada: NR	Uticaj žučnih kiselina na prodor u ćelije i tkiva i farmakodinamiku doksorubicina
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	<u>srp.</u> / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje:	Vojvodina

UGP	
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Vojvodina, Srbija
Fizički opis rada: FO	(7 poglavlja / 215 stranica / 8 slika / 83 grafikona / 52 tabele/ 391 referenca)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Biohemija, Farmakologija sa toksikologijom
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Žučne kiseline i soli; doksorubicin; neoplazme; apoptoza; mitohondrije; farmakokinetika; antioneoplastični lekovi
UDK	615.277.015:547.93
Čuva se: ČU	Univerzitet u Novom Sadu, Biblioteka Medicinskog fakulteta, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Vojvodina, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Zahvaljujući amfifilnoj strukturi i mogućnosti građenja konjugata, žučne kiseline - endogeno sintetisani produkti katabolizma holesterola su prepoznate kao potencijalni nosači lekova i promotori transporta kroz biološke membrane. Otkriće da aktivacijom specifičnih nuklearnih receptora regulišu ekspresiju gena uključenih u plejadu signalnih puteva uključenih u metabolizam, proliferaciju i diferencijaciju ćelija i onkogenezu, proširilo je ulogu žučnih kiselina u odnosu na inicijalno opisanu ulogu intestinalnih emulgatora. Žučne kiseline se danas ne smatraju samo pasivnim nosačima lekova i promoterima transporta kroz biološke membrane već i molekulima sa farmakodinamskom

funkcijom, koji regulišu različite aspekte integrativnog ćelijskog metabolizma. Doksorubicin je jedan od najčešće korišćenih antineoplastičkih agenasa i sastavna je komponenta mnogih hemoterapijskih protokola u lečenju solidnih i hematoloških maligniteta. Međutim, hepatotoksični i kardiotoksični efekti značajno ograničavaju upotrebu ovog, inače veoma korisnog antitumorskog agensa. Pojava odložene dozno-zavisne kardiotoksičnosti predstavlja značajan zdravstveni problem onkoloških pacijenata sa uspešno lečenim malignitetom, naročito pacijenata lečenih u pedijatrijskom uzrastu. Budući da je razvoj novih lekova veoma dug i skup proces sa neizvesnim ishodom, poboljšanje farmakodinamskih i farmakokinetičkih svojstava već postojećih antitumorskih agenasa sa dokazanom efikasnošću, uz smanjenje toksičnih efekata, predstavlja racionalan istraživački pristup u savremenoj medicini. Osnovni cilj ovog rada je ispitivanje uticaja žučnih kiselina ursodeoksiholne, henodeoksiholne i 12-okso-henodeoksiholne kiseline (12-monoketoholne kiseline) na citotoksičnu aktivnost doksorubicina prema MCF-7 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke i ispitivanje molekularnih mehanizama odgovornih za farmakodinamske efekte. Takođe su navedene žučne kiseline ispitane kao promoteri transporta koji utiču na prodor i kumulaciju doksorubicina u malignim ćelijama. U ovom radu je ispitan uticaj koadministracije navedenih žučnih kiselina sa doksorubicinom na odložene toksodinamske efekte (hepatotoksičnost i kardiotoksičnost) kod pacova, ali i efekti pretretmana žučnim kiselinama na koncentracije doksorubicina u krvi, bilijarnu ekskreciju leka kao i kumulaciju u jetri i miokardu eksperimentalnih životinja. Žučne kiseline su u netoksičnim koncentracijama potencirale *in vitro* citotoksične efekte doksorubicina na MCF-7 ćelijskoj liniji pri čemu je henodeoksiholna ispoljila sinergistički efekt, dok su ursodeoksiholna u 12-monoketoholna ispoljile aditivni citotoksični efekt sa doksorubicinom. Ispitivanjem molekularnih mehanizama citotoksičnih efekata utvrđeno je da su žučne kiseline u različitom stepenu potencirale apoptozu ćelija mitohondrijalnim putem uticajem na ekspresiju pro- i antiapoptotskih proteina na transkripcionom nivou i povećale stres endoplazmatskog retikuluma, ali i dovele do alteracija ekspresije gena koji kodiraju sintezu antioksidativnih enzima, transmembranskih efluks proteina i enzima uključenih u metaboličku inaktivaciju leka. Žučne kiseline u netoksičnim koncentracijama su takođe značajno povećale prodor i kumulaciju doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji. U *in vivo* sistemu, koadministracija žučnih kiselina nije rezultovala u poboljšanju odloženih toksodinamskih efekata visokih doza doksorubicina na biohemijском i molekularnom nivou. Međutim, nakon pretretmana žučnim kiselinama, vrednosti koncentracija doksorubicina u serumu su bile povišene nakon pretretmana urso- i henodeoksiholnom kiselinom i snižene nakon pretretmana 12-monoketoholnom kiselinom uz povećanje bilijarne sekrecije doksorubicina. Pored promena u farmakokinetikom

	<p>profilu doksorubicina, pretretman žučnim kiselinama je blago redukovao prodor i kumulaciju doksorubicina u hepatocite i kardiomiocite. Na osnovu rezultata ove studije može se zaključiti da primena ispitivanih žučnih kiselina sa doksorubicinom povećava prodor i poboljšava farmakodinamski profil doksorubicina <i>in vitro</i>, na ćelijskom modelu humanog adenokarcinoma dojke. Poboljšanje selektivnog preuzimanja i prodora doksorubicina u maligne ćelije koje nije praćeno povećanom kumulacijom u normalnim tkivima, kao i poboljšanje antitumorskog dejstva doksorubicina sa mogućim smanjenjem doze uz smanjenje pojave dozno-zavisnih neželjenih dejstava doksorubicina čini žučne kiseline molekulima kandidatima za dalja ispitivanja u cilju razvoja novih, poboljšanih antitumorskih terapijskih strategija.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>06.03.2014. godine</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: član: član: član: član:</p>

University of Novi Sad

Faculty of Medicine

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	Bojan Stanimirov
Mentor: MN	Prof. Dr Karmen Stankov, MD, PhD, Full Professor Prof. Dr Momir Mikov, MD, PhD, Full Professor
Title: TI	The influence of bile acids on cell and tissue penetration and pharmacodynamics of doxorubicin
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia

Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Physical description: PD	7 chapters / 215 pages / 8 figures / 83 graphs / 52 tables / 391 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Biochemistry, Pharmacology and Toxicology
Subject, Key words SKW	Bile Acids and Salts; Doxorubicin, Neoplasm; Apoptosis; Mitochondrion; Pharmacokinetics; Antineoplastic Drugs
UC	615.277.015:547.93
Holding data: HD	University of Novi Sad, Library of the Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Vojvodina, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	Due to the amphiphilic structure and the significant conjugation potential, bile acids - endogenously synthesized products of cholesterol catabolism have been recognized as potential drug carriers and promoters of transport through biological membranes. The discovery that by activating specific nuclear receptors bile acids regulate the expression of genes involved in various signaling pathways including metabolism, cell proliferation and differentiation as well as carcinogenesis, expanded initially ascribed role of intestinal emulsifiers to the various fields. Bile acids are now

considered not to act only as passive carriers of drugs and promoters of transport through biological membranes, but also as the molecules with pharmacodynamic activity, regulating various aspects of integrative cellular metabolism. Doxorubicin is one of the most commonly prescribed antineoplastic agents as an integral component of many chemotherapy protocols in the treatment of both solid and hematologic malignancies. However, hepatotoxic and cardiotoxic effects significantly limit the use of this, otherwise, very useful anti-tumor agent. The development of dose-dependent cardiotoxic side effects represents particular health issue in successfully treated oncological patients, especially among survivors of pediatric malignancies. Since the development of new drugs is very long and expensive process with an uncertain outcome, improving the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of the existing agents with proven efficacy, while reducing toxic side effects, represents a rational approach to research in modern medicine. The main objective of this work is to examine the role of bile acids: ursodeoxycholic, chenodeoxycholic and 12-oxo-chenodeoxycholic acid (12-monoketocholeic acid) on the cytotoxic activity of doxorubicin in the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line, and to get insight on molecular mechanisms responsible for underlying pharmacodynamic effects. The capacity of bile acids to promote the transport and accumulation of doxorubicin in malignant cells was also evaluated. In addition, the effect of co-administration of the bile acids with doxorubicin on delayed toxicodynamic effects (hepatotoxicity and cardiotoxicity) in rats, as well as the effects of bile acid pretreatment on the doxorubicin serum concentration and pharmacokinetic profile, biliary excretion of the drug as well as accumulation in the liver and myocardial cells of experimental animals were examined. Bile acids applied in non-toxic concentrations potentiated *in vitro* cytotoxic effects of doxorubicin in MCF-7 cell line. Chenodeoxycholic acid exhibited a synergistic effect, whereas ursodeoxycholic and 12-monoketocholeic acid exhibited an additive cytotoxic effect with doxorubicin. By examining the underlying molecular mechanisms of cytotoxic effects, bile acids have been found to potentiate apoptosis of cells by mitochondrial-dependent pathway by modifying the expression of pro- and anti-apoptotic proteins at the transcriptional level and to increase endoplasmic reticulum stress, but also have altered the expression of genes encoding the synthesis of antioxidant enzymes, transmembrane efflux proteins and enzymes involved in metabolic inactivation of the drug. Non-toxic concentrations of bile acids also significantly increased the penetration and accumulation of doxorubicin in MCF-7 cell line. In the *in vivo* system, the co-administration of bile acid did not improved delayed toxicodynamic effects of high dose of doxorubicin both at the biochemical and molecular levels. However, pretreatment with bile acids resulted in alterations of serum doxorubicin concentrations. Chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid elevated whereas 12-monoketocholeic acid decreased serum doxorubicin concentrations. In addition to

	<p>changing pharmacokinetic profile of doxorubicin on bile acid species-dependent manner, all bile acids have also increased excretion of drug by the biliary route, and slightly reduced penetration and accumulation of doxorubicin in hepatocytes and cardiomyocytes. Based on the results of this study, the administration of the examined bile acids with doxorubicin increases the penetration and improves the pharmacodynamic profile of doxorubicin <i>in vitro</i> on the cell model of human breast adenocarcinoma. The improvement of selective uptake and penetration of doxorubicin into malignant cells that is not accompanied by increased accumulation in normal tissues, as well as the improvement in the anti-tumor effects of doxorubicin with a possibility to reduce the dose and thereby the occurrence of dose-dependent undesirable effects of doxorubicin, render bile acids as the potential candidate molecules in developing novel antitumor therapeutic strategies.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>March 6th, 2014</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member: member: member:</p>

Želeo bih da izrazim posebnu zahvalnost mojim Mentorima i Učiteljima, prof. dr Karmen Stankov i prof. dr Momiru Mikov koji su svojim znanjem, stručnošću, iskustvom, korisnim savetima i nesebičnom podrškom omogućili izradu ove doktorske disertacije, a ukazavši privilegiju da postanem član njihovog istraživačkog tima omogućili moje akademsko usavršavanje i napredovanje.

Kolegama i prijateljima Nebojši Pavlović, Maji Đanić, Milici Paut Kusturici i Vanesi Sekeruš veliko hvala na bezrezervnoj podršci i prijateljstvu tokom svih godina naše saradnje.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Gordani Bogdanović i dr Vesni Kojić iz Instituta za Onkologiju u Sremskoj Kamenici za nesebičnu pomoć u eksperimentima sa kulturom ćelija i celokupno zalaganje koje je značajno doprinelo realizaciji ove doktorske teze.

Zahvaljujem se prof. dr Mihajli Đan i prof. dr Jeleni Purać sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta kao i dr Ivi Barjaktarović iz Centra za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku koji su mi pomogli u realizaciji različitih segmenata eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se svim zaposlenim na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju na razumevanju, kolegijalnosti i pomoći prilikom izrade disertacije. Posebno se zahvaljujem doc. dr Saši Vukmirović na dragocnim savetima prilikom izvođenja HPLC analize.

Ovu disertaciju posvećujem mojim roditeljima, bratu, baki i deki uz koje sam odrastao, koji su bezuslovnom ljubavlju, požrtvovanošću i podrškom omogućili da ostvarim svoje snove.

Bojan

SADRŽAJ

1. UVOD	- 2 -
1.1. ŽUČNE KISELINE.....	- 2 -
1.1.1. <i>Struktura i fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina</i>	- 3 -
1.1.2. <i>Metabolizam žučnih kiselina</i>	- 6 -
1.1.2.1. <i>Sinteza primarnih žučnih kiselina</i>	- 6 -
1.1.2.1.1. <i>Klasični put biosinteze žučnih kiselina</i>	- 7 -
1.1.2.1.2. <i>Alternativni put biosinteze žučnih kiselina</i>	- 8 -
1.1.2.1.3. <i>Yamasaki biosintetski put</i>	- 8 -
1.1.2.1.4. <i>25-hidroksilacioni put biosinteze žučnih kiselina</i>	- 9 -
1.1.2.2. <i>Konjugacija sa glicinom i taurinom i bilijarna sekrecija žučnih kiselina</i>	- 11 -
1.1.2.3. <i>Intestinalna faza biotransformacije žučnih kiselina</i>	- 11 -
1.1.2.4. <i>Enterohepatička recirkulacija i ekskrecija žučnih kiselina</i>	- 12 -
1.1.3. <i>Žučne kiseline kao signalni molekuli</i>	- 14 -
1.1.4. <i>Farnezoid x receptor - molekularna biologija i funkcija</i>	- 14 -
1.1.4.1. <i>Žučne kiseline kao agonisti farnezoid x receptora</i>	- 17 -
1.1.4.2. <i>Farnezoid x receptor kao senzor i regulator metabolizma žučnih kiselina</i>	- 18 -
1.1.4.3. <i>Klinička primena semisintetskih derivata žučnih kiselina kao selektivnih modulatora farnezoid x receptora</i> -	- 19 -
1.1.5. <i>Citotoksična i citoprotektivna svojstva žučnih kiselina</i>	- 20 -
1.1.5.1. <i>Žučne kiseline i apoptoza</i>	- 21 -
1.1.5.1.1. <i>Biohemijski aspekti apoptoze</i>	- 21 -
1.1.5.1.2. <i>Žučne kiseline kao induktori apoptoze</i>	- 23 -
1.1.5.1.3. <i>Žučne kiseline kao inhibitori apoptoze</i>	- 24 -
1.1.5.1.4. <i>Modulacija apoptoze pomoću UDCA</i>	- 25 -
1.1.5.2. <i>Žučne kiseline i autofagija</i>	- 27 -
1.1.5.3. <i>Žučne kiseline i nekroza</i>	- 29 -
1.1.6. <i>Uticaj žučnih kiselina na biološke membrane – uloga žučnih kiselina kao promotera transporta</i>	- 30 -
1.1.7. <i>Uloga membranskih transportnih proteina žučnih kiselina u distribuciji lekova</i>	- 32 -
1.1.7.1. <i>OATP transportni proteini za preuzimanje (influks) žučnih kiselina i ksenobiotika</i>	- 32 -
1.1.7.2. <i>ATP-vezujući kasetni proteini kao multispecifični transportni proteini za efluks žučnih kiselina i ksenobiotika</i> -	- 34 -
-	-
1.1.8. <i>Primena žučnih kiselina u razvoju novih formulacija lekova</i>	- 38 -
1.2. DOKSORUBICIN	- 41 -
1.2.1. <i>Doksorubicin - antraciklinski citostatik</i>	- 41 -
1.2.2. <i>Mehanizam antitumorske farmakodinamike doksorubicina</i>	- 44 -
1.2.2.1. <i>Interakcija sa proteazomom</i>	- 44 -
1.2.2.2. <i>Inhibicija topoizomeraze II</i>	- 45 -
1.2.2.3. <i>DNA interkalacija i drugi genotoksični mehanizmi doksorubicina</i>	- 45 -
1.2.2.4. <i>Doksorubicinom-indukovan oksidativni stres</i>	- 47 -
1.2.2.5. <i>Povećana produkcija ceramida</i>	- 49 -
1.2.3. <i>Farmakokinetske karakteristike i metabolizam doksorubicina</i>	- 50 -
1.2.4. <i>Toksodinamske karakteristike doksorubicina</i>	- 51 -
1.2.4.1. <i>Hepatotoksičnost doksorubicina</i>	- 51 -
1.2.4.2. <i>Kardiotoksičnost doksorubicina</i>	- 52 -
1.2.4.2.1. <i>Faktori rizika udruženi sa razvojem doksorubicinom-indukovane kardiomiopatije</i>	- 53 -
1.2.4.2.2. <i>Molekularni mehanizmi doksorubicinom-indukovanog oštećenja kardiomiocita</i>	- 53 -
1.2.4.2.3. <i>Strategije u prevenciji doksorubicinske kardiotoksičnosti</i>	- 56 -

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	- 60 -
2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	- 60 -
2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	- 60 -
3. MATERIJAL I METODE	- 61 -
3.1. MATERIJAL.....	- 61 -
3.2. ČELIJSKA KULTURA I <i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTALNI MODEL	- 61 -
3.2.1 <i>Određivanje broja i vijabilnosti ćelija</i>	- 62 -
3.2.2 <i>Ispitivanje citotoksičnosti kolorimetrijskim MTT testom</i>	- 62 -
3.2.3 <i>Tretman i priprema MCF-7 ćelija za ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima</i>	- 64 -
3.2.4 <i>Tretman i priprema MCF-7 ćelija za kvantifikaciju genske ekspresije</i>	- 64 -
3.2.5 <i>Tretman i priprema MCF-7 ćelija za određivanje intracelularne kumulacije doksorubicina</i>	- 65 -
3.3. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE.....	- 65 -
3.4. <i>IN VIVO</i> EKSPERIMENTALNI MODELI	- 66 -
3.4.1 <i>Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na biokemijske i molekularno-biološke efekte administracije doksorubicina</i>	- 66 -
3.4.2 <i>Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na vrednosti koncentracije doksorubicina u krvi i žuči i kumulaciju doksorubicina u srcu i jetri</i>	- 68 -
3.4.3 <i>Homogenizacija organa</i>	- 69 -
3.5. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA	- 69 -
3.5.1 <i>Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na vrednosti serumskih biokemijskih parametara (ALT, AST, CK-MB) kod životinja tretiranih doksorubicinom</i>	- 69 -
3.5.2 <i>Određivanje koncentracije proteina</i>	- 70 -
3.5.3 <i>Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije</i>	- 71 -
3.5.4 <i>Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)</i>	- 72 -
3.5.5 <i>Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT)</i>	- 72 -
3.5.6 <i>Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR)</i>	- 73 -
3.5.7 <i>Određivanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)</i>	- 74 -
3.5.8 <i>Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)</i>	- 74 -
3.6. IZOLACIJA, KVANTIFIKACIJA I PROCENA KVALITETA RNA	- 75 -
3.7. REVERZNA TRANSKRIPCIJA	- 76 -
3.8. KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE U STVARNOM VREMENU (<i>QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION – QRT-PCR</i>)	- 76 -
3.9. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DOKSORUBICINA HPLC METODOM.....	- 81 -
3.9.1 <i>Instrumenti i hromatografski uslovi</i>	- 81 -
3.9.2 <i>Priprema uzoraka za HPLC</i>	- 82 -
3.9.3 <i>Farmakokinetička analiza</i>	- 82 -
3.10. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	- 83 -
4. REZULTATI.....	- 85 -
4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI DOKSORUBICINA I ŽUČNIH KISELINA NA MCF-7 ČELIJSKOJ LINIJI	- 85 -
4.1.1 <i>Citotoksična aktivnost doksorubicina na MCF-7 ćelijskoj liniji</i>	- 85 -
4.1.2 <i>Citotoksična aktivnost ursodeoksiholne kiseline (UDCA) na MCF-7 ćelijskoj liniji</i>	- 86 -
4.1.3 <i>Citotoksična aktivnost henodeoksiholne kiseline (CDCA) na MCF-7 ćelijskoj liniji</i>	- 87 -
4.1.4 <i>Citotoksična aktivnost 12-monoketoholne kiseline (12-MKC) na MCF-7 ćelijskoj liniji</i>	- 88 -
4.1.5 <i>Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na citotoksičnu aktivnost doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji</i>	- 89 -

4.2. SPECIFIČNA AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U MCF-7 ĆELIJSKOJ LINIJI	- 91 -
4.3. ANALIZA EKSPRESIJE GENA U MCF-7 ĆELIJSKOJ LINIJI NAKON INKUBACIJE SA DOKSORUBICINOM U PRISUSTVU/ODSUSTVU ŽUČNIH KISELINA	- 94 -
4.3.1. <i>Ekspresija gena induktora i inhibitora apoptoze</i>	- 94 -
4.4. EKSPRESIJA GENA SISTEMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U MCF-7 ĆELIJSKOJ LINIJI NAKON INKUBACIJE SA DOKSORUBICINOM U PRISUSTVU/ODSUSTVU ŽUČNIH KISELINA	- 99 -
4.5. EKSPRESIJA <i>GRP-78</i> U MCF-7 ĆELIJSKOJ LINIJI TRETIRANOJ DOKSORUBICINOM ILI DOKSORUBICINOM SA ŽUČNIM KISELINAMA-	104 -
-	
4.6. EKSPRESIJA mRNA TRANSMEMBRANSKIH TRANSPORTNIH EFLUKS PROTEINA U MCF-7 ĆELIJSKOJ LINIJI NAKON INKUBACIJE SA DOKSORUBICINOM SA ILI BEZ PRISUSTVA ŽUČNIH KISELINA.....	- 106 -
4.7. EKSPRESIJA GENA KOJI KODIRAJU SINTEZU ENZIMA UKLJUČENIH U METABOLIZAM DOKSORUBICINA	- 110 -
4.8. EKSPRESIJA FARNEZOID X RECEPTORA U MCF-7 ĆELIJSKOJ LINIJI NAKON INKUBACIJE U MEDIJUMU SA DOKSORUBICINOM SA/BEZ DODATKA ŽUČNIH KISELINA.....	- 113 -
4.9. PROMENA VREDNOSTI TELESNE MASE ŽIVOTINJA	- 115 -
4.10. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA VREDNOSTI SERUMSKIH BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KOD ŽIVOTINJA TRETIRANIH DOKSORUBICINOM -	118 -
4.11. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA INTENZITET LIPIDNE PEROKSIDACIJE U SRČANOM TKIVU I TKIVU JETRE ŽIVOTINJA TRETIRANIH DOKSORUBICINOM.....	- 120 -
4.12. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA AKTIVNOST ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U SRCU I JETRI ŽIVOTINJA TRETIRANIH DOKSORUBICINOM.....	- 121 -
4.13. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA EKSPRESIJU GENA U SRCU I JETRI ŽIVOTINJA TRETIRANIH DOKSORUBICINOM.....	- 126 -
4.13.1. <i>Analiza relativne ekspresije gena regulatora apoptoze</i>	- 126 -
4.13.2. <i>Analiza ekspresije gena sistema antioksidativne zaštite</i>	- 130 -
4.13.3 <i>Analiza ekspresije gena za Grp-78 protein</i>	- 135 -
4.13.4. <i>Analiza ekspresije gena za transmembranske efluks transportne proteine</i>	- 136 -
4.13.5. <i>Analiza ekspresije gena koji kodiraju sintezu enzima uključenih u metabolizam doksorubicina</i>	- 140 -
4.13.6. <i>Analiza relativne ekspresije mRNA nuklearnog FXR u tkivu srca i jetre životinja tretiranih doksorubicinom sa/bez kotretmana žučnim kiselinama</i>	- 142 -
4.14. UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA FARMAKOKINETIČKE OSOBINE DOKSORUBICINA	- 145 -
4.14.1. <i>Uticao tretmana žučnim kiselinama na koncentracije doksorubicina u serumu i farmakokinetičke parametre</i>	- 145 -
4.14.2. <i>Uticao tretmana žučnim kiselinama na koncentracije doksorubicina u žuči</i>	- 149 -
U tabeli 4.14.2.1. prikazane su vrednosti ukupne zapremine izlučene žuči u toku ispitivanog perioda (120 min). Između grupa nije postojala statistički značajna razlika u zapremini izlučene žuči odnosno pretretman žučnim kiselinama nije ispoljio holagog efekat. Samim tim nije došlo do potencijalnog dilucionog efekta na koncentraciju doksorubicina izlučenog bilijarnim putem. Takođe, nisu postojale razlike u zapremini žuči u odgovarajućim vremenskim intervalima između kontrolne grupe i grupa životinja pretretiranih žučnim kiselinama. Jedina razlika je postojala između UDCA- i 12-MKC-pretretiranih grupa u intervalima 60-79 min ($p=0,01$) i 80-99 min ($p<0,001$) u kojima je količina izlučene žuči bila veća u 12-MKC- i odnosu na UDCA-pretretiranu grupu životinja.	- 149 -
Tabela 4.14.2.1. <i>Prosečne vrednosti ukupne zapremine izlučene žuči nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25 mg/kg), CDCA (25 mg/kg), i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine + SD. D-kontrolna grupa; DU–doksorubicin + UDCA; DC–doksorubicin + CDCA; DM– doksorubicin + MKC.</i>	- 149 -
4.14.3. <i>In vivo uticaj žučnih kiselina na kumulaciju doksorubicina u tkivu jetre i miokarda</i>	- 152 -

4.14.4. <i>In vitro</i> uticaj žučnih kiselina na kumulaciju doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke.....	- 153 -
5. DISKUSIJA	- 155 -
6. ZAKLJUČCI	- 184 -
7. LITERATURA	- 187 -

SPISAK SKRAĆENICA

ABC – ATP-vezujući kasetni proteini	MAPK – Mitogenom-aktivisana protein kinaza
AKR – Aldo-keto reduktaza	MDA – Malondialdehid
ASBT - <i>Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter</i>	mdm-2 – <i>Mouse Double Minute 2 Homolog</i>
ATG – <i>Autophagy-related proteins</i>	MDR – <i>Multiple Drug Resistance Protein</i>
ATP – Adenozin trifosfat	miR – mikro RNA
AUC – <i>Area Under the Curve</i>	MPT – Tranziciona pora permeabilnosti mitohondrija
BAAT – Žučna kiselina-CoA:aminokiselina N-acetil transferaza	MRP – <i>Multidrug Resistance-Associated Protein</i>
BASC – Žučna kiselina-CoA sintetaza	MRT - <i>Mean Residence Time</i>
BCRP – <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>	mtDNA – mitohondrijalna DNA
BSEP – <i>Bile Salt Export Pump</i>	NASH – Nealkoholni steatohepatitis
CA – Holna kiselina	NBD – Nukleotid-vezujući domen
CAR – Konstitutivni androstan receptor	NF- κ B – Nuklearni faktor - κ B
CAT – Katalaza	NRF2 – Nuklearni faktor eritroid 2-povezani faktor-2
CBR – Karbonil reduktaza	NTCP – Na ⁺ -zavisni kotransporter žučnih kiselina
CDCA – Henodeoksiholna kiselina	OATP – Transporter organskih anjona
Cl - Klirens	OCA – Obetiholna kiselina
CMC – Kritična micelarna koncentracija	OST – <i>Organic Solute Transporter</i>
CoA – Koenzim A	PARP - NAD ⁺ ADP-riboziltransferaza
CYP27A1 – Sterol 27-hidroksilaza	PGP – p glikoprotein
CYP7A1 – Holesterol 7 α -hidroksilaza	PI3K - Fosfatidilinozitol 3-kinaza
CYP8B1 – Sterol 12 α -hidroksilaza	PPAR - <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
DCA – Deoksiholna kiselina	PRMT-1 – Protein-arginin metiltransferaza 1
DNA – Deoksiribonukleinska kiselina	PXR – Pregnan X receptor
EGFR – Receptor epidermalnog faktora rasta	RNA – Ribonukleinska kiselina
ER – Endoplazmatski retikulum	ROS – Reaktivne kiseonične vrste
ERK1/2 – Ekstracelularnim signalima-regulisana kinaza 1/2	RXR – Retinoid X receptor
ETS – Elektron transtporni sistem	SHP – <i>Small Heterodime Partner</i>
FDA – <i>Food and Drug Administration</i>	SOD – Superoksid dismutaza
FGF-19 – Faktor rasta fibroblasta -19	SULT2A1- Sulfotransferaza 2A1
FXR – Farnezoid X receptor	TGR5- G protein-coupled bile acid receptor 1
FXRE – <i>FXR-Response Element</i>	TMD – Transmembranski domen
GADD153 – <i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene 153</i>	TNF – Faktor tumorske nekroze
GPx – Glutation peroksidaza	TOP-II – Topoizomeraza 2
GRP-78 – <i>78 kDa Glucose-Regulated Protein</i>	TRAIL - <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
GST – Glutation S transferaza	UDCA – Ursodeoksiholna kiselina
HDL – Lipoproteini velike gustine	UGT - Uridin difosfat glukuronil transferaza
HNF-4 α – Hepatocitni nuklearni faktor-4 α	UPR – <i>Unfolded Protein Response</i>
IBAB-P – <i>Intestinal Bile Acid-Binding Protein</i>	VDR – Receptor vitamin D
JNK – c-Jun N-terminalna kinaza	Vd – Volumen distribucije
LCA – Litoholna kiselina	12-MKC – 12-okso-henodeoksiholna kiselina (12-monoketoholna kiselina)
LDL – Lipoproteini male gustine	
LRH-1 – <i>Liver-Related Homolog-1</i>	

1. UVOD

1.1. Žučne kiseline

Žučne kiseline su heterogena grupa amfifilnih steroidnih molekula sintetisanih u hepatocitima kao glavni produkt katabolizma holesterola. U hepatocitima nastaju takozvane primarne žučne kiseline, dok modifikacijom primarnih žučnih kiselina u intestinalnom lumenu nastaju sekundarne žučne kiseline. Zahvaljujući amfifilnoj strukturi, žučne kiseline omogućavaju emulgovanje, digestiju i apsorpciju lipofilnih ksenobiotika nakon obroka, ali i solubilizaciju holesterola u žuči i bilijarnu sekreciju fosfolipida, što je tokom više decenija smatrano za njihovu jedinu ulogu. Žučne kiseline takođe imaju značajna antibakterijska svojstva, utičući na sastav intestinalne mikroflore i održavajući sterilnost bilijarnog trakta.

Amfifilna priroda žučnih kiselina je iskorišćena za ispitivanje poboljšanja transporta lekova kroz biološke membrane omogućavajući dizajn novih farmaceutskih formulacija. Krajem devedesetih godina XX veka, inicijalna, uglavnom mehanistička uloga žučnih kiselina je proširena na plejadu regulatornih funkcija uključujući ćelijsku homeostazu, metaboličke procese, regulaciju proliferacije ćelija i ćelijske smrti kao i proces karcinogeneze. Žučne kiseline su prepoznate kao parakrini i endokrini signalni molekuli sa sposobnošću aktivacije različitih nuklearnih receptora (farnezoid X receptor (FXR), pregnan X receptor (PXR), konstitutivni androstan receptor (CAR) i vitamin D receptor (VDR)) i membranskih receptora (G-protein-spregnuti receptor žučnih kiselina (TGR5, GPBAR1)), kao i različitih kinaznih signalnih puteva, regulišući fosforilaciju histona i histon-regulatornih proteina čime utiču na regulaciju ekspresije gena uključenih u integrativni metabolizam (1-3). Osim regulacije genske ekspresije posredstvom nuklearnih receptora, aktivacijom TGR5 receptora žučne kiseline ispoljavaju genski-nezavisne efekte (4). Aktiviranjem TGR5 receptora u enteroendokrinim L ćelijama, žučne kiseline poboljšavaju glukozom-indukovanu sekreciju insulina i postprandijalnu glikemiju posredstvom glukagonu-sličnog peptida-1 (GLP1) (5). Takođe, TGR5 je eksprimiran u nekoliko regiona centralnog nervnog sistema gde ima ulogu neurosteroidnog receptora, što ukazuje da žučne kiseline imaju daleko značajniju ulogu od inicijalno pretpostavljene.

Alteracije homeostaze žučnih kiselina i žučnim kiselinama-posredovanih signalnih puteva doprinose patogenezi hepato-bilijarnih i intestinalnih bolesti, ali i poremećajima metabolizma glukoze i lipoproteina sa razvojem tipa 2 *diabetes mellitus*-a, ateroskleroze sa

kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim sekvelama, nealkoholne masne bolesti jetre, inflamatorne bolesti creva i neoplazmi gastrointestinalnog i hepatobilijarnog trakta (6-8). Danas je polje ispitivanja žučnih kiselina postalo izuzetno atraktivno naučnoj zajednici u nekoliko istraživačkih centara u svetu i kod nas, sa ciljem razumevanja enigme složene mreže signalnih puteva posredovanih žučnim kiselinama, poboljšanja svojstava postojećih lekova razvojem novih farmaceutskih formulacija sa žučnim kiselinama, kao i razvoja novih semisintetskih analoga žučnih kiselina sa selektivnim dejstvom na nuklearne i membranske receptore u cilju prevencije i terapije različitih metaboličkih i nemetaboličkih oboljenja.

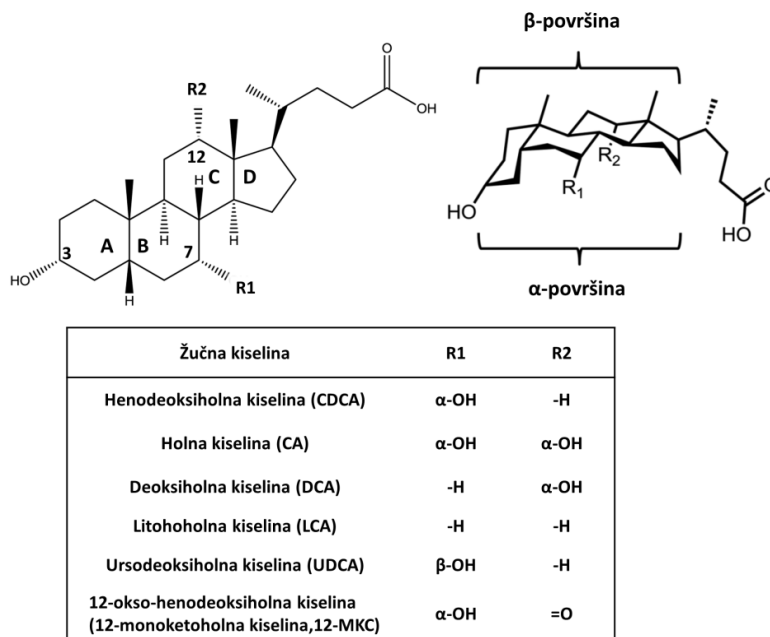
Trenutno se sprovodi nekoliko randomizovanih kliničkih studija koje ispituju terapijske efekte žučnih kiselina i njihovih derivata (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bile+acid&Search=Search>) sa modulatornom ulogom na nivou receptora, naročito na nivou FXR (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=fxr&Search=Search>). Tri prirodne žučne kiseline su registrovane od strane regulatornih agencija kao lekovi za primenu na ljudima. Ursodiol (ursodeoksiholna kiselina, UDCA) se oko 30 godina koristi u terapiji holecistitijaze i primarne bilijarne ciroze. Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih država (*Food and Drug Administration*, FDA) je izdala odobrenje za upotrebu holne kiseline (CA) u terapiji poremećaja sinteze žučnih kiselina izazvanog enzimskim defektom i kao dodatni tretman peroksizomalnih poremećaja uključujući *Zellweger*-ov cerebro-hepato-renalni sindrom, kao i injekcionu upotrebu deoksiholne kiseline (DCA) u cilju konturisanja submentalnog masnog tkiva (9). FDA je u toku 2016. godine ubrzala izdavanje odobrenja za primenu semisintetskog derivata žučne kiseline, 6-alfaetil henodeoksiholne kiseline (obetiholne kiseline, OCA) zajedno sa UDCA, u terapiji primarne bilijarne ciroze (PBC) kod pacijenata sa neadekvatnim odgovorom na UDCA kao monoterapiju, što predstavlja prvo odobrenje leka indikaciju PBC posle više od dvadeset godina (10).

1.1.1. Struktura i fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina

Prirodne žučne kiseline obuhvataju molekule različite strukture nastale katabolizmom holesterola u jetri i generalno su klasifikovane kao C27 i C24 žučne kiseline. Kod sisara su dominantne C24 žučne kiseline, derivati holanske kiseline (**slika 1.1.1**). Strukturna karakteristika zajednička različitim klasama žučnih kiselina je prisustvo rigidnog

ciklopentanoperhidrofenantrenskog prstena sa vezom između A/B prstena u cis- (5β serija) ili trans- položaju (5α serija) i metil grupama na položajima C10 i C13. Struktura bočnog lanca može da varira u broju ugljenikovih jedinica (od pet do osam), sa terminalnom hidroksilnom grupom. Fuzionisanje prstenova A i B u cis- konfiguraciji utiče na blago zakrivljenje steroidnog jezgra sa angularnim metil grupama na konveksnoj hidrofobnoj β površini i polarnim hidroksilnim grupama na konkavnoj hidrofilnoj α strani (sa izuzetkom 7β -OH grupe kod UDCA) (11).

Broj i položaj hidroksilnih grupa direktno determinišu fizičko-hemijske osobine i potencijal emulgovanja i stvaranja micela koju opisuje vrednost kritične micelarne koncentracije (CMC) (viša vrednost CMC ukazuje na manji potencijal formiranja micela). Zahvaljujući amfifilnoj strukturi žučne kiseline imaju tendenciju agregacije u micelle, ali i ispoljavanja citotoksičnog, membranolitičkog, dejstva usled deterdžentske aktivnosti na nivou ćelijske membrane u koncentracijama iznad CMC. U tom kontekstu, određivanje CMC vrednosti i posledičnog citotoksičnog potencijala predstavlja esencijalan korak u karakterizaciji molekula (12).



Slika 1.1.1. Struktura žučnih kiselina.

Žučne kiseline su površinski-aktivni molekuli sa tendencijom spontanog formiranja agregata na graničnim površinama hidrofilnih i lipofilnih faza, sve dok su prisutne u koncentracijama iznad CMC. Formiranje micela je primarno uslovljeno hidrofobnim interakcijama nepolarnih konveksnih β površina nukleusa i vodoničnim vezama uspostavljenim preko polarnih struktura. Hidroksilne grupe u položajima C3, C7 i C12, evolutivno visoko konzervisane kod viših vertebrata, predstavljaju optimalnu konfiguraciju za uspostavljanje vodoničnih veza. Posledično, žučne kiseline sa hidroksilnim grupama lokalizovanim sa obe strane hidrofobnog steroidnog jezgra (α - i β -orijentacija) su hidrofilnije od molekula sa istim brojem hidroksilnih grupa samo u α -orijentaciji usled čega imaju manju sposobnost agregacije odn. višu CMC vrednost. Značaj kontakta hidrofobnih površina u agregaciji žučnih kiselina je evidentan u razlikama CMC vrednosti dva epimera žučnih kiselina, henodeoksiholne ($3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi- 5β -holan-24-oična kiselina, CDCA) i ursodeoksiholne kiseline ($3\alpha,7\beta$ -dihidroksi- 5β -holan-24-oična kiselina, UDCA) (13). Preciznije, hidrofilnost slobodnih i konjugovanih žučnih kiselina (žučnih soli) se smanjuje u sledećem redosledu: UDCA>CA>CDCA>DCA>LCA; taurinske soli žučnih kiselina > glicinske soli žučnih kiselina > slobodne žučne kiseline (14). Takođe, struktura bočnog lanca utiče na CMC vrednosti tako što smanjenje broja ugljenikovih atoma povećava sposobnost asociranja u micelle. Hidrosolubilnost je, dakle, prvenstveno determinisana supstituentima na steroidnom jezgru, naročito kada su hidroksilne grupe lokalizovane sa iste, konkavne, α - površine steroidnog nukleusa hidrosolubilnost se povećava usled kooperativnog formiranja vodoničnih veza hidroksilnih grupa sa solventom. Suprotno, β -stereo-orijentacija hidroksilnih grupa redukuje potencijal amfifilne hidrofobne asocijacije.

U koncentracijama iznad CMC, žučne kiseline formiraju male tzv. primarne micelle (2-10 agregacionih jedinica), dok pri višim koncentracijama nastaju sekundarne micelle koje nastaju agregacijom primarnih. Pored strukture žučnih kiselina, na veličinu i oblik agregata utiču i uslovi sredine: pH, temperatura i jonska snaga rastvora. Dodavanje elektrolita redukuje repulzivne elektrostatske interakcije između naelektrisanih grupa, smanjujući CMC i promovišući formiranje micela. Snižavanje pH do vrednosti bliskih pK_a žučnih kiselina dovodi do parcijalnog protonovanja anjona žučnih kiselina povećavajući CMC. Osim toga pK_a vrednosti žučnih kiselina su značajno više u micelarnim agregatima u odnosu na monomerni oblik usled elektrostatskog efekta (12).

Razlike u polihidroksilaciji utiču na liposolubilnost žučnih kiselina, modulirajući ne samo deterđžentski potencijal nego i farmakokinetika i farmakodinamska svojstva: CMC, fizičko-hemijske osobine micelarnih ili vezikularnih agregata, solubilizaciju lipidnih membrana, sposobnost penetracije kroz biološke membrane, vezivanje za biomolekule (fosfolipide, albumine, jonske kanale, receptore), pasivnu intestinalnu apsorpciju i hepatičko preuzimanje, membranotoksično i membranolitičko dejstvo (15, 16). Oktanol/voda particioni koeficijent (LogPo/w ili logDo/w u slučaju jonizovanih oblika) je najčešće korišćen parametar vezan za lipofilnost kojim se predviđa aktivnost i toksičnost žučnih kiselina u kompleksnom biološkom okruženju. Veći broj hidroksilnih supstituenata uslovljava nižu LogP vrednost, a ova tendencija je relevantnija u slučaju kada su hidroksilne grupe orjentisane na α -strani steroidnog nukleusa (13).

Brojna istraživanja su doprinela razumevanju kako specifične hemijske modifikacije steroidnog jezgra i bočnog lanca žučnih kiselina indukuju različite konformacione promene koje zatim menjaju fizičko-hemijska svojstva, metaboličke osobine, distribuciju u različitim telesnim kompartmanima i tkivima i (cito)toksični profil novih analoga (17-21). Razumevanje odnosa strukture i fizičko-hemijskih i fizioloških osobina su ključni faktori koji mogu da doprinesu identifikaciji novih derivata žučnih kiselina sa povoljnim farmakodinamskim i farmakokinetičkim karakteristikama, kao molekula kandidata za ispitivanje u prekliničkim i kliničkim studijama.

1.1.2. Metabolizam žučnih kiselina

1.1.2.1. Sinteza primarnih žučnih kiselina

Sinteza žučnih kiselina predstavlja dominantan metabolički put katabolizma holesterola. Konverzija holesterola u žučne kiseline obuhvata multipli enzimski proces pri čemu hepatociti sadrže celokupan set od 17 enzima neophodnih za modifikaciju holesterolskog steroidnog jezgra, uklanjanje bočnog lanca i konjugaciju sa glicinom (~75%) i taurinom (~25%), pri čemu nastaju primarne žučne kiseline – ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- 5β -holan-24-oična kiselina (CA) i $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi- 5β -holan-24-oična kiselina (CDCA) (22). Konverzija holesterola u žučne kiseline obuhvata procese hidroksilacije, saturacije dvostruke veze između C5-C6, epimerizaciju C3-hidroksilne grupe i oksidativno uklanjanje tri ugljenične jedinice bočnog lanca. Navedene

biosintetske reakcije se odvijaju u endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijama, citoplazmi i peroksizomima.

Biosinteza žučnih kiselina se odvija preko četiri različita puta: klasičnog, alternativnog, *Yamasaki* puta i puta 25-hidroksilacije (**slika 1.1.2.1**) (22). Međutim, tačan redosled biosintetskih koraka još uvek nije definisan budući da su mnogi intermedijeri supstrati za iste enzime. Takođe, transport žučnih kiselina i intermedijera između različitih subcelularnih kompartmana i toku biosinteze još uvek nije dovoljno poznat.

1.1.2.1.1. Klasični put biosinteze žučnih kiselina

Klasični ili neutralni put kaskade sinteze žučnih kiselina je najvažniji biosintetski mehanizam, odgovoran za produkciju 90% ukupne količine žučnih kiselina. Ovim putem se CA i CDCA sintetišu u gotovo podjednakim količinama. Holesterol 7 α -hidroksilaza (CYP7A1) je ključni enzim ovog kataboličkog puta koji determiniše veličinu pula žučnih kiselina katalizujući hidroksilaciju holesterola u 7 α -hidroksiholesterol (**slika 1.1.2.1**). Modifikacija steroidnog prstena prethodi oksidativnom skraćivanju alifatičnog bočnog lanca. 3 β -hidroksi- Δ^5 -C₂₇-steroid oksidoreduktaza (HSD3B7) konvertuje 7 α -hidroksiholesterol u 3-okso- Δ^4 -oblik nakon čega Δ^4 -3-oksosteroid-5 β -reduktaza (AKR1D1) redukuje Δ^4 -dvostruku vezu dovodeći do stvaranja 5 β -vodonične konfiguracije. Krajnji korak u modifikaciji strukture prstena je redukcija 3-okso grupe u 3 α -hidroksilnu grupu pomoću enzima 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaza (AKR1C4).

Ukoliko se na položaju C12 odvijuje hidroksilacija pomoću sterol 12 α -hidroksilaze (CYP8B1) kao finalni proizvod nastaje CA, međutim, ukoliko ne dođe do hidroksilacije na ovom položaju nastaje CDCA. Prema tome, aktivnost CYP8B1 determiniše ukupnu hidrofobnost pula žučnih kiselina budući da je CA hidrofilnija u poređenju sa CDCA (1). Nakon modifikacije strukture prstena formira se karboksilna grupa u C27 položaju pomoću mitohondrijalne sterol 27-hidroksilaze (CYP27A1), formirajući C27 žučne intermedijere: 3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -holestanoična kiselina (DHCA) i 3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β -holestanoična kiselina (THCA) (23). C27 žučni intermedijeri se zatim aktiviraju u odgovarajuće koenzim A (CoA) estre pomoću dva enzima lociranih u endoplazmatskom retikulumu: žučna kiselina-CoA sintetaza (BACS) i acil-CoA sintetaze veoma dugog lanca. Aktivirani CoA C27 žučni estri se nakon toga transportuju u peroksizome pomoću proteina 70 peroksizomalne membrane (PMP70, *ABCD3*) gde se, pre

skraćivanja bočnog lanca hiralni ugljenik C25 racemizuje iz R- u S- konfiguraciju pomoću α -metilacil CoA racemaze (AMACR), nakon čega bočni lanac može da bude skraćen peroksizomalnom β -oksidacijom. U peroksizomima, (D/T)HC-CoA se oksidiše pomoću acil CoA oksidaze 2 (ACOX2) formirajući dvostruku vezu na poziciji C24. Ova dvostruka veza se hidrira u 24-hidroksi-(D/T)HC-CoA nakon čega sledi dehidrogenacija u 24-keto(D/T)HC-CoA, a obe reakcije katališe D-bifunkcionalni protein (DBP). Tiolitičkim odvajanjem nastalog ketona pomoću sterolskog nosača proteina X (*Sterol Carrier Protein X*, SCPx) stvara se propionil-CoA, CDCA-CoA ili CA-CoA.

1.1.2.1.2. Alternativni put biosinteze žučnih kiselina

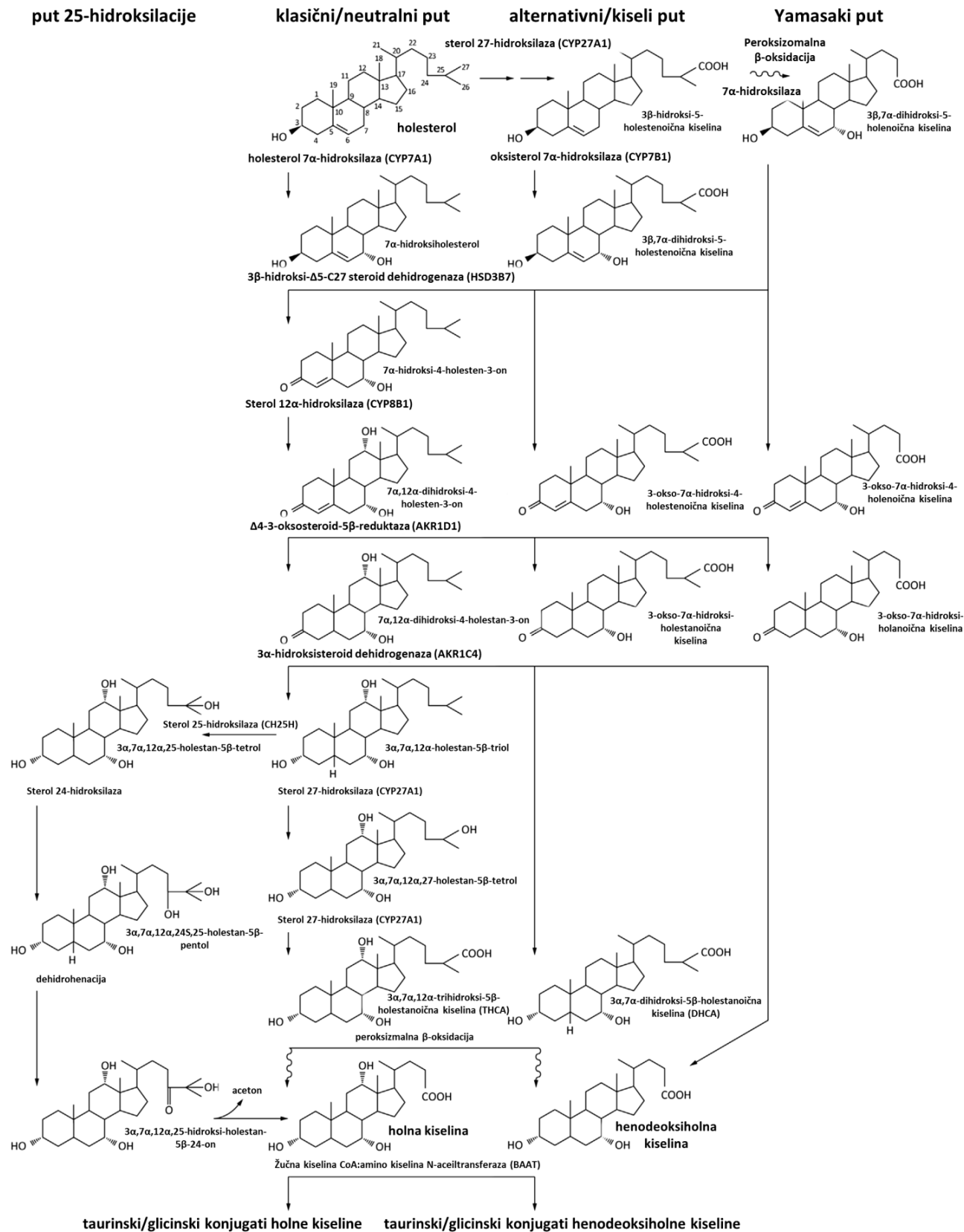
Alternativni put (poznat još i kao kiseli put zbog sinteze kiselih intermedijera) podrazumeva konverziju C27 žučnih kiselina kao i oksisterola nastalih u različitim tipovima ćelija koji se zatim transportuju do jetre i metabolišu do žučnih kiselina. Mitohondrijalna CYP27A1 i mikrozomalna oksisterol 7α -hidroksilaza (CYP7B1) su ključni enzimi koji omogućavaju skraćivanje bočnog lanca u C24 žučne kiseline i 7α -hidroksilaciju u hepatocitima pri čemu u najvećem procentu nastaje CDCA (**slika 1.1.2.1**) (24, 25). Alternativnim putem se sintetiše manje od 10% ukupne količine žučnih kiselina. Smatra se da je alternativni put značajno aktivniji u dečijem uzrastu, dok kasnije tokom života klasični put dobija na značaju u doprinosu kompozicije pula žučnih kiselina (26).

1.1.2.1.3. Yamasaki biosintetski put

U *Yamasaki* putu biosinteze prve reakcije se odvijaju slično alternativnom putu rezultujući u formiranju C24 žučne kiseline i 3β -hidroksi -5-holenoične kiseline, nakon čega slede strukturne modifikacije steroidnog prstena. Kod ljudi, 7α -hidroksilacija pre ili posle peroksizomalne β -oksidacije rezultuje u formiranju $3\beta,7\alpha$ -dihidroksi-5-holenoične kiseline, prekursora CDCA, kao najznačajnijeg produkta u ovom biosintetskom putu (**slika 1.1.2.1**). Još uvek nije dovoljno jasan doprinos *Yamasaki* biosintetskog puta, međutim, prisustvo monohidroksi žučnih kiselina u fetalnoj žuči i relativno visoke koncentracije ovih žučnih kiselina u mekonijumu i amnionskom fluidu sugerišu na značaj ovog puta u toku razvoja (27).

1.1.2.1.4. 25-hidroksilacioni put biosinteze žučnih kiselina

Sinteza C24 žučnih kiselina nakon strukturnih modifikacija prstena, bez potrebe za 27-hidroksilacijom i posledičnim β -oksidacijom podrazumeva 25-hidroksilacioni put biosinteze. Mikorozomalna 25-hidroksilaza (CH25H) katališe stvaranje $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- 5β -holestan-25-tetrola koji dalje hidroksilacijom na položaju 24 prelazi u 24S-pentol, a zatim dehidrogenacijom nastaje 24-okso-tetrol koji se razgrađuje na CA i aceton (**slika 1.1.2.1**) (28).



Slika 1.1.2.1. Putevi biosinteze žučnih kiselina. Preuzeto i modifikovano iz Vaz i sar.

1.1.2.2. Konjugacija sa glicinom i taurinom i bilijarna sekrecija žučnih kiselina

Žučne kiseline se ne izlučuju u žučne kanalikule kao slobodne karboksilne kiseline, nego se prethodno karboksilna grupa aktivira pomoću acetyl CoA, a zatim se nastali ester povezuje amidnom vezom sa aminokiselinama glicinom ili taurinom. Ovaj proces kataliziraju enzimi žučna kiselina-CoA sintetaza (*Bile Acid CoA Synthetase*, BACS) i žučna kiselina-CoA:aminokiselina N acetyl transferaza (*Bile Acid-CoA:Amino Acid N-acyltransferase*, BAAT). Amidna veza povećava jonizacionu konstantu žučnih kiselina ($pK_a \sim 5$) tako da konjugati glicina imaju pK_a vrednost oko 3 (pri koncentracijama ispod CMC) dok prisustvo sulfonske grupe taurina obezbeđuje $pK_a < 2$. Konjugacijom se redukuje mogućnost precipitacije žučnih soli, a takođe se i povećava hidrofilnost molekula sa posledično redukovanom potencijalom prolaska kroz ćelijsku membranu i smanjenim citotoksičnim i membranolitičkim svojstvima (29).

Za razliku od slobodnih žučnih kiselina koje mogu da difunduju kroz ćelijsku membranu, konjugati sa glicinom ili taurinom, žučne soli, se prenose aktivnim transportom pomoću ATP-vezujućih kasetnih proteina (*ATP-binding cassette*, ABC) (**slika 1.1.2.2**). Sekrecija žučnih soli iz hepatocita u lumen bilijarnih kanalikula je posredovana pomoću dva ABC transportera: pumpe za eksport žučnih soli, BSEP (*Bile Salt Export Pump*, ATP-vezujuća kasetna subfamilije B član 11 (ABCB11), koji kodira ABCB11 gen), i multirezistencija-udruženim proteinom-2, MRP2 (*Multidrug Resistance-Associated Protein-2*, ATP-vezujuća kasetna subfamilije C član 2 (ABCC2), koji kodira ABCC2 gen) koji predstavljaju osnovni mehanizam lučenja žuči (30). Mutacije gena koji kodira BSEP su odgovorne za razvoj progresivne familijarne intrahepatičkeolestaze tipa 2 i kumulacije toksičnih žučnih kiselina u hepatocitima, dok mutacije u MRP2 se nalaze u osnovi *Dubin-Johnson*-ovog sindroma (31, 32).

1.1.2.3. Intestinalna faza biotransformacije žučnih kiselina

Sekrecijom holecistokinina nakon ingestije obroka koji sadrži masti, žučne kiseline se oslobađaju iz žučne kesice u duodenum i u intestinalnom lumenu učestvuju u formiranju mešoviti micela koje sadrže holesterol, fosfolipide i žučne soli interkalirane između polarnih glava fosfolipida. Formiranje micela olakšava digestiju i apsorpciju lipida i liposolubilnih vitamina iz hrane i olakšava dejstvo enzima pankreasa. Intestinalna mikroflora ima izuzetno značajan uticaj na metabolizam žučnih kiselina sa primarnim ciljem smanjenja njihove

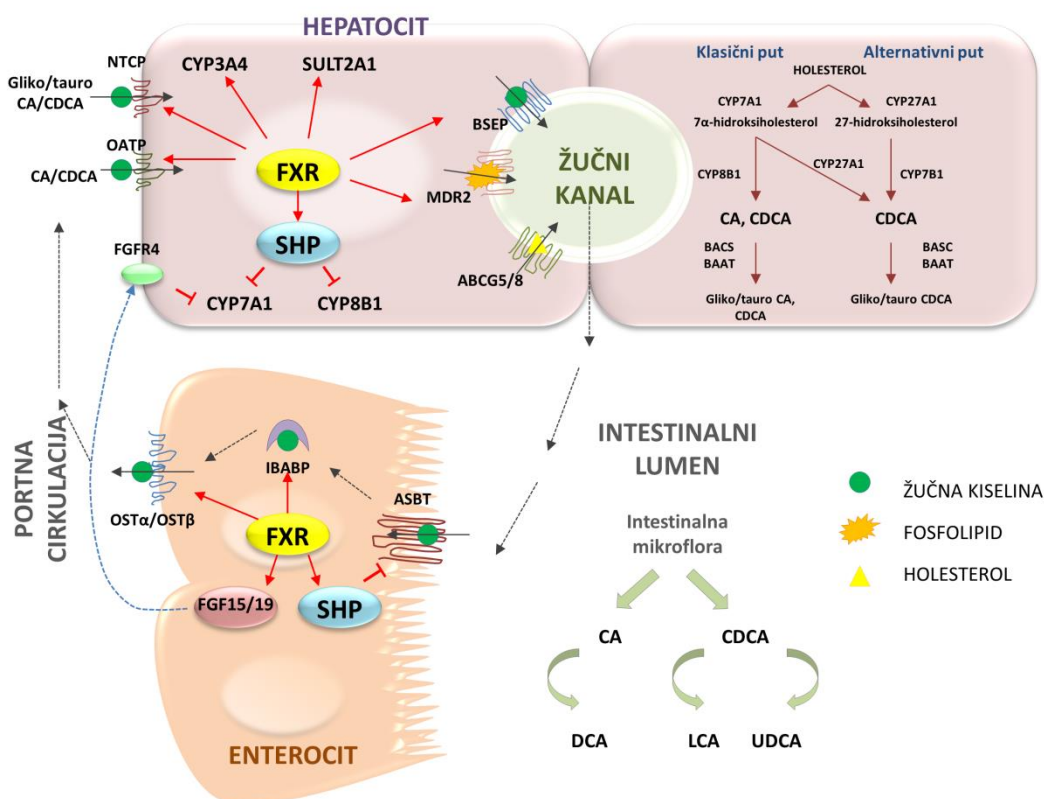
baktericidne aktivnosti. U lumenu ileuma i kolona konjugovane žučne kiseline podležu procesu dekonjugacije pod dejstvom bakterijskih hidrolaza. Dekonjugovane žučne kiseline zatim podležu 7 α -dehidroksilaciji pod dejstvom enzima anaerobne mikroflore što rezultuje stvaranjem sekundarnih žučnih kiselina od primarnih. 7 α -dehidroksilacijom CA nastaje 3 α ,12 α -dihidroksi-5 β -holan-24-oična kiselina odnosno deoksiholna kiselina (DCA) od CA, dok 7 α -dehidroksilacijom CDCA nastaje 3 α -hidroksi-5 β -holan-24-oična kiselina, tj, litholna kiselina (LCA) (**slika 1.1.2.2**). Druge promene u strukturi žučnih kiselina obuhvataju oksidaciju hidroksilnih grupa u okso grupe, epimerizaciju C3, C7 ili C12 hidroksilnih grupa i izomerizaciju spoja između prstenova A/B (33, 34). Sojevi klostridija omogućavaju epimerizaciju 7 α -hidroksilne grupe CDCA u 7 β epimer, UDCA (3 α ,7 β -dihidroksi-5 β -holan-24-oičnu kiselinu), sa svojstvima povoljnim kako za organizam domaćina tako i za intestinalne bakterije (35, 36).

1.1.2.4. Enterohepatička recirkulacija i ekskrecija žučnih kiselina

Dekonjugovane žučne kiseline se reapsorbuju pasivno, dok se oko 95% efektivno resorbuje na nivou distalnog ileuma pomoću apikalnog Na-zavisnog transportera žučnih kiselina, ASBT (*Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter*, koji kodira SLC10A2 gen), lokalizovanog u apikalnoj membrani enterocita. Intestinalni vezujući protein za žučne kiseline, IBAB-P (*Intestinal Bile Acid-Binding Protein*, gastrotropin, kodiran genom FABP6) omogućava trans-enterocitni transport žučne kiseline, dok na bazolateralnom polu ilealnih enterocita heterodimerni OST α/β (*Organic Solute Transporter α/β*) omogućava njihov efluks u portnu cirkulaciju. Žučne soli se vezane za albumin transportuju do hepatocita koji ih preuzimaju pomoću Na⁺-zavisnog kotransportera žučnih kiselina, NTCP (*Sodium-Dependent Bile Acid Transporter*, koji kodira SLC10A1 gen), dok se nekonjugovane žučne kiseline preuzimaju pomoću Na⁺-nezavisnih multispecifičnih transportera organskih anjona (*Organic Anion Transporters* (OATPs) i SLC21A transportnog proteina), lokalizovanih u membrani sinusoidalnog pola hepatocita (**slika 1.1.2.2**) (37). Sastav pula žučnih kiselina (konjugovanih - nakon oslobađanja iz holeciste i dekonjugovanih pod dejstvom intestinalne mikroflore u lumenu intestinuma) zavisi od dostupnosti nutrijenata odnosno stanja sitosti i gladi i sastoji se od približno 30% CA, 40% CDCA, 20-30% DCA i manje od 5% LCA (38).

Usled visoke citotoksičnosti, LCA predstavlja species žučnih kiselina koji se najviše ekskretuje fecesom. Mala količina LCA koja se recirkulacijom vrati u jetru, pre ponovne

bilijarne sekrecije podleže sulfokonjugaciji na 3-hidroksi poziciji pomoću sulfotransferaze 2A1 (SULT2A1). Sulfokonjugovane žučne kiseline se gotovo ne reapsorbiraju pomoću najznačajnijih transportnih proteina i eksretuju se iz organizma (39). U glomerulima bubrega, žučne kiseline se filtriraju u primarni urin nakon čega se u gotovo u potpunosti reapsorbiraju pomoću ASBT transportera u četkastoj membrani proksimalnih renalnih tubulocita.



Slika 1.1.2.2. Regulacija biosinteze i enterohepatičke recirkulacije žučnih kiselina.

Pul žučnih kiselina (ukupna količina oko 1,5-4 g) se reciklira 4-14 puta u toku dana. Frakcija koja se ekskretuje fecesom po ciklusu (oko 5% tj. 0,2-0,6 g/dan) se kompenzuje *de novo* sintezom iz holesterola – mehanizmom koji u značajnoj meri reguliše koncentraciju holesterola u plazmi. Iako je frakcioni gubitak po ciklusu relativno mali, dnevna količina novosintetisanih žučnih kiselina u organizmu odrasle osobe iznosi oko 500 mg što predstavlja oko 50% obrta holesterola. Posledično, interupcija enterohepatičke recirkulacije žučnih kiselina i povećano

izlučivanje putem fecesa primenom sekvestranata žučnih kiselina predstavlja jednu od terapijskih strategija regulacije hiperholesterolemije. Dakle, u stanju ravnoteže, ekskrecija žučnih kiselina fekalnim putem je jednaka produkciji žučnih kiselina u jetri (23, 40).

1.1.3. Žučne kiseline kao signalni molekuli

Enterohepatička recirkulacija povećava transhepatički fluks žučnih kiselina. Žučne kiseline sekretovane u intestinalni lumen kao i fluks reapsorbovanih žučnih kiselina aktivira nuklearne receptore u hepatocitima i enterocitima, pre svega FXR, kao i membranski TGR5 receptor (5, 41, 42). Aktivacijom FXR žučne kiseline regulišu ekspresiju gena uključenih u regulaciju sopstvene biosinteze, transporta i enterohepatičke recirkulacije, omogućavajući održavanje količina u bilijarnom stablu i intestinalnom lumenu dovoljnim za emulgovanje lipida iz hrane, ali i sprečavajući intrahepatičku kumulaciju u nivoima koji bi doveli do hepatocelularnog oštećenja. Osim toga, aktivacijom navedenih receptora žučne kiseline imaju ulogu endokrinih, signalnih, molekula koji regulišu metabolizam glukoze, lipoproteina, ćelijske proliferacije i apoptoze, inflamacije i karcinogeneze (43-55). Hepatocelularno preuzimanje žučnih kiselina iz portne cirkulacije je nepotpuno i mala frakcija žučnih kiselina se preliva u sistemsku cirkulaciju (približno 2-10 μM) (1). Ova, koncentracija je dovoljna za stupanje u interakciju sa FXR, PXR, CAR, TGR5 i drugim receptorima u različitim tkivima čime se omogućuju sistemski efekti žučnih kiselina u tkivima izvan enterohepatičkog sistema (44, 56, 57).

1.1.4. Farnezoid x receptor - molekularna biologija i funkcija

Od ukupno 49 trenutno identifikovanih nuklearnih receptora, humani FXR pripada podgrupi metaboličkih receptora- FXR ima ulogu „senzora“ u održavanju homeostaze žučnih kiselina, sprečavanjem njihove kumulacije u hepatocitima u toksičnim koncentracijama. Kod sisara su identifikovana dva FXR gena, označenih kao *FXR α* (nuklearni receptor subfamilija 1 grupa H član 4, NR1H4) i *FXR β* . *FXR β* je pseudogen kod čoveka, a pretpostavlja se da ima ulogu senzora lanosterola kod glodara i pasa. Humani *FXR α* gen (89.96 kb) (u daljem tekstu *FXR*) se nalazi na 12q23.1 lokusu i sadrži 14 egzona. *NR1H4* kodira sintezu četiri izoforme FXR proteina (FXR α 1-4) što nastaje kao rezultat aktivacije dva promotera koji iniciraju transkripciju počevši od egzona 1 ili egzona 3, a zatim i alternativnog splajsinga na nivou mRNA između

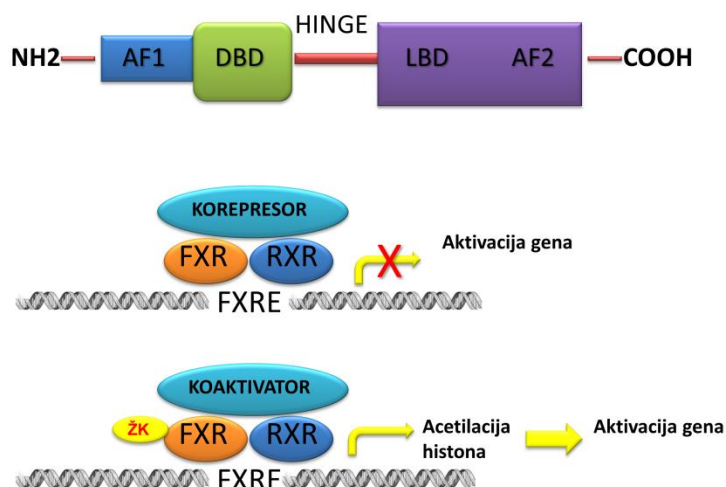
egzona pet i šest što dovodi do razlika u aminokiselinskoj sekvenci i strukturi proteina (58). Ekspresija FXR je najizraženija u enterohepatičkim tkivima, ali i u drugim tkivima uključujući renalne tubulocite, ćelije nadbubrežnih žlezda, ćelije endokrinog pankreasa, adipocite, kardiomiocite, vaskularne endotelne i glatke mišićne ćelije, ćelije imunog sistema, gonade i druga tkiva (59-61).

Sve izoforme FXR proteina imaju strukturu tipičnog nuklearnog receptora koji se sastoji od ligand-nezavisnog amino-terminalnog AF-1 aktivirajućeg domena, DNA-vezujućeg domena, spojnice (*hinge region*), ligand-vezujućeg domena i karboksi-terminalnog ligand-zavisnog AF-2 domena (**slika 1.1.4**). Ligand-vezujući domen sadrži mesta za interakciju sa koregulatornim molekulima. Visoko konzervisani DNA-vezujući domen na amino terminusu sadrži dva cink fingera kojima se vezuje za specifične sekvence na DNA, FXREs (*FXR-Response Elements*). DNA sekvence prepoznate kao FXREs se sastoje od dve kopije heksanukleotida, AGGTCA, organizovanih kao invertno-ponavljajuće sekvence (*Inverted Repeat*, IR) razdvojene jednim nukleotidom, IR-1. FXR se takođe vezuje i za druge FXRE kao što su IR-0, direktno ponavljajuće sekvence razdvojene jednim nukleotidom, DR-1, ili evertno-ponavljajuće sekvence razdvojene sa 8 nukleotida, ER-8 (62).

FXR se vezuje za FXRE ili kao monomer ili kao heterodimer sa receptorom 9-cis-retinoične kiseline RXR (NR2B1), zajedničkim partnerom različitih nuklearnih receptora. Heterodimerna konfiguracija je najčešća i generalno rezultuje aktivacijom ekspresije gena dok je vezivanje monomerne forme češće povezano sa genskom represijom. Karboksi-terminalni region sadrži umereno-konzervisani ligand-vezujući domen za koji se vezuju žučne kiseline kao endogeni ligandi, ali i njihovi derivati i drugi farmakološki agensi. Region spojnice je polipeptidna sekvenca između DNA- i ligand-vezujućeg domena koja modulira aktivnost receptora nakon fosforilacije ključnih aminokiselina. Uloga AF-1 i AF-2 domena je esencijalna u transkripcionoj regulatornoj aktivnosti što se ostvaruje posredstvom interakcija sa koaktivatorima i korepresorima (**slika 1.1.4**). FXR α 1 i FXR α 2 izoforme su produkti transkripcije istog promotera, međutim FXR α 1 i FXR α 3 sadrže dodatnu inserciju aminokiselina (MYTG) unutar regiona spojnice, kao rezultat alternativnog splajsinga. FXR α 3 i FXR α 4 su produkti transkripcije drugog promotera sa dužim AF-1 domenom u poređenju sa FXR α 1 i FXR α 2 (63).

Četiri izoforme FXR imaju različite transaktivaciona svojstva, ali fiziološka relevantnost ovih razlika još uvek nije poznata.

FXR je ligand-zavisni transkripcioni faktor. U odsustvu liganda represija transkripcije se postiže interakcijom FXR/RXR heterodimera sa LXXXIXXX(I/L) sekvencom (L-leucin, I-izoleucin, a X bilo koja druga aminokiselina) korepresora. Nakon vezivanja liganda dolazi do konformacionih promena FXR-a u AF-2 regionu i odvajanja korepresora i interakcija sa LXXLL sekvencama koaktivatora (tzv. *nuclear receptor boxes*) uključujući steroidni receptor koaktivator -1 (SRC-1), protein arginin metiltransferazu-1 (PRMT-1) i peroksizom-proliferator-aktivisani receptor- γ (PPAR γ) koaktivator-1 α (PGC-1 α) (58). Aktivacija ovih proteina dovodi do remodelovanja strukture hromatina, aktivacije transkripcione mašinerije i aktivacije genske ekspresije. Aminokiselinska sekvenca odgovorna za interakciju između receptora i liganda je konzervisana između vrsta. Iako ligand-vezujući domen FXR-a ima oblik 12 α -heliksa, slično drugim nuklearnim receptorima, otkrivena je specifičnost u vezivanju žučnih kiselina za FXR koje se vezuju u reverznoj orijentaciji u odnosu na ligande drugih nuklearnih receptora (64). Takođe, kada je vezan za ligand, FXR ima dva mesta za interakcije sa LXXL sekvencama što rezultuje u kooperativnom povećanju afiniteta interakcije sa koaktivatorima (58).



Slika 1.1.4. Molekularna struktura gen-regulatorna uloga farnezoid X receptora.

1.1.4.1. Žučne kiseline kao agonisti farnezoid x receptora

FXR je identifikovan 1995. godine kao novi RXR-vezujući protein-14 aktiviran pomoću farnezola, međutim, najvažnije otkriće je postignuto 1999. godine kada su žučne kiseline, identifikovane kao najpotentniji endogeni ligandi ovog receptora u opsegu fizioloških koncentracija. Kako konjugovane tako i nekonjugovane žučne kiseline su ligandi za FXR pri čemu se aktivacija receptora ostvaruje interakcijom hidrofobne strane žučne kiseline sa hidrofobnim džepom 12 α -heliksa ligand-vezujućeg domena. Afinitet prema receptoru zavisi od strukturnih i fizičko-hemijskih svojstava žučnih kiselina i obrnuto je proporcionalan hidrofilnosti. CDCA najpotentniji endogeni agonista sa EC₅₀ od 10-50 μ M (65). CA i sekundarne kiseline DCA i LCA su manje potentni ligandi za FXR dok su za hidrofilnu UDCA studije pokazale da ili ne ispoljava efekte prema FXR ili je slab modulator funkcije ovog nuklearnog receptora (66).

Steroidni nukleus žučnih kiselina ima blago zakrivljen oblik sa hidrofobnom konveksnom β -površinom i hidrofilnom α -površinom na kojoj se nalaze hidroksilne grupe. Amfifilna svojstva molekula su esencijalna za vezivanje za FXR budući da je deo ligand-vezujućeg domena FXR proteina izgrađen od hidrofobnih aminokiselinskih rezidua koje stupaju u interakciju sa hidrofobnom β -površinom pomoću *Van der Waals*-ovih interakcija, dok je suprotni deo domena izgrađen od hidrofobnih i hidrofilnih rezidua neophodnih za uspostavljanje vodonične veze sa hidrofilnom α -površinom. Humane primarne i sekundarne žučne kiseline imaju identičnu β -površinu (osim UDCA), međutim, razlika u broju i stereo-orijentaciji hidroksilnih grupa značajno uslovljava različit afinitet za vezivanje za FXR. Aksijalna hidroksilna grupa na C7 položaju je odgovorna za formiranje dve vodonične veze, sa bočnim lancima tirozina-366 i serina-329 (18). β -orijentacija hidroksilne grupe na C7 položaju u molekulu UDCA je u položaju suprotnom od ligand-vezujućeg domena i nemogućnost formiranja vodonične veze sa tirozin-366 reziduom rezultuje u nemogućnosti aktiviranja receptora (67). Konjugacija žučnih kiselina sa glicinom ili taurinom povećava hidrofilnost molekula (smanjujući intrinzički citotoksični potencijal molekula), ali smanjuje i afinitet za vezivanje za FXR. Iako žučne soli (konjugati) čine 98% svih žučnih specija u bilijarnom sistemu, žučne soli ipak mogu aktivirati FXR u svim tipovima ćelija koje eksprimiraju transmembranske transportne proteine za import, dok slobodne,

nekonjugovane žučne kiseline koje slobodno difunduju kroz ćelijsku membranu mogu aktivirati receptor u svim tipovima ćelija (68).

1.1.4.2. Farnezoid x receptor kao senzor i regulator metabolizma žučnih kiselina

Kao regulator transkripcije, FXR ima centralnu ulogu u održavanju homeostaze žučnih kiselina regulacijom svakog aspekta njihovog metabolizma uključujući sintezu, transport, enterohepatičku recirkulaciju i detoksikaciju (**slika 1.1.2.2**). Žučne kiseline aktiviraju FXR čime se smanjuje ekspresija CYP7A1, ključnog enzima u sintezi ovih biomolekula. Supresija CYP7A1 se postiže na dva načina. U hepatocitima FXR deluje indirektno preko malog heterodimernog partnera (*Small Heterodimer Partner*, SHP), orfan receptora koji nema DNA vezujući domen i ispoljava aktivnost transkripcionog represora. SHP formira nefunkcionalni heterodimerni kompleks sa pozitivnim CYP7A1 regulatorom, LRH-1 (*Liver-Related Homolog-1*, NR5A2 ili humani α -fetoprotein transkripcioni faktor). Inhibicija LRH-1 je parcijalno posredovana aktivacijom sirtuina-1 sa aktivnošću histon deacetilaze. Osim prema LRH-1, SHP ispoljava antagonistički efekat prema hepatocitnom nuklearnom faktoru-4 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* , HNF4 α , NR2A1), pozitivnim regulatorom CYP7A1 i CYP8B1 (69, 70).

Reapsorbovane žučne kiseline takođe aktiviraju FXR u ilealnim enterocitima čime se indukuje transkripcija enterokina, faktora rasta fibroblasta-19 (*Fibroblast Growth Factor*, FGF19, odnosno rodentni FGF15 ortolog) koji se sekretuje u portnu cirkulaciju, dolazi do jetre i vezuje se za FGFR4, hepatocitni transmembranski tirozin kinazni FGF15/19 receptor-4, i njegov koreceptor β -Klotho, koji zatim inhibišu ekspresiju CYP7A1 preko c-Jun N terminalna kinaza (JNK) i ekstracelularnim signalima-regulisana kinaza 1/2 (ERK1/2) –posredovanim putevima (71). Za razliku od FGF15, FGF19 je prisutan u humanoj jetri i cirkulaciji u detektabilnim koncentracijama (1). Iako su signalni mehanizmi preko enterokina FGF19 esencijalni u negativnoj regulaciji sinteze žučnih kiselina, trans-intestinalni fluks žučnih kiselina preko ovog enterokina kontroliše i druge brojne aspekte humanog metabolizma. Pokazano je da FGF19 povećava bazalni metabolizam i redukuje telesnu masu u animalnim modelima, smanjuje adipozitet i poboljšava prenos insulinskih signala, poboljšavajući hepatički lipidni metabolizam ispoljavajući povoljne efekte na komponente metaboličkog sindroma (59, 72-74).

FXR je takođe ključni regulator transporta žučnih kiselina u enterohepatičkim tkivima sa uticajem na ekspresiju membranskih i citoplazmatskih transportnih proteina na nivou enterocita i hepatocita (31). U cilju prevencije kumulacije u toksičnim koncentracijama FXR smanjuje hepatocitno preuzimanje žučnih kiselina pomoću NTCP i OATP, indirektno, SHP-posredovanom represijom, dok se istovremeno promovise bilijarni efluks iz hepatocita povećanjem ekspresije BSEP i MRP2, ali i efluks u sistemska cirkulaciju preko OST α/β heterodimera. Aktivacija FXR ograničava i enterocitno preuzimanje žučnih kiselina SHP-zavisnim smanjenjem ekspresije ASBT, dok direktno povećanje ekspresije IBAB-P i bazolateralnog OST α/β poboljšava transport reapsorbovanih žučnih kiselina u portnu cirkulaciju (**slika 1.1.2.2**) (33). Kompleksna mreža FXR-aktivisane intestinalno-hepatičke signalne osovine prevenira kumulaciju toksičnih koncentracija žučnih kiselina, istovremeno održavajući dovoljne količine u bilijarnom stablu i intestinalnom lumenu za potrebe digestije i apsorpcije lipida.

Interakcijom sa nuklearnim receptorima žučne kiseline na transkripcionom nivou regulišu ekspresiju enzima uključenih u njihovu detoksikaciju. Kumulacija žučnih kiselina indukuje enzimske mehanizme faze I (hidroksilacija pomoću CYP3A4) i faze II (sulfokonjugacija i glukuronidacija katalisane pomoću SULT2A1 i uridin difosfat glukuronil transferaze-2B4 (UGT2B4)) pri čemu su ovi mehanizmi pozitivno regulisani pomoću FXR (75). Pored navedenih mehanizama, toksična LCA aktivira i nuklearni PXR u jetri i intestinumu i povećava ekspresiju transportnih proteina faze III biotransformacije (76).

1.1.4.3. Klinička primena semisintetskih derivata žučnih kiselina kao selektivnih modulatora farnezoid x receptora

Tokom protekle decenije istraživači iz akademija i farmaceutskih kompanija su prepoznali FXR kao potencijalnu farmakološku metu. S obzirom na činjenicu da žučne kiseline aktiviraju brojne nuklearne receptore, uložen je značajan napor u identifikaciji selektivnih FXR agonista pri čemu su dizajnirani brojni steroidni i nesteroidni modulatori funkcije ovog receptora. Među steroidnim modulatorima, derivati žučnih kiselina su se pokazali izuzetno efikasnim. Uvođenje etil grupe na C6 položaj u molekulu CDCA rezultovalo je u sintezi 6 α -etil-henodeoksiholne ili obetiholne kiseline (OCA, INT-747), selektivnog semisintetskog agoniste FXR koja sa EC₅₀ od 99 nM ima oko sto puta veći afinitet u poređenju sa najpotentnijim endogenim agonistom, CDCA. OCA predstavlja jedan od najčešće korišćenih liganda in vitro i

in vivo u dešifrovanju i razumevanju FXR signalne mreže. U toku pretkliničkih studija OCA je ispoljila pozitivan terapijski efekat na modelima estrogenski-indukovane holestaze, fibroze jetre, nealkoholnog steatohepatitisa, portne hipertenzije, intestinalne inflamacije i narušenog integriteta intestinalne barijere u toku holestaze, zatim na insulinsku signalizaciju, metabolizam masnog tkiva, aterosklerozi, autoimuni encefalomijelitis, pri čemu se broj potencijalnih indikacija povećava kontinuirano (2, 77-81). U kohorti pacijenata sa tipom 2 diabetes mellitus-a i nealkoholnom steatohepatozom primena OCA je poboljšala insulinsku senzitivnost i dovela do redukcije markera hepatičke inflamacije i fibroze (ClinicalTrials.gov, Br: NCT00501592) (82). U drugoj studiji OCA je poboljšala simptome hronične dijareje uzrokovane malapsorpcijom žučnih kiselina, smanjenjem sinteze žučnih kiselina aktivacijom FGF19 u ileumu (ClinicalTrials.gov, Br: NCT01585025) (83). U toku FLINT studije primena OCA je takođe poboljšala histološke karakteristike jetre pacijenata sa nealkoholnim steatohepatitisom (NASH) (ClinicalTrials.gov, Br: NCT01265498) (84). U toku faze II randomizovane kliničke studije koja je uključivala pacijente sa PBC koji nisu adekvatno reagovali na terapiju sa UDCA, primena OCA je ispoljila pozitivne terapijske efekte i dovela do smanjenja serumskih biohemijskih markera oštećenja hepatocita (ClinicalTrials.gov, Br: NCT00550862) (85). Najčešće prijavljeni neželjeni efekat nakon administracije OCA je bio pruritus koji je kod 40% pacijenata doveo do prekida dalje primene OCA. Takođe, drugi neželjeni efekat kod ovih pacijenata predstavlja pojava umerenog povećanja ukupnog holesterola i frakcije lipoproteina male gustine (*Low-Density Lipoprotein*, LDL) kao i umereno smanjenje frakcije lipoproteina velike gustine (*High-Density Lipoprotein*, HDL). Međutim, neophodno je uporediti benefite i potencijalne rizike primene OCA u studijama koje uključuju veći broj pacijenata budući da su se zabeležene alteracije serumskog lipoproteinskog statusa javljale brzo, bile relativno male amplitude i povlačile se nakon prestanka primene OCA.

1.1.5. Citotoksična i citoprotektivna svojstva žučnih kiselina

Hidrofobnost žučnih kiselina je svojstvo koje determiniše toksična ali i protektivna svojstva molekula i koje zavisi od broja, položaja i stereo-orijentacije hidroksilnih grupa oko steroidnog nukleusa, kao i amidacije C-24 položaja. Prema stepenu hidrofobnosti žučne kiseline se mogu rangirati u sledećem rastućem nizu: UDCA < CA < CDCA < DCA < LCA. Žučne kiseline imaju potencijal indukcije ćelijske smrti zahvaljujući nespecifičnoj deterdžentskoj

aktivnosti na nivou membranskih lipidnih komponenti, ali i preko interakcija sa receptorima medijatorima ćelijske smrti. Poznato je da retencija i kumulacija hidrofobnih žučnih kiselina u toku holestaze dovodi do oštećenja ćelijske membrane i generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), dovodeći do oštećenja funkcije hepatocita i smrti ćelije. Kumulacija nižih koncentracija žučnih kiselina može da indukuje apoptozu, dok već količina indukuje nekrozu ćelije. Takođe, kumulacija hidrofobnih žučnih kiselina u sistemske cirkulaciji može da ispolji neželjene efekte na nivou drugih ekstrahepatičkih tkiva uključujući renalne tubulocite, alveolarne ćelije pluća, ćelije placente ali i ćelije fetusa (86, 87). Istraživanja su pokazala da hidrofobnost žučnih kiselina ne mora da uvek korelira sa indukovanjem ćelijske smrti putem apoptoze, za razliku od nekroze u kojoj je korelacija prisutna (86).

1.1.5.1. Žučne kiseline i apoptoza

1.1.5.1.1. Biohemijski aspekti apoptoze

Apoptozni tip programirane ćelijske smrti je ubikvitaran visoko regulisan mehanizam ćelijske smrti, esencijalan u procesima embriogeneze i očuvanja homeostaze tkiva. Apoptoza je, za razliku od nekroze, aktivan proces regulisan različitim signalnim putevima, aktivacijom kaskade proteina i modulacijom genske ekspresije. Iako se programirana ćelijska smrt identifikuje kao sinonim za apoptozu, ona obuhvata različite kaspaza-nezavisne puteve kao što su autofagija, paraptoza, nekroptoza ili mitotiska katastrofa, pri čemu svaki od navedenih procesa zahteva angažovanje različitih organela i signalnih puteva (88).

Proces apoptoze može da se odvija preko nekoliko molekularnih puteva, ali najbolje opisani su unutrašnji put koji uključuje poremećaje funkcije mitohondrija i spoljašnji put koji zahteva aktivaciju membranskih receptora različitim ekstracelularnim stimulusima. Alternativni mehanizam apoptoze može da se aktivira kroz procese stresa endoplazmatskog retikuluma, koji je karakterisan poremećajima procesovanja i transporta proteina i homeostaze kalcijuma. Bez obzira na razlike u karakterističnim mehanizmima, svaki od ovih puteva konvergira ka aktivaciji familije cistein-zavisnih aspartatskih proteaza – kaspaza kao efektoru apoptoznog programa (89).

Unutrašnji put apoptoze pokreću različiti intracelularni stresori koji dovode do poremećaja metabolizma na nivou mitohondrija rezultujući u povećanoj permeabilnosti mitohondrijalne membrane, gubitka mitohondrijalnog membranskog potencijala, generisanja

tranzicione pore permeabilnosti mitohondrija (MPT) i oslobađanja apoptogenih faktora kao što je citohrom c. Članovi familije Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) proteina imaju izuzetno značajnu ulogu u unutrašnjem apoptotskom putu. Bcl-2 proteini imaju ulogu reostata gde se senzitivnost ćelije na dejstvo noksi zasniva na interakciji između anti- i proapoptotskih proteina familije Bcl-2 homologa (BH) koji formiraju homo- ili heterodimere. Dakle, BH proteini utiču na apoptozu kao pozitivni i negativni regulatori. U odsustvu stresora, antiapoptotski proteini Bcl-2, Bcl-xL (*B-Cell Lymphoma-extra Large*), Bcl-w su integralni membranski proteini spoljašnje mitohondrijalne membrane, dok su proapoptotski članovi familije Bax (*Bcl-2-Like Protein 4*), Bak i drugi u citoplazmi u inertnoj formi. Nakon indukcije apoptoze, Bax i Bak podležu konformacionim promenama, dolazi do oligomerizacije i transporta u mitohondrijalnu membranu gde oni direktno ili indirektno formiraju pore za oslobađanje citohroma c. Kada se nađe u citosolu, citohrom c gradi oligomer sa Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*), takozvani apoptozom, koji dovodi do dimerizacije i aktivacije inicijatora kaspaza, prokaspazu-9 koja zatim aktivira kaskadu kaspaza-3, -6 i -7 koje imaju ulogu efektoru apoptoze (90).

Spoljašnji put apoptoze se pokreće ligandima-indukovanom aktivacijom receptora ćelijske smrti lociranih na površini ćelije. Navedeni receptori pripadaju tipu 1 transmembranskih proteina superfamilije faktora tumorske nekroze (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) u koje spadaju TNF receptor-1, CD95/Fas, TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) receptori -1 i -2 kao i receptori ćelijske smrti -3 i -6. Alternativno, spoljašnji put može biti aktivisan pomoću receptora zavisnosti (*dependance receptors*), receptora koji u prisustvu odgovarajućeg liganda aktiviraju signalne puteve odgovorne za preživljavanje ćelije, migraciju i diferencijaciju, dok u odsustvu liganda ili trofičkih faktora ne ostaju inaktivni već aktiviraju apoptozu preko još nerazjašnjenih mehanizama (91). Receptori ćelijske smrti dominantno aktiviraju kaspazu-8. Kaspaza-8 može da direktno aktivira efektore kaspaza akcelerišući proces apoptoze (u ćelijama tipa I), ili progresija apoptoze može da u potpunosti zavisi od amplifikacije mitohondrijalnog oštećenja (u ćelijama tipa II). U ovom slučaju kaspaza-8 oslobađa inaktivni Bid (*Bax-Like BH3 Protein*) u citoplazmi. Nakon aktivacije, Bid indukuje konformacione promene proapoptotskih proteina Bax i Bak koji zatim prenose apoptotske signale mitohondrijama. Ova koordinisanost u oba puta ukazuje na ključnu ulogu mitohondrija u programiranoj ćelijskoj smrti (92).

Ćelije koje se nalaze u produženom ili ireverzibilnom stanju stresa endoplazmatskog retikuluma (ER) takođe podležu apoptozi. Stres endoplazmatskog retikuluma predstavlja stanje disfunkcionalnog procesovanja novosintetisanih proteina, pri čemu narušena kontrola kvaliteta sinteze, maturacije i transporta proteina rezultuje u kumulaciji nepravilno savijenih proteina u lumenu glatkog ER (93). ER može sam da reguliše proces apoptoze, ali i u saradnji sa mitohondrijama aktivacijom transkripcionog faktora GADD153 (*Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene 153*, takođe poznatog kao CHOP) ili kalcijum-zavisnom aktivacijom kaspaze-12 (94).

1.1.5.1.2. Žučne kiseline kao induktori apoptoze

Mehanizam kojim žučne kiseline indukuju apoptozu nije u potpunosti razjašnjen. Soli hidrofobnih žučnih kiselina, gliko- i tauro-CDCA, mogu da indukuju citotoksičnost nespecifičnim deterdžentskim dejstvom na nivou ćelijske membrane hepatocita. Međutim, čak i u toku holestaze, koncentracije žučnih kiselina u serumu nisu dovoljne da ispolje ovakav membranotoksični efekt, te se citotoksični efekti žučnih kiselina mogu objasniti drugim procesima.

U modelima holestaze i oštećenja hepatocita je uočena povezanost mitohondrijalne disfunkcije, aktivacije kaspaza i ćelularne distribucije proteina familije Bcl-2 (95). Patološki povišene koncentracije žučnih kiselina mogu da indukuju apoptozu direktno ili/i aktivirajući ćelijske receptore, indukcijom oksidativnog stresa i mitohondrijalne disfunkcije (96). Dakle, hidrofobne žučne kiseline su jedinstvene među prirodnim proapoptogenim agensima usled izraženog potencijala da indukuju apoptozu i pomoću nespecifičnog deterdžentskog dejstva i interakcija sa receptorima.

Toksične žučne kiseline indukuju apoptozu preko Fas- i TRAIL-zavisnog puta, uključujući aktivaciju FADD (*Fas-Associated Death Domain*), aktivaciju kaspaze-8 i Bid kao i efektor kaspaza. Aktivacija receptora ćelijske smrti pomoću žučnih kiselina podrazumeva indukciju njihovog transporta iz Goldžijevog sistema. Nakon toga dolazi do spontane oligomerizacije receptora na ćelijskoj membrani. Apoptoza ćelija karcinoma kolona indukovana sa LCA se vrši preko mitohondrijalnog/kaspaza-9-zavisnog puta iniciranog kaspazom-8 (97). Žučne kiseline takođe uzrokuju ligand-nezavisnu aktivaciju Fas u hepatocitima, koja dovodi do

aktivacije kaspaze-8. Smatra se da je oksidativni stres indukovano dihidroksi žučnim kiselinama, praćen aktivacijom receptora epidermalnog faktora rasta (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) – posredovanom Fas translokacijom i oligomerizacijom (96, 97). Oksidativni stres izazvan žučnim kiselinama, koji vodi do aktivacije Fas, može biti indukovano multifaktorijalnim mehanizmima uključujući NADPH oksidazu ili interakciju žučnih kiselina sa mitohondrijama kao mestom direktne produkcije ROS (98). Takođe, aktivacija membranskog receptora žučnih kiselina, TGR5 je povezana sa Fas oligomerizacijom i translokacijom (99). Aktivacija Fas pomoću liganda je takođe stimulirana pomoću tumor supresora p53, transkripcionog faktora za koji je pokazano da tranzitorno povećava ekspresiju Fas na površini ćelije povećanim transportom iz Goldžijevog kompleksa, i indukuje Fas-FADD vezivanje (96). Takođe je i p53 uključen u ciklin kinaza inhibitor-olakšanu žučnim kiselinama-indukovanu apoptozu pomoću Fas. Apoptoza hepatocita posredovana žučnim kiselinama takođe aktivira kaspazu-6. Ova kaspaza, inače smatrana kaspazom sa egzekutornom funkcijom, identifikovana je kao potencijalni aktivator kaspaze-8 u modelima apoptoze indukovane žučnim kiselinama. Iako je mitohondrijalno oslobađanje citohroma c u toku apoptoze hepatocita posredovano FADD/kaspaza-8 zavisnim mehanizmom, žučne kiseline u koncentracijama sličnim onim u holestazi ispoljavaju potencijal indukcije apoptoze unutrašnjim putem ukoliko su receptori ćelijske smrti inhibirani (100). Apoptoza indukovana stresom ER je takođe prisutna u hepatocitima tretiranim sa gliko-CDCA. Tretman žučnim kiselinama rezultuje u ER-zavisnom oslobađanju kalcijuma, povećanoj aktivnosti kalpana i kaspaze-12 i indukcijom biomarkera stresa ER na nivou mRNA (101).

1.1.5.1.3. Žučne kiseline kao inhibitori apoptoze

Iako su žučne kiseline molekuli sa intrinzičkim toksičnim svojstvima, *per se*, one imaju sposobnost aktivacije protektivnih signala za preživljavanje ćelije i inhibicije citotoksičnosti. Navedeni protektivni mehanizmi uključuju nuklearni faktor- κ B (NF- κ B), fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K) i mitogenima-aktivisanu protein kinazu (MAPK) (102). Stimulusi za preživljavanje pokreću intracelularne signale aktivacijom transmembranskih receptora. Na ovaj način se ograničava apoptoza hepatocita u toku holestaze. Indukcija holestaze ligacijom žučnog kanala dovodi do povećanja ekspresije Bcl-2 što predstavlja adaptivni fenomen sa ciljem protekcije ćelije. Dodatno, aktivacija NF- κ B sa posledičnom regulacijom antiapoptotskih gena i

citoplazmatska sekvestracija p53 su mehanizmi koji se pokreću u jetri u cilju modulacije apoptoze indukovane toksičnim žučnim kiselinama (103, 104).

Nekoliko studija je dovelo u vezu žučnim kiselinama indukovani ERK signalni put sa citoprotektivnim odgovorom na žučnim kiselinama-indukovanu aktivaciju Fas i kaspaza (105, 106). Takođe, JNK signalni putevi imaju i pro- i antiapoptotske efekte uključujući one koji su efektori TNF- α receptora u hepatocitima. U ovom smislu, DCA aktivira i ERK i JNK signalne puteve pri čemu DCA-indukovani ERK1/2 i JNK2 signalni putevi imaju citoprotektivno, dok aktivacija JNK1 ima citotoksično dejstvo. Aktivacija ERK kaskade pomoću DCA rezultuje u povećanom vezivanju dva citoprotektivna transkripciona faktora, C/EBP β (*CCAAT Enhancer Binding Protein β*) i CREB (*Cyclic AMP-Response Element Binding Protein*), za DNA. Paradoksalno, utvrđeno je da DCA-indukovana aktivacija JNK1/2 zavisi od Fas signalizacije, što implicira da žučnim kiselinama-aktiviran Fas može da generiše oponirajuće signale- sa jedne strane aktivacija kaspaza i JNK1 rezultuje u ćelijskoj smrti, dok aktivacija JNK2 ima citoprotektivno dejstvo. Druge studije su pokazale da žučne kiseline aktiviraju PI3K-zavisne protektivne puteve u cilju protekcije od sopstvene toksičnosti ili toksičnosti hidrofobnijih žučnih kiselina (107). U skladu sa navedenim činjenicama, žučne kiseline balansiraju između receptora ćelijske smrti i citoprotektivnim signalnim putevima pri čemu balans ili njegova prevaga na jednu stranu zavisi od same vrste žučne kiseline.

1.1.5.1.4. Modulacija apoptoze pomoću UDCA

Nasuprot toksičnim efektima hidrofobnih žučnih kiselina, UDCA je hidrofilna žučna kiselina široko primenjivana u terapiji pacijenata sa holestatskom bolešću jetre i jedan od osnovnih medikamenta u terapiji PBC. Uprkos utvrđenoj kliničkoj efikasnosti, tačan mehanizam kojim UDCA poboljšava funkciju jetre nije sasvim poznat. Međutim, utvrđeno je da inhibicija apoptoze hepatocita predstavlja jedan od osnovnih protektivnih mehanizama, pored protekcije holangiocita od citotoksičnih efekata hidrofobnih žučnih kiselina i stimulacije sekrecije žuči odn. holereze (108).

Antiapoptotski efekti UDCA su demonstrirani u *in vitro* i *in vivo* uslovima (88). Suplementacija hidrofobnim žučnim kiselinama hranom je rezultovala u povećanju apoptoze hepatocita dok je primena UDCA inhibisala ovaj efekat sprečavanjem stvaranja ROS i

tanslokacije proapoptotskih proteina Bax iz citosola u mitohondrije. Slični efekti su primećeni i u drugim ćelijskim tipovima, ne samo u hepatocitima, što ukazuje da je UDCA plejotropni agens sa ulogom u modulaciji klasičnog mitohondrijalnog puta apoptoze u različitim tipovima ćelija (96). UDCA i njeni konjugati tj. soli, tauro- i gliko-UDCA sprečavaju preturbaciju mitohondrijalne membrane, formiranje MPT pore, translokaciju Bax, oslobađanje citohroma c, aktivaciju kaspaza i posledičnu razgradnju intracelularnih komponenti (109). Takođe, tauro-UDCA direktno stabilizuje mitohondrijalnu membranu ispoljavajući značajan efekat na formiranje Bax kanala na modelu izolovanih mitohondrija (110).

UDCA ima potencijal da prevenira apoptozu spoljašnjim putem, preko receptora ćelijske smrti, u primarnoj kulturi hepatocita miša u kokulturi sa fibroblastima koji ekspimiraju Fas ligand. Protektivni efekat verovatno nije u vezi sa smanjenjem oligomerizacije Fas-a, već se zasniva na direktnim efektima na nivou mitohondrijalne membrane (111). UDCA takođe reguliše apoptozu indukovanu stresom ER, redukcijom efluksa kalcijuma i aktivacije kaspaze-12. Novija istraživanja opisuju tauro-UDCA kao hemijskog pratioca (eng. *chaperone*) u ER koji ublažava stres ER sa potencijalnim terapijskim efektom na tip 2 *diabetes mellitus*-a i metabolički sindrom (112).

Žučne kiseline su prisutne u nukleusu hepatocita što ukazuje na njihovu gen-regulatornu ulogu (113). Nuklearna translokacija UDCA posredovana nuklearnim steroidnim receptorima je identifikovana kao esencijalni proces u antiapoptotskoj ulozi UDCA (114). Unutar nukleusa, UDCA ima potencijal regulacije genske ekspresije usled direktnih interakcija sa hromatinom ili alternativno, preko interakcija sa transkripcionim faktorima. Mikroerej studije su pokazale da UDCA modulira *per se* ekspresiju više od 96 gena u primarnim hepatocitima pacova pri čemu je većina uključena u regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptoze (115). UDCA redukuje transkripcionu aktivaciju i ekspresiju ciklina D1 u hepatocitima inkubiranim sa DCA, što doprinosi antiapoptotskoj ulozi ove žučne kiseline (116). Tauro-UDCA modulira apoptozu indukovanu toksičnim žučnim kiselinama preko inhibicije humanog transkripcionog faktora aktivator protein -1 (AP-1) (117). Inhibicija apoptoze pomoću UDCA takođe uključuje druge transkripcione faktore kao što su E2F-1 i p53 nezavisno od efekta na mitohondrije i/ili kaspaze. p53 je ključna molekularna meta delovanja UDCA i kompleksna, precizno regulisana kontrola p53 pomoću Mdm-2 (*Mouse Double Minute 2 Homolog*, ili E3 ubikvitin protein ligaza) predstavlja metu

prevencije p53-zavisne ćelijske smrti pomoću UDCA (118). Veoma značajnu činjenicu predstavlja to što iako inhibira tumor supresor p53, nije dokazano da prolongirana primena UDCA povećava rizik za pojavu maligniteta kod pacijenata sa PBC kod kojih se UDCA dugotrajno primenjuje (119). Rezultati kliničkih studija su pokazali da dugotrajna primena UDCA ne samo što ne povećava rizik od razvoja adenoma kolona nego deluje i kao hemopreventivni agens, značajno umanjujući stopu recidiva kolorektalnog karcinoma nakon resekcije. Drugi autori su prezentovali podatke koji povezuju UDCA sa smanjenom incidencom kolorektalne displazije među pacijentima sa ulcerativnim kolitisom i primarnim sklerozirajućim holangitisom, kao i da UDCA prevenira razvoj tumora u azoksimetanom-indukovanom modelu karcinoma kolona što se može objasniti inhibicijom tumor-promovišućih alteracija ciklina D1 i E-kadherina indukovanih ovim karcinogenom (120). UDCA takođe sprečava cisplatinom-indukovanu apoptozu senzornih neurona smanjenjem ekspresije p53 signalnog puta (121).

Aktivacija signala preživljavanja predstavlja značajan dodatni mehanizam kojim UDCA inhibira ćelijsku smrt. Npr. UDCA može da stimuliše MAPK i PI3K signalne puteve. Pokazano je da su tauro-UDCA-aktivisani p38/ERK/MAPK i PI3K putevi uključeni u protekciju hepatocita od gliko-CDCA indukovane apoptoze (122). Tauro-UDCA takođe značajno inhibira apoptotske događaje u neuronima, indukovane amiloidom- β , što je delimično posredovano aktivacijom PI3K (105). Takođe, zaštita kardiomiocita ovom žučnom kiselinom od ishemijsko-reperfuzionog oštećenja je posredovana PI3K/Akt mehanizmima (123).

UDCA ispoljava citoprotektivna svojstva koja nisu uvek u vezi sa inhibicijom apoptoze. Npr. UDCA ima sposobnost da aktivacijom glukokortikoidnog receptora suprimira NF- κ B i posledičnu ekspresiju inflamatornih citokina, čime se ostvaruje i značajna antiinflamatorna uloga (124).

1.1.5.2. Žučne kiseline i autofagija

Autofagija, je evolutivno konzervisan homeostazni proces u toku kog se nepotrebne, oštećene ili ostarele komponente ćelije okružuju dvoslojnom membranom, autofagozomom, koji nakon spajanja sa lizozomom formira fagolizozom. Sadržaj unutar fagolizozoma se zatim razgrađuje do osnovnih konstituenata u cilju produkcije energije, reutilizacije, očuvanja homeostaze i vijabilnosti ćelije. Autofagija je primarno identifikovana kao proces prisutan u

ćeliji nakon deprivacije nutrijenata, omogućavajući preživljavanje ćelije i predstavlja konstitutivnu autofagiju. Iako prisutna u skoro svim ćelijama na određenom, bazalnom, nivou, alteracije u nivou ciklusa autofagije kao odgovor na dejstvo različitih noksi mogu da rezultuju u preživljavanju, ali i smrti ćelije. Iako predstavlja primarno protektivni mehanizam, deregulacija autofagije može, pored svrhe preživljavanja, biti *bona fide* uzrok ćelijske smrti (adaptivna autofagija) pa čak uključena i u razvoj pojedinih patoloških stanja (125).

Proces autofagije je strogo kontrolisan, od faze inicijacije do terminacije, preko koordinisane aktivnosti mnoštva različitih regulatornih procesa. Do danas je identifikovano više od 30 proteina povezanih sa autofagijom (*Autophagy-Related Proteins (ATG)*) čiji geni imaju visok stepen homologije sa genomom gljivica.

Proces inicijacije autofagije aktivira serin-treonin kinaza, UKL1. Induktori autofagije kao što su deprivacija nutrijenata ili rapamicin, uzrokuju defosforilaciju ULK1 kompleksa (kompleksa sastavljenog od ULK1, ATG13, ATG101 i FIP200) koji se zatim disociraju od mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) kompleksa. Pri dejstvu uzroka koji indukuju autofagiju, aktivirani ULK1 kompleks pokreće Beclin1-Vsp34 kompleks do mesta formiranja autofagozoma i nukleacije vezikule. Rast i završetak formiranja autofagozoma je posredovan različitim ATG proteinima, ATG12-ATG15-ATG16L i ATG8 (*Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3, LC3*), koji dovode do formiranja lipidnog kompleksa LC3-fosfatidiletanolamin. Navedeni kompleks se nalazi u membrani autofagozoma i učestvuje u rastu vezikule. Sekvestrozom-1 odn. p62, optineurin, NDP52, NBR1 i Alfy predstavljaju receptore koji prepoznaju proteine ili organele obeležene za degradaciju koje zatim bivaju obuhvaćene i okružene membranom autofagozoma. Zreli autofagozomi se zatim fuzionišu sa lizozomima nakon čega se sadržaj autofagozoma razgrađuje dejstvom lizozomalnih enzima. Terminacija autofagije se postiže reaktivacijom mTOR – osnovne komponente mTORC1 kompleksa, pomoću nutrijenata oslobođenih iz fagolizozoma. Navedeni povratni mehanizam inhibira ekscesivnu autofagiju tokom perioda gladovanja (126).

Iako je poznato da mogu da indukuju različite tipove ćelijske smrti, hidrofobne žučne kiseline imaju sposobnost inhibicije fluksa autofagije u hepatocitima. Kod životinja sa ugašenim receptorom žučnih kiselina, FXR, koji suprimira sintezu žučnih kiselina, prisutan je snižen nivo autofagije u hepatocitima (127). Žučne kiseline takođe indukujući inflamatorne citokine kao što

je NF- κ B indukujući mehanističku metu rapamicina, mTOR, sa konsekventnom supresijom autofagije. Studija čitavog genoma (*Genome-Wide Association Study* – GWAS) je pokazala da FXR transkripciono reguliše ekspresiju nukleopora p62 u intestinumu (128). p62 ima ulogu receptora autofagije ispostavljajući poliubikvitirane proteine autofagozomima. Takođe, p62 ima ulogu u transdukciji signala koji imaju odlučujuću ulogu o sudbini ćelije. Nakon stimulacije, p62 može da aktivira NF- κ B koji promoviše preživljavanje ćelije, ali i da vezivanjem za Keap-1 (*Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*) aktivira nuklearni faktor eritroid 2-povezani faktor 2 (*Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2*, NRF2) transkripcioni faktor značajan u indukciji ekspresije gena uključenih u odgovor na oksidativni stres. Na taj način, indukcija p62 posredovana FXR-om može da predstavlja potencijalno protektivni mehanizam žučnih kiselina agonista ovog nuklearnog receptora.

1.1.5.3. Žučne kiseline i nekroza

Nekroza, programirana nekroza - nekroptoza i sekundarna nekroza nakon apoptoze su mehanizmi ćelijske smrti sa sličnim morfološkim osobinama kao što je bubrenje citoplazme, naročito u fazi dezintegracije. Nekrozu takođe karakteriše hiperpolarizacija mitohondrijalne membrane i povećana permeabilnost lizosomalne i citoplazmatske membrane. Nekrotski tip ćelijske smrti može biti regulisan posebnim signalnim putevima i kataboličkim procesima koji podrazumevaju aktivaciju RIP1 i RIP3 (*Receptor Interaction Protein Kinase 1 i 3*) (129). Nekroza se javlja kao odgovor ćelije na dejstvo noksi koje narušavaju ćelijski integritet i homeostazu u visokom stepenu.

Oštećenje i nekroza ćelije izazvani kumulacijom visokih koncentracija žučnih kiselina, npr. u hepatocitima u toku holestaze, nastaju kao posledica oštećenja membrane usled deterdžentima-sličnim svojstvima hidrofobnih žučnih kiselina, ali i deplecije ATP-a, poremećaja jonske homeostaze, bubrenja mitohondrija i citoplazme sa rupturom ćelijske membrane i oslobađanjem intracelularnog sadržaja (86). Nekroza hepatocita ovim mehanizmom dovodi do oslobađanja intracelularnih enzima, aminotransferaza, koji su identifikovani kao serumski markeri oštećenja hepatocita. Za razliku od apoptoze, samo visoke koncentracije žučnih kiselina indukuju nekrozu (130). Pretpostavlja se da u toku ovog procesa žučne kiseline indukuju povećanu mitohondrijalnu produkciju ROS usled direktnog deterdžentskog dejstva na nivou membrana i membranskih enzima kao što je fosfolipaza A2, koja nakon aktivacije dovodi do

oslobađanja arahidonske kiseline (131). Primena antioksidanasa može da prevenira nekrozu hepatocita izloženih hidrofobnim žučnim kiselinama, redukujući oksidativni stres i poremećaje potencijala mitohondrijalne membrane (132).

1.1.6. Uticaj žičnih kiselina na biološke membrane – uloga žučnih kiselina kao promotera transporta

Napredak u razumevanju heterogenosti ćelijske membrane i drugih bioloških membrana ukazuje da alteracije mikrosredine ćelijske membrane mogu da direktno i dinamički regulišu transdukciju signala u ćeliji. Prema tradicionalnom, fluidno-mozaičnom modelu ćelijska membrana predstavlja glicerofosfolipidni dvosloj u koji su uronjene druge lateralno mobilne komponente lipidne prirode kao i globularni proteini. Kao posledica kretanja u ravni lipidnog dvosloja i lateralne segregacije holesterola, glikosfingolipida, sfingomijelina u uređene celine nastaju lipidni splavovi ili uređeni Lo (*Liquid Ordered*) mikrodomeni. Prema ovom modelu, lipidni splavovi kao uređeni mikrodomeni ćelijske membrane plutaju u lipidno-neuređenoj membranskoj fazi (Ld, *Liquid Disordered*) sa visokim sadržajem fosfatidiletanolamina, obezbeđujući specifične fizičko-hemijske osobine odgovarajućim regionima dvosloja. Heterogena distribucija lipida u membrani rezultuje u stvaranju tranzitornih (lipidni splavovi, kaveole, obložena udubljenja) ili stabilnih (sinaptozomi, tesne veze, četkasti pokrov) membranskih mikrodomena čija segregacija je uslovljena pre svega holesterolom i proteinima (133). Membranski proteini u sastavu lipidnih splavova su u interakciji sa okolnim lipidima, ali i drugim mikrodomenima formirajući signalne platforme, signalozome, sa ulogom u transmembranskom transportu i transmisiji membranskih signala, esencijalnih procesa u celularnoj fiziologiji. Kompozicija i integritet membrane utiču na organizaciju i funkciju ovih membranskih domena (134). Promene u tipu i zastupljenosti pojedinih vrsta lipida u membranama mogu uticati na lokalizaciju i funkciju ključnih proteina, ili protein-protein interakcija u specifičnim membranskim mikrodomenima sa rezultujućim alteracijama u ćelijskoj signalizaciji što može biti udruženo sa pojavom različitih patoloških stanja (135).

Žučne kiseline i njihove soli su ekstenzivno ispitivane kao promoteri transporta lekova kroz različite biološke membrane kao što su intestinalna barijera, krvno-moždana barijera, bukalna sluznica, koža i kornea (136, 137). Kao biološki amfilni agensi, žučne kiseline mogu da intereaguju sa fosfolipidnim dvoslojem izvan membranskih ostrvaca preko hidrofobnih

interakcija i da u submicelarnim koncentracijama povećavaju fluidnost, ali i permeabilnost ćelijske membrane (138). Ova osobina žučnih kiselina je takođe u direktnoj vezi sa hidrofobnošću, odnosno hidrofobnije žučne kiseline su bolji promotori transporta kroz membrane. Tako je, na primer, DCA efikasnija od holne kiseline u promociji intestinalne apsorpcije cefotaksima (139). Aktivacija membranskog EGFR, pomoću hidrofobne DCA - ali ne i hidrofilne UDCA, dodatno potvrđuje pretpostavku da alteracije u ćelijskoj membrani predstavljaju jedan od mehanizama signalne aktivnosti žučnih kiselina (107).

Sposobnost žučnih kiselina da poboljšaju transport kroz biološke membrane je koncentracijski zavisna, budući da u koncentracijama iznad CMC žučne kiseline vrše solubilizaciju membranskih lipida, a pretpostavlja se i da dimeri ili veći agregati žučnih kiselina formiraju hidrofilne pore unutar membrana, takozvane reverzne micele koje sadrže molekule vode (14). Sa mehanističkog stanovišta, emulgujuća svojstva i litički potencijal žučnih kiselina su verovatno odgovorni za povećanje permeabilnosti, što je u bliskoj konekciji sa citotoksičnim potencijalom. Akare i sar. su pokazali da hidrofobne žučne kiseline, u koncentracijama koje ne narušavaju integritet ćelijske membrane utiču na sastav bioloških membrana i indukuju promene u sadržaju holesterola, fosfolipida i kaveolina-1 i posledično aktiviraju multiple signalne puteve kao što su protein kinaza $C\alpha$ (kao senzor membranskog stresa), ali i ERK1/2 (kao indikator kaveolarnog stresa) (140).

Novija studija je ukazala na sposobnost žučnih kiselina da u subtoksičnim koncentracijama utiču na lateralnu heterogenost fosfolipidnog sloja biomimetičkih sintetskih lipozoma, izolovane citoplazmatske membrane i živih ćelija, utičući na fizička svojstva membrana (141). Ujedno, pretpostavlja se da žučne kiseline mogu da regulišu prenos signala sa površine ćelije zahvaljujući moduliranju stabilnosti lateralnih domena i lipidnih splavova kao i promenama u distribuciji lipida i proteina ćelijske membrane. Takođe, menjajući fluidnost membrane, žučne kiseline ispoljavaju uticaj na konformaciju i aktivnost membranskih transportnih proteina koji omogućavaju influks odnosno efluks različitih prirodnih supstrata i ksenobiotika (142). Osim transcelularne rute, žučne kiseline poboljšavaju transport lekova paracelularno, vezujući jone kalcijuma sa sledstvenim otvaranjem tesnih veza između ćelija (136).

1.1.7. Uloga membranskih transportnih proteina žučnih kiselina u distribuciji lekova

Mnogi metabolički enzimi i transportni proteini čiji supstrati su različiti lekovi takođe su odgovorni za metabolizam i transport žučnih kiselina kroz ćelijske membrane, u oba smera. Veoma je značajna činjenica da nuklearni receptori i drugi ligand zavisni-transkripcioni faktori imaju ulogu senzora prisustva lekova ili žučnih kiselina čime se reguliše ekspresija metaboličkih enzima i transportnih proteina u cilju održanja homeostaze. Molekularni mehanizmi koji regulišu lekovima- i žučnim kiselinama-inducibilnu ekspresiju gena koji kodiraju sintezu membranskih transportnih proteina su poznati, pri čemu su nekoliko pripadnika subfamilije 1 nuklearnih receptora (PXR, CAR, FXR, VDR) ključni medijatori u ovim procesima (143).

Membranski transportni proteini regulišu transport supstrata kroz ćelijsku membranu i zbog toga predstavljaju esencijalne regulatore ADMET karakteristika (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost) bilo kog supstrata u organizmu, kako prirodnih liganda i metabolita tako i lekova (144). Mnogi ksenobiotici su uključeni u transportne puteve zajedničke sa fiziološkim intermedijerima. Takođe, mnogi fiziološki transporteri nisu monospecifični već imaju širok spektar specifičnosti prema supstratima. Zahvaljujući ovakvoj plejotropiji, interakcije supstrata (endogenog metabolita ili leka/ksenobiotika) sa transportnim proteinima imaju veoma značajan uticaj kako na efikasnost tako i bezbednosni profil leka. Najznačajniji transportni proteini žučnih kiselina sa širokim spektrom specifičnosti prema supstratu, od velikog značaja za dejstvo leka i dispoziciju su influks transporteri iz grupe transportera organskih anjona, OATP koji pripadaju SLCO (*solute carrier*) genskoj familiji, kao i efluks ABC transportni proteini. Za pojedine transportne proteine iz navedenih grupa, žučne kiseline predstavljaju fiziološke supstrate sa dokazanim uticajem na ADMET karakteristike brojnih lekova, supstrata za navedene membranske transportere (144-146).

1.1.7.1. OATP transportni proteini za preuzimanje (influks) žučnih kiselina i ksenobiotika

Smatra se da su transportni proteini za preuzimanje supstrata evolutivno razvijeni u cilju olakšanog ćelijskog preuzimanja nutrijenata i vitamina, ali i resorpcije endogenih produkata kao što su glukoza i drugi ugljeni hidrati, aminokiseline i mali peptidi ili žučne kiseline. Mnogi od

ovih transportera koriste elektrohemijski gradijent jona kao što je Na^+ za transport nasuprot koncentracionom gradijentu. Među transportne proteine za preuzimanje žučnih kiselina spada OATP1A2 (koji kodira gen *SLCO1A2*) odgovoran za preuzimanje različitih endogenih supstrata (žučne kiseline, steroidni konjugati, prostaglandini, tireoidni hormoni T3, T4 i rT3) i egzogenih supstrata (rokuronijum, feksofenadin, MRI kontrast itd.) iz intestinalnog lumena i portne cirkulacije, a ekspresija ovog transportera je pod kontrolom PXR i VDR. OATP1B1 (*SLCO1B1*) je takođe uključen u preuzimanje endogenih supstrata (holat, tiroksin, bilirubin, leukotrijeni C₄ i E₄, estradiol 17β-glukuronid itd.) i klinički relevantnih lekova (statini, rifampicin, enalapril, metotreksat, olmesartan). Ovaj transporter je lociran na bazolateralnoj membrani hepatocita i transkripciono je kontrolisan od strane PXR i FXR receptora. OATP1B3 (*SLCO1B3*) je hepatički specifičan transporter iz OATP familije koji posreduje Na^+ nezavisno preuzimanje ksenobiotika (docetaksel, enalapril, eritromicin, feksofenadin, fluvastatin, metotreksat, rifampin i paklitaksel) i ima ključnu ulogu u preuzimanju žučnih kiselina i bilirubina. U embrionalnim ćelijama bubrega HEK293 je pokazano da su OATP1B1 i OATP1B3 zaduženi za transport CA, CDCA i DCA, dok preuzimanje UDCA i LCA nije bilo značajno. Komparativna kinetička analiza je pokazala da su konjugovani glicin- i taurin- derivati ovih žučnih kiselina (GCDCA, TCDCA, GDCA, TDCA, GLCA, and TLCA) prirodni supstrati za OATP1B1 i OATP1B3, s obzirom da konjugacija na C-24 dovodi do smanjenja pKa za žučne kiseline (pKa iznosi 5-6 za nekonjugovane, odn. 4-5 i 1-2 za konjugovane sa glicinom i taurinom), povećavaju hidrofилnost, a smanjuju lipofилnost. Stoga, pri fiziološkom pH=7.4, nekonjugovane prolaze kroz ćelijske membrane pasivnom difuzijom, dok je za konjugovane neophodno preuzimanje posredovano transporterima (147).

CDCA kao najpotentniji endogeni FXR agonista indukuje aktivnost promotera ovog transportnog proteina u HepG2 i Huh7 ćelijskim linijama. Međutim rifampicin, potentni PXR aktivator redukuje ekspresiju ovog transportnog proteina na bazolateralnoj membrani hepatocita. NTCP (*SLC10A1*) lokalizovan na bazolateralnoj membrani hepatocita i ASBT (*SLC10A2*) na apikalnoj membrani enterocita su Na^+ zavisni transporteri čiji ligandi su konjugovane i nekonjugovane žučne kiseline, a oba transportera su pod negativnom transkripcionom kontrolom FXR. Dok za ASBT nisu identifikovani drugi supstrati, NTCP može da transportuje rosuvastatin i mikafungin (143, 148-150).

1.1.7.2. ATP-vezujući kasetni proteini kao multispecifični transportni proteini za efluks žučnih kiselina i ksenobiotika

ATP-vezujući kasetni proteini imaju veoma značajnu ulogu kao odbrambeni mehanizam u cilju sprečavanja prodora ksenobiotika ili transmembranskog transporta različitih endogenih jedinjenja. Hidrolizom ATP-a se vrši intermedijerna fosforilacija transportera neophodna za aktivnu translokaciju supstrata kroz biološku membranu nasuprot koncentracionom gradijentu. ABC transportne proteine karakteriše širok spektar supstrata kao što su fosfolipidi, joni, peptidi, steroidi, aminokiseline, organski anjoni, žučne kiseline i ksenobiotici (151). Porodica humanih ABC transportera obuhvata 49 proteina koji su podeljeni u 7 grupa (od ABCA do ABCG) u zavisnosti od homologije aminokiselinske sekvence ATP-vezujućeg domena (152). S obzirom da ovi transportni proteini izbacuju iz ćelija molekule različitih fizičko-hemijskih svojstava, broj potencijalnih supstrata je velik, a zahvaljujući delimično očuvanoj zajedničkoj aminokiselinskoj sekvenci postoje preklapanja u specifičnosti za pojedine supstrate, odn. jedan supstrat može biti ligand za više različitih transportera.

ABC proteini se sastoje četiri domena: dva citoplazmatska ATP-vezujuća domena (*Nucleotide-Binding Domain*, NBD) i dva transmembranskog domena (*Transmembrane Domain*, TMD). TMD se sastoje nekoliko alfa heliksa (tipično šest heliksa po domenu, ali ne uvek) koji formiraju kanal i na kojima se nalaze supstrat-vezujuća mesta. Na nivou NBD se vrši hidroliza ATP-a kojom se obezbeđuje energija za transport supstrata. Normalno, ovi transporteri imaju fiziološku ulogu kao što je ekskrecija ksenobiotika i toksina iz jetre, bubrega i gastrointestinalnog trakta. Povećana ekspresija ovih transportera je prisutna u mnogim tipovima humanih maligniteta i povezana je sa lošim odgovorom na primenjenu terapiju. Ekspresija ovih transportnih proteina značajno utiče na bioraspoloživost lekova, ali i na razvoj rezistencije malignih tumora na strukturno različite antitumorske lekove (153).

P-glikoprotein (Pgp, *Multi-Drug Resistance Protein 1*, MDR1) je otkriven 1970. godina u multirezistentnim ćelijama ovarijuma kineskog hrčka. Zahvaljujući funkciji da modulira permeabilnost ćelijske membrane za brojne ksenobiotike nazvan je protein permeabilnosti (*Permeability Glicoprotein*, Pgp). MDR1 je produkt gena *ABCB1* smeštenog na hromozomu 7q21.12 koji obuhvata region od 209,46 kb i sadrži 29 egzona koji kodiraju sintezu polipeptida od 1280 amino kiselina, molekulske težine 170 kDa. MDR1 se sastoji od dva NBD-a i dva

TMD-a povezanih linker regionom. Hidroliza dva mola ATP-a omogućava efluks supstrata. MDR1 je najzastupljeniji u tkivima koja imaju ekskretornu ulogu (apikalna membrana hepatocita, enterocita i epitelnih ćelija bubrežnih tubula) ili funkciju barijere (intestinalna, hemato-encefalna, hemato-testikularna i placentarna barijera). MDR1 je također eksprimiran u limfocitima i matičnim ćelijama hematopoeze gde ima ulogu u protekciji ovih ćelija od toksina (154). Postoji nekoliko zajedničkih strukturnih denominatora MDR1 supstrata. To su uglavnom organski molekuli veličine 200-1900 Da. Mnogi supstrati sadrže aromatične grupe, međutim i linearni i cirkularni nearomatični molekuli mogu također da budu supstrati. Najefikasnije transportovani supstrati MDR1 su neutralne ili slabo katjonske prirode (mada i pojedini molekuli anjonske prirode kao što je metotreksat i fenitoin mogu biti transportovani – ali u malom stepenu). Najznačajnija, do sada identifikovana osobina za MDR1 supstrate je njihova amfifilna priroda. Zahvaljujući amfifilnosti MDR1 supstrati se lako insertuju u unutrašnji sloj ćelijske membrane, a zatim bivaju ekstrudirani ili u spoljašnji sloj ili direktno u ekstracelularni prostor (155). Ekspresija MDR1 kod ljudi je interindividualno različita, može da se razlikuje i do 50 puta i značajan je subjekt interakcija između lekova (156). Povećana ekspresija MDR1 u malignim ćelijama dovodi do rezistencije na antracikline (doksorubicin, daunorubicin, mitoksantron), vinka alkaloida (vinkristin, vinblastin), epidofilotoksine (etopozid) i taksane (taksol i paklitaksel). Različiti faktori regulišu ekspresiju MDR1. Mutacije tumor supresora p53, povećana ekspresija p63 ili/i p73, kao i povećana ekspresija glukozilceramid sintetaze u pojedinim tumorima su povezani sa povećanom ekspresijom ovog transportnog proteina (157, 158). MDR1 protein je identifikovan i u tkivu miokarda što ima potencijalne implikacije u lokalnoj distribuciji kardiovaskularnih lekova kao što su karvedilol i digoksin, ali i drugih lekova koji ispoljavaju nepovoljna toksodinamska dejstva na nivou miokarda kao što je doksorubicin (159).

Aktivirajući PXR, žučne kiseline povećavaju ekspresiju MDR1 transportera u HepaRG ćelijskoj liniji, a u uslovima mutacije BSEP (transportera žučni kiselina na apikalnom polu membrane hepatocita, koji se zbog visokog stepena homologije sa MDR1 naziva i „*Pgp sister*“), MDR1 preuzima funkciju bilijarne sekrecije žučnih kiselina kao alternativni transporter ne visokog afiniteta, ali visokog kapaciteta (160, 161).

MRP1 (*Multidrug Resistance-Associated Protein 1*) je otkriven 1992. godine kada su *Susan Cole* i *Roger Deeley* detektovali amplifikaciju i povećanu ekspresiju novog gena u doksorubicin-rezistentnim ćelijama mikrocelularnog karcinoma pluća, H69AR, koje nisu ekspimirale MDR1. MRP1 je membranski glikoprotein molekulske mase 190 kDa sastavljen od 1531 aminokiselinske rezidue, produkt *ABCC1* gena lociranog na hromozomu 16p13.11 koji obuhvata 193,497 kb sa 34 egzona. Ovaj protein je slične strukture kao MDR1, ali je ekspimiran ubikvitarno, u svim tipovima normalnih ćelija kao i u pojedinim multirezistentnim ćelijama tumora. Maligne ćelije sa povećanom ekspresijom MRP1 proteina su rezistentne na širok spektar antitumorskih agenasa, uključujući antracikline, vinka alkaloida i metotreksat. MRP1 je transporter za amfifilne organske anjone, hidrofobne i druge supstrate konjugovane sa glutationom, glukuronskom kiselinom ili sulfatima (156, 162). Zbog toga, efikasno izbacivanje neanjonskih supstrata pomoću MRP1 zavisi od količine glutationa u ćeliji (163). Za razliku od MDR1, MRP1 je lokalizovan u bazolateralnoj membrani polarizovanih ćelija. MRP1 je ekspimiran u veoma malim količinama u jetri i može da eksportuje dvoanjonske žučne kiseline kao što su sulfatni konjugati tauro-LCA i tauro-CDCA (153, 164).

MRP2 (*Multidrug Resistance-Associated Protein 2*, produkt gena *ABCC2*) je efluks transportni protein opisan 1996. godine, prisutan u apikalnoj membranama hepatocita, enterocita i epitela bubrežnih tubula. *ABCC2* gen se nalazi na 10q24.2 hromozomskom lokusu, dužine 71,143 kb i ima 34 egzona. Nakon translacije finalni produkt je sastavljen od 1545 aminokiselina, molekulske težine oko 190 kDa (156). Sa MRP1 transportnim proteinom deli 49% aminokiselinske homologije i slično ovom transporteru, MRP2 primarno deluje kao transporter organskih anjona, ali i slabo baznih supstrata u kotransportu sa glutationom kao i glutationskih konjugata (163). Međutim, primarna uloga ovog nosača je facilitacija ekskrecije organskih anjona (gukuronida, glutationskih i sulfokonjugata) estrogena, leukotrijena, žučnih kiselina i bilirubina (143). Takođe, različiti konjugovani i nekonjugovani ksenobiotici se izbacuju iz ćelije pomoću ovog nosača (arsen, cisplatin, doksorubicin, etopozid, irinotekan, metotreksat, vinka alkaloidi) (153). Usled nedostatka anjonskog karaktera, pojedini supstrati zahtevaju kotransport sa glutationom. Budući da transportuje žučne kiseline i glutation iz hepatocita u žuč, MRP2 ima veoma značajnu fiziološku ulogu u normalnom protoku žuči i u detoksikaciji, dostavljajući glutation za konjugaciju ksenobiotika. Postoji značajno preklapanje u tkivnoj distribuciji MDR1 i MRP2 proteina kao i parcijalno preklapanje u spektru supstrata, a

povećana ekspresija MRP2 u malignim ćelijama rezultuje u pojavi rezistencije na doksorubicin, metotreksat, cisplatin, etopozid i vnkristin. Ekspresija MRP2 je u koordinaciji pozitivno regulisana od strane više nuklearnih receptora (PXR, FXR i CAR) koji deluju kao senzori različitih ksenobiotika i žučnih kiselina (143). Ovaj transportni protein je takođe pod pozitivnom transkripcionom kontrolom NRF2 (165).

MRP3 (*Multidrug Resistance-Associated Protein 3*) je produkt gena *ABCC3* genskog lokusa na hromozomu 17q21.33 dužine 56,861 kb koji sadrži 32 egzona. MRP3 je transportni protein na koji vrši izbacivanje endogenih molekula i ksenobiotika iz u cirkulaciju. Prema aminokiselinskoj sekvenci ovaj protein je najbliži MRP1 (58% sličnosti) i kao i MRP1 je prisutan u bazolateralnoj membrani polarizovanih ćelija. MRP3 je transporter organskih anjona širokog spektra sa značajnim preklapanjem u supstratima sa MRP1 i MRP2 (145). Endogeni supstrati za MRP3 su žučne kiseline, bilirubin, estradiol, ali i brojni lekovi uključujući acetaminofen, ritonavir, sakvinavir i antitumorske lekove (metotreksat i etopozid). Osim u jetri MRP3 je eksprimiran i u membrani enterocita, adrenalnih žlezda, pankreasu i tubulocitima bubrega (ascendentnom delu Henleove petlje i distalnim tubulima) (153). Iako nije abundantno eksprimiran u normalnom hepatocitu, u uslovima deficijencije aktivnosti MRP2 i farmakološki-indukovane holestaze zapažena je snažna pozitivna regulacija MRP3 (166). Takođe, iako nema osnovnu ulogu u normalnom transportu bilirubina, MRP3 predstavlja alternativni put metabolizma bilirubina transportujući konjugovani bilirubin iz hepatocita u krv nakon čega se bilirubin eliminiše urinom. Ekspresija MRP3 je pod kontrolom PXR, VDR i CAR ali i FXR u cilju protekcije hepatocita od kumulacije toksičnih žučnih kiselina (166).

MRP4 (*Multidrug Resistance-Associated Protein 4*) je produkt *ABCC4* gena lociranog na hromozomu 13q32.1 koji obuhvata 36 egzona i kodira protein od 1325 aminokiselina. MRP4 posreduje transport nekoliko klinički relevantnih lekova kao što su irinotekan, leukovorin, metotreksat, topotekan, cefazolin i dr, kao i konjugovanih divalentnih sulfokonjugata i monovalentnih žučnih kiselina (167). Lokalizacija MRP4 u membranama polarizovanih ćelija može biti dvostruka: u tubuloacinarnim ćelijama prostate, hepatocitima i epitelu horoidnog pleksusa se nalazi na bazolateralnoj membrani, u proksimalnim tubulocitima bubrega, i luminalnoj strani kapilarnog endotela moždanog tkiva je lociran na apikalnoj membrani, dok u epitelu kolona se može naći na obe strane membrane. MRP4 je eksprimiran i u gonadama,

nadbubrežnim žlezdama i neuronima (168). Ovaj protein je uključen u transport endogenih molekula sa ulogom u ćelijskoj signalizaciji uključujući ciklične nukleotide, ADP, eikosanoide, konjugovane steroidne hormone, ali i folate, žučne kiseline, i glutation (u kotransportu sa žučnim kiselinama). Kao transporter ksenobiotika MRP4 obuhvata širok spektar supstrata uključujući antivirusne lekove (adefovir, tenofovir, ganciklovir), antibiotike (cefalosporine), kardiovaskularne lekove (tiazidne i diuretike Henleove petlje, antagoniste angiotenzinskih II receptora) i citostatike (metotreksat, 6-tiogvanin, 6-merkaptopurin, topotekan) (169). MRP4 podleže adaptivnom povećanju ekspresije kao odgovor naolestazu ili suplementaciju žučnim kiselinama, a CAR je kao nuklearni receptor uključen u regulaciju ekspresije MRP4 (169). *In vitro* i *in vivo* aktivacija FXR pomoću CA, CDCA i sintetskim FXR agonistom GW4064 suprimira bazalnu ekspresiju *MRP4* mRNA i inhibira CAR-posredovano povećanje ekspresije ovog transportnog proteina. Takođe *in vivo* delecija FXR rezultuje u povećanju bazalne ekspresije MRP4 (170).

Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) je kloniran 1998. godine u mitoksantron-rezistentnoj MCF7 ćelijskoj liniji koja ne eksprimira MDR1 i MRP1 proteine. BCRP je protein od 72 kDa izgrađen od 655 amino kiselina. *ABCG2* gen koji kodira sintezu ovog proteina se nalazi na hromozomu 4q22.1 i obuhvata 20 egzona. Za razliku od ostalih ABC transportera, BCRP je “polu-transporter” koji ima samo jedan NBD i TMD i funkcioniše kao homodimer, nakon dimerizacije pomoću disulfidnih mostova. BCRP je fiziološki prisutan u intestinalnom epitelu, hepatocitima, placentarnoj i krvno-moždanoj barijeri i matičnoj ćeliji hematopoeze. U ovim tkivima BCRP ima protektivnu ulogu, štiteći ove ćelije od ksenobiotika i toksičnih metabolita. BCRP je transporter sulfokonjugovanih organskih anjona. Povećana ekspresija BCRP u tumorima omogućava rezistenciju na mitoksantron, irinotekan, doksorubicin, epirubicin, etopozid, gefitinib i imatinib (153). Pokazano je da BCRP štiti tumorske matične ćelije od citotoksičnih agenasa kao i da hipoksija povećava ekspresiju ovog transportnog proteina (171). Takođe, EGF modulira ekspresiju BCRP aktivacijom MAPK kaskade pomoću fosforilacije ERK1/2 i JNK/stres-aktivirane protein kinaze (SAPK) (172).

1.1.8. Primena žučnih kiselina u razvoju novih formulacija lekova

Na žučne kiseline kao sisteme za transport lekova (*drug delivery*) je tokom poslednje decenije usmerena velika pažnja naučne zajednice, budući da žučne kiseline mogu imati ulogu

nosača lekova u vidu mešovitih micela, lipozoma stabilisanih žučnim kiselinama (bilozoma) i hemijskih konjugata sa različitim lekovima (14).

U cilju poboljšanja apsorpcije, lekovi koji su slabo rastvorljivi u vodi mogu biti rastvoreni unutar žučnih micela. Mešoviti micelarni sistemi sastavljeni od žučnih soli, fosfolipida, masnih kiselina i poliamina mogu imati poboljšana svojstva u smislu promocije transporta, ujedno omogućavajući smanjenje koncentracije žučnih kiselina, a samim tim i potencijalne membranolitičke efekte (173). Različite soli žučnih kiselina, natrijum holat, natrijum tauroholat, natrijum deoksiholat, natrijum tauroholat su ispitani u kombinaciji sa različitim ekscipijensima (linoleinskom kiselinom, beta-ciklodekstrinom, hitozanom, sperminom itd.) u formi mešovitih micela u cilju poboljšanja apsorpcije lekova kroz biološke membrane u poređenju sa jednostavnim micelarnim i nemicelarnim sistemima. Primenom mešovitih micelarnih sistema sa žučnim kiselinama je poboljšana apsorpcija klofazimina, oksaprozina, rebamipida kroz različite modele bioloških membrana (model intestinalne perfuzije creva pacova, CaCo-2 ćelijska kultura itd.) kako transcelularnom tako i paracelularnom rutom, bez membranolitičkih efekata (173, 174).

Lipozomi predstavljaju sisteme transporta lekova u kojima je lek enkapsuliran u zatvorenim sferičnim vezikulama sastavljenim od jednog ili više koncentričnih lipidnih slojeva oko centralnog hidrofилnog jezgra. Specifična struktura lipozoma omogućava inkorporaciju kako liposolubilnih lekova u lipidni sloj tako i hidrosolubilnih supstanci u unutrašnju hidrofилnu fazu, kao i peptida i malih proteina u lipidno-vodeni intrfejs. Lipozomi omogućavaju ciljanu distribuciju lekova do specifičnih tkiva ili organa, a oslobađanje leka zavisi od stabilnosti i farmakokinetikog profila koji su uslovljeni sastavom, veličinom, površinskim nabojem i solubilnošću leka. Ubrzo nakon otkrića, lipozomi su ispitani kao sistemi za peroralnu primenu peptida i proteina. Iako lipozomi nakon peroralne administracije stabilizuju proteine unutar gastrointestinalnog trakta do izvesnog stepena, uticaj aciditeta želudačnog soka, pankreasnih enzima i žučnih soli pokazuju negativne efekte (175).

Međutim, iako žučne soli destabilišu lipozomalne membrane, one takođe vrše stabilizaciju lipidnih vezikula prema daljem dejstvu žučnih soli u gastrointestinalnom traktu. Na osnovu toga dizajnirani su lipozomi koji sadrže žučne soli, bilozomi, koji predstavljaju značajno stabilnije nosače u odnosu na konvencionalne lipozomalne sisteme. Pored toga, žučne soli u

njihovom sastavu poboljšavaju transport i apsorpciju lekova (176). Bilozomi kao novi koloidni nosači imaju potencijalnu primenu u peroralnoj imunizaciji pri čemu su ispitani kao *per os* transportni sistemi u primeni tetanusnog toksoida, virusa influence i antigena hepatitis B virusa sa razvojem sistemskog i lokalnog imunog odgovora (177-179). Studije peroralne primene insulina u vidu bilozoma su demonstrirale poboljšanje glikemije, mimikriju endogene sekrecije insulina i delovanje na entero-insularnu osu, slično endogeno-sintetisanom insulinu (180). Bilozomalna primena kalcitonina, fenofibrata, ciklosporina A, cefotaksima i drugih lekova koji zbog proteinske strukture ili loše bioraspoloživosti ne mogu da se primenjuju *per os* u slobodnom obliku otvara nove farmakoterpijske mogućnosti.

Organotropizam žučnih kiselina i afinitet prema proteinskim transportnim sistemima u okviru enterohepatičkog sistema su iskorišćeni za selektivno terapijsko ciljanje tkiva jetre, za poboljšanje intestinalne apsorpcije i metaboličke stabilnosti leka (181). Žučne kiseline mogu da predstavljaju nosače linkera različite strukture, dužine, naelektrisanja, funkcije i stereohemije. Kao gradivni blokovi, žučne kiseline omogućavaju dodavanje različitih lekova za jednu od funkcionalnih grupa, uključujući hidroksilne grupe na položajima C3, C7, C12 ili karboksilnu grupu bočnog lanca na položaju C24. Ovakvi konjugati ispoljavaju interakcije sa transporterima žučnih kiselina potvrđujući hipotezu da žučne kiseline u vidu „trojanskog konja“ mogu da menjaju farmakokinetika i farmakodinamska svojstva lekovite supstance koju nose (144). U skladu sa predikcijama kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti, QSAR, na modelima transportera, najefikasnije molekularno prepoznavanje od strane membranskih transportera hepatocita i ilealnih enterocita se postiže povezivanjem leka za položaj C3 (182). Na primer, konjugat HMG-CoA reduktaze povezan amidnom vezom za C3 poziciju derivata holne kiseline (S-3554) sa slobodnom C24 karboksilnom grupom je doveo do specifične inhibicije biosinteze holesterola u hepatocitu. Nasuprot tome, odgovarajući taurinski konjugat primenjen u portnu venu je nepromenjen transportovan kroz hepatocit i izlučen u žuč, bez intracelularnog oslobađanja leka i inhibicije HMG-CoA reduktaze. Ovi rezultati pokazuju da intracelularni prenos leka i dostupnost organelama može biti koordiniran konjugacionim statusom bočnog lanca žučne kiseline (183). Takođe hlorambucil-tauroholat konjugat, S2776, je ispoljio sva farmakokinetika svojstva konjugata žučne kiseline uključujući specifične interakcije sa ilealnim transporterom IBAB-P, selektivnim hepatičkim preuzimanjem konjugata iz portne cirkulacije sa promenom puta sekrecije leka sa renalnog na bilijarni put, transcelularni transport iz krvi u žuč u

kompeticiji sa prirodnim žučnim kiselinama, selektivno preuzimanje od strane ćelija humanog hepatocelularnog karcinoma pomoću NTCP i OATP transportera uz očuvanu alkilirajuću antitumorsku aktivnost leka u obliku konjugata (184). Takođe, ASBT transportni sistem četkastog pokrova enterocita ima sposobnost da prepozna kao supstrat konjugate žučnih kiselina sa lekovima i peptidima, čime se potencijalno može povećati intestinalna resorpcija leka. Iako je dodavanje peptida na C24 položaj bočnog lanca žučne kiseline moguće, resorpcija ovakvih konjugata u ileumu je mala, budući da je negativni naboj bočnog lanca žučne kiseline neophodan za molekularno prepoznavanje od strane transportera.

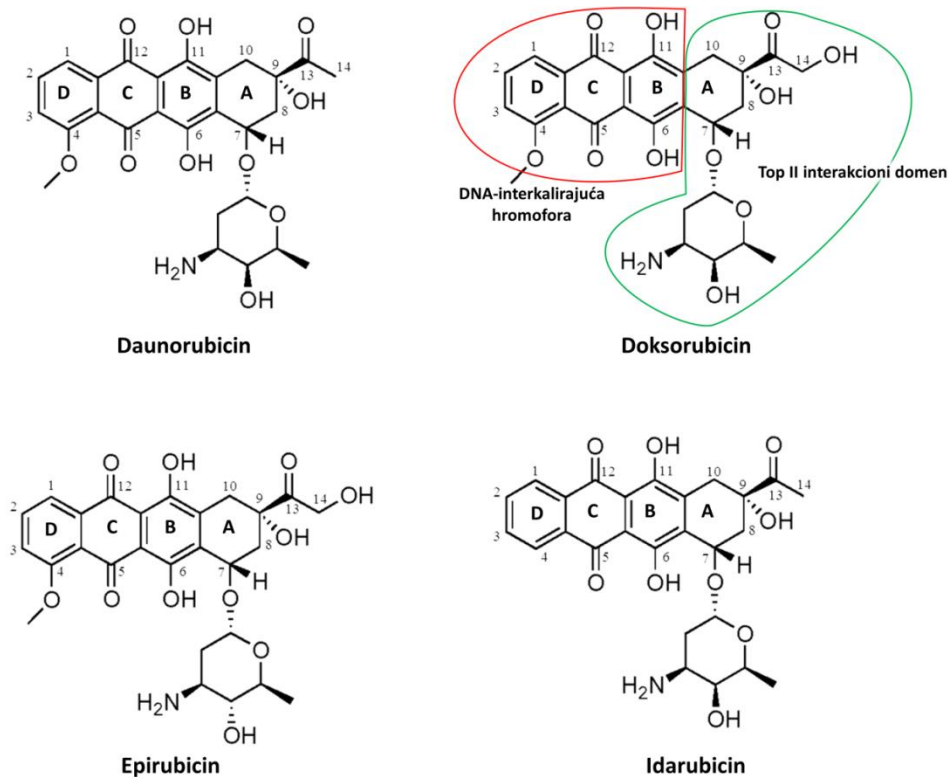
1.2. Doksorubicin

1.2.1. Doksorubicin - antraciklinski citostatik

Zahvaljujući visokoj kliničkoj efikasnosti i širokom terapijskom spektru, doksorubicin predstavlja jedan od najčešće upotrebljivanih antineoplastičkih agenasa. Ovaj antitumorski agens je sastavna komponenta brojnih hemoterapijskih protokola primenjivanih u pedijatrijskoj i adultnoj populaciji, sa dokazanom efikasnošću u terapiji solidnih neoplazmi (karcinoma i sarkoma) i u terapiji hematoloških maligniteta (limfoma i leukemija) (185, 186). Uvođenje doksorubicina u kliničku praksu predstavlja jedan od najvećih uspeha u onkologiji, što je naročito evidentno u pedijatrijskoj onkologiji gde je stopa petogodišnjeg preživljavanja pedijatrijskih pacijenata sa malignitetima povećana sa približno 30% tokom 1960-tih do 80% danas (187, 188).

Doksorubicin spada u klasu I antraciklinskih antibiotika. Izolovan je 1969. godine iz acinetobakterije *Streptomyces peucetius* (var. *caesius*) nakon što je primenom N-nitrozoN-metil uretana izazvana mutacija kulture ovog daunorubicin-produkujućeg mikroorganizma. Antraciklini predstavljaju poliketide sastavljene od tetracikličnog prstena koji je povezan za šećernu komponentu glikozidnom vezom. Doksorubicin je amfifilan molekul koga čini hidrofobni aglikonski deo, adriamicinon ($C_{21}H_{18}O_9$) i hidrofilni aminošećer sa redukujućim svojstvima, baznog karaktera - daunozamin ($C_6H_{13}NO_3$). Aglikonski deo molekula čini rigidni tetraciklični prsten sa hinonskim i hidrohinskim grupama na C i B prstenu, metoksi supstituentu na C4 položaju D prstena i kratkim bočnim lancem na položaju C9 sa C13 karbonilnom grupom (**slika 1.2.1**). Daunozamin je povezan glikozidnom vezom za C7 položaj

prstena A. Doksorubicin se strukturno razlikuje od prvog izolovanog, prirodnog antraciklinskog citostatika, daunorubicina, u prisustvu primarnog alkohola na kraju bočnog lanca (pri čemu je kod daunorubicina prisutna metil grupa). Ova mala razlika u strukturi je odgovorna za razliku u terapijskom spektru dejstva daunorubicina koji se koristi u lečenju akutne limfoblastne i mijeloblastne leukemije. Epirubicin je semisintetski derivat doksorubicina dobijen aksijalno-ekvatorijalnom epimerizacijom hidroksilne grupe u položaju C4 daunozamina. Ova strukturna promena nije rezultovala u promeni terapijskog spektra, ali je rezultovala u značajnim farmakokinetским i metaboličkim promenama uključujući povećan volumen distribucije (Vd), 4-O-glukuronidaciju, povećan klirens i kraće poluvreme eliminacije u odnosu na doksorubicin. Idarubicin, analog daunorubicina dobijen nakon uklanjanja 4-metoksi grupe ima širi terapijski spektar u odnosu na daunorubicin što se objašnjava većom lipofilnošću molekula i boljim prodorom u ćelije (189).



Slika 1.2.1. Hemijska struktura antraciklinskih citostatika daunorubicina, doksorubicina, epirubicina i idarubicina. Preuzeto i modifikovano iz Edwardson i sar.

Zahvaljujući prisustvu jonizujućih grupa, doksorubicin ima tri pK_a vrednosti: $pK_1=8,15$ zahvaljujući prisustvu amino grupe šećerne komponente; $pK_2=10,16$ koja je u vezi sa fenolnom grupom na poziciji C11 i $pK_3=13,2$ kao rezultat prisustva fenolne grupe na poziciji C6 (190). Najčešće primenjivan hidrosolubilni oblik doksorubicina je doksorubicin hidrohlorid - higroskopni igličasti liofilizat narandžasto-crvene boje. Vodeni rastvori ove soli su žuto-narandžaste boje u kiseloj sredini, narandžasto-crveni u neutralnoj, a ljubičasto plavi na $pH>9$. Ova promena boje je posledica prisustva dihidroksiantrahinonske hromofore. Bilo koja varijacija u grupama hromofore, uslovljena promenama pH, vrstom solventa, prisustvom vezujućih jona i njihovom koncentracijom, koncentracijom leka i drugim faktorima indukuje promenu apsorpcionog spektra (191).

Zahvaljujući postignutom uspehu u terapiji različitih maligniteta uložen je značajan napor u karakterizaciji novih antraciklina, što je rezultovalo u razvoju približno 2000 novih analoga (189). Međutim, pored doksorubicina, daunorubicina, epirubicina i idarubicina, u kliničkoj primeni se nalazi još samo nekolicina antraciklina uključujući karminomicin, pirarubicin, aklarubicin, valrubicin i zorubicin. Kliničku primenu antraciklina ograničavaju dve pojave zajedničke svim antitumorskim agensima - razvoj rezistencije malignih ćelija i toksični efekti prema normalnim tkivima (192, 193). Osim toksičnih neželjenih dejstava zajedničkih sa mnogim drugim antineoplastcima (mijelosupresija, reverzibilna alopecija, nauzeja, vomitus, mukozitis-stomatitis i ezofagitis, ulceracije i nekroze intestinuma i kolona, periferna neurotoksičnost), antracikline, a posebno doksorubicin karakteriše kumulativna dozno-zavisna kardiotoksičnost sa razvojem kardiomiopatije koja progredira u kongestivnu srčanu insuficijenciju fatalnu za oko 60% bolesnika (194).

U cilju prevazilaženja navedenih limitacija potrebna su istraživanja usmerena ka razvoju novih formulacija antraciklinskih citostatika sa unapređenim farmakodinamskim i farmakokinetičkim osobinama. S obzirom na činjenicu da je razvoj novih lekova spor i veoma skup proces, poboljšavanje osobina već postojećih lekova sa dokazanom efikasnošću predstavlja racionalan pristup u razvoju novih terapijskih strategija u savremenoj terapiji onkoloških pacijenata.

1.2.2. Mehanizam antitumorske farmakodinamike doksorubicina

1.2.2.1. Interakcija sa proteazomom

Mehanizmi antineoplastičke aktivnosti doksorubicina u osnovi uključuju interakcije sa nukleusom, mitohondrijama i biološkim membranama malignih ćelija, iako ovi subcelularni kompartmani predstavljaju mete delovanja i u normalnim ćelijama. Antitumorska aktivnost doksorubicina se zasniva na sposobnosti rapidne difuzije u nukleus i interakcije sa DNA malignih ćelija.

Doksorubicin prolazi kroz ćelijsku membranu pasivnom difuzijom i pomoću import transportnog proteina SLC22A16 (*Solute Carrier Family 22 Member 16*). Nakon penetracije kroz ćelijsku membranu, doksorubicin u citoplazmi formira kompleks sa proteazomom čime se olakšava transport prema nukleusu. Proteazomi predstavljaju citoplazmatski i jedarni kompleks proteaza sa ulogom nelizosomalne degradacije citoplazmatskih i nuklearnih proteina kao i u procesovanju i degradaciji regulatornih proteina koji kontrolišu ćelijsku proliferaciju i metabolizam. Iako su prisutni u oba celularna kompartmana, maligno transformisane ćelije i ćelije rapidno proliferišućih tkiva karakteriše dominantna kumulacija proteazoma u nukleusu (deplecija glukoze i hipoksija kao karakteristike solidnih tumora doprinose nuklearnoj lokalizaciji proteazoma). Doksorubicin sa 20S podjedinicom proteazoma formira kompleks u citoplazmi koji se zatim translocira u nukleus kroz pore na jedarnoj membrani (ATP-zavisan proces) nakon čega dolazi do disocijacije doksorubicina i proteazoma i vezivanje za DNA za koju doksorubicin ima veći afinitet (195). Budući da se doksorubicin vezuje za alosterno mesto 20S proteazoma sa himotripsinu-sličnoj proteaznom aktivnošću, delujući kao reverzibilni nekompetitivni inhibitor proteaze, biohemijske konsekvence i terapijski značaj doksorubicin-proteazom kompleksa se ogledaju u ciljanoj nuklearnoj kumulaciji leka i kumulaciji nedegradiranih proteina uključenih u mehanizme programirane ćelijske smrti (196, 197). U skladu sa navedenim tvrdnjama, inhibitori proteazoma predstavljaju nove potentne terapijske agense u indukciji apopotoze, a činjenica da se inhibitori proteazoma i antraciklini vezuju za različita katalitička ili alosterna mesta na proteazomu predstavlja osnov za kombinovanu primenu ovih lekova sa aditivnim ili sinergističkim efektom (198).

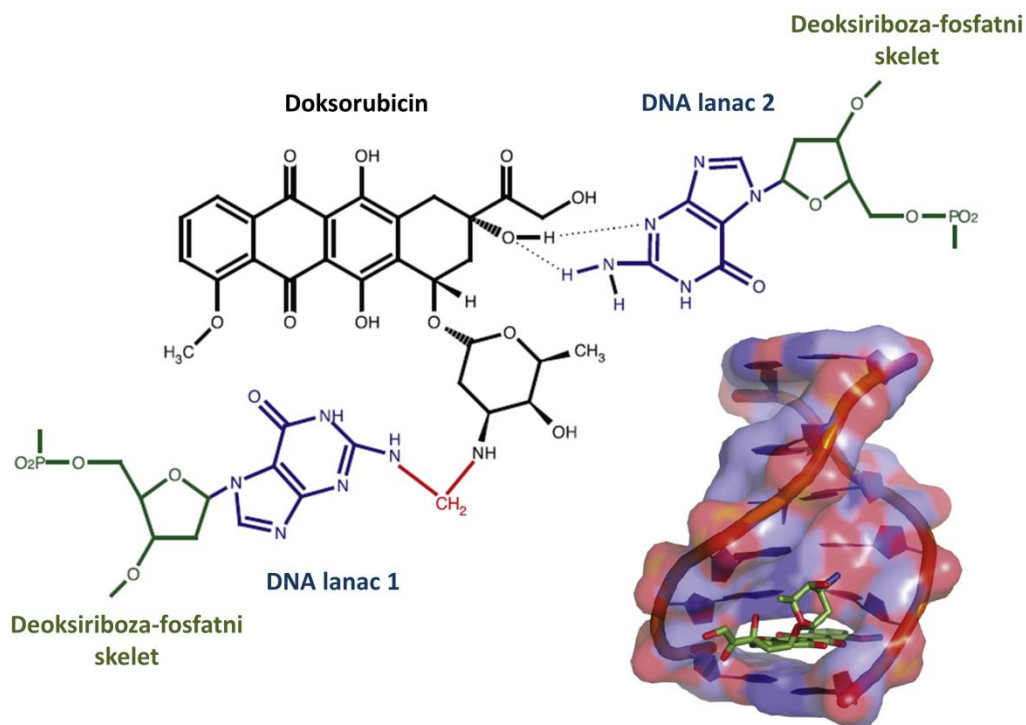
1.2.2.2 Inhibicija topoizomeraze II

Topoizomeraze tipa II (TOP-II) imaju značajnu ulogu u različitim celularnim procesima uključujući replikaciju, transkripciju, kondenzaciju hromozoma i segregaciju. TOP-II je ATP-zavisan enzim koji je, kod čoveka, prisutan u vidu dve izoforme, TOP-II α i TOP-II β . Ovaj enzim se vezuje za superspiralizovane segmente DNA, dovodi do prekidanja dvostrukog heliksa DNA i provlačenja segmenata kroz nastali zjap pri čemu se smanjuje torzioni stres koji nastaje u toku replikacije i transkripcije. Osnovni antitumorski mehanizam, u vezi sa klinički-relevantnim koncentracijama doksorubicina (opisan je pri koncentracijama 0,4 μ M, ali koncentracije su različite kod različitih tipova malignih ćelija(186)) podrazumeva interakciju sa TOP-II α , enzimom visoko eksprimiranom u ćelijama sa visokim proliferativnim indeksom i u tumorskim ćelijama, za razliku od ćelija u fazi mirovanja. TOP-II α je enzim od značaja u ćelijskoj proliferaciji i njegova ekspresija se povećava dva do tri puta u toku tranzicije G2/M (199). TOP-II α modifikuje topologiju DNK bez alteracije strukture ili sekvence deoksinukleotida, dovodeći do generisanja intermedijernog kompleksa DNA-TOP-II α i prekida u oba lanca DNA pri čemu se monomerne subjedinice dimernog enzima kovalentno vezuju za DNA uspostavljanjem 5'-fosfotirozil veze. Vezivanje doksorubicina za TOP-II α rezultuje u stabilizaciji DNA-TOP-II α kompleksa usled čega doksorubicin konvertuje TOP-II α u potentan genotoksin, koji, sprečavanjem ligacije DNA lanaca omogućava kumulaciju dvolančanih prekida praćenih zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G1 i G2 fazi, naročito u G2/M tranziciji, i indukcijom apoptoze aktivacijom i nuklearnom translokacijom tumor supresora p53 (199, 200). Alteracije u ekspresiji *TOP-II α* gena i aktivnosti TOP-II α predstavljaju molekularni osnov razvoja rezistencije malignih ćelija prema antraciklinima uključujući doksorubicin. Inhibicijom aktivnosti TOP-II α doksorubicin suprimira procese replikacije i transkripcije, ali i procese reparacije DNA usled superspiralizacije molekula (201). Doksorubicin takođe inhibira i topoizomerazu I (TOP-I). enzim koji generiše jednolančane prekide heliksa DNA, međutim ovo je jedan od pomoćnih mehanizama antitumorske aktivnosti (202).

1.2.2.3. DNA interkalacija i drugi genotoksični mehanizmi doksorubicina

Zahvaljujući katjonskoj prirodi, doksorubicin ima izražen afinitet prema anjonskoj DNA, a planarni tetraciklični prsten ima tendenciju interkalacije između baznih parova unutar DNA heliksa. Kristalografskom analizom pomoću X zraka je utvrđeno da jedan molekul doksorubicina

interkalira između svakog petog baznog para (203). Kao DNA interkalator, doksorubicin se češće ugrađuje između gvanin-citozin baznih parova, verovatno usled specifične izgradnje vodoničnih veza između doksorubicina i gvanina (**slika 1.2.2.3**) (200). Nastala interakcija može biti stabilisana kovalentnim vezama između doksorubicina i gvanina uspostavljenim posredstvom formaldehida, koji nastaje kao produkt reakcije ROS sa lipidima. Uspostavljanje vodoničnih veza između hidrosilnih grupa aglikonskog dela molekula sa amino grupom daunozamina stabilizuje poziciju interkaliranog leka inhibišući DNA polimerazu i replikaciju DNA, ali i transkripciju mRNA usled inhibicije RNA polimeraze (204). Studije novijeg datuma su pokazale da se interkalacija doksorubicina u značajnom stepenu javlja i na nivou mitohondrijalne DNA (mtDNA) sa konsekvencama vezanim za mitohondrijalnu bioenergetsku funkciju i aktivacijom mitohondrijalnog puta programirane ćelijske smrti (205). Formiranje doksorubicin-DNA adukta aktivira odgovor na oštećenje DNA i indukuje ćelijsku smrt nezavisno od TOP-II. Ovaj mehanizam ćelijske smrti je takođe prisutan pri klinički-relevantnim koncentracijama doksorubicina i opisan je pri koncentracijama 0,025 μM (206).



Slika 1.2.2.3. Struktura doksorubicin-DNA kompleksa.

Interkalacija doksorubicina rezultuje u topološkim konsekvencama i torzionim alteracijama u DNA molekulu. Interkalacija jednog molekula doksorubicina dovodi do relaksacije heliksa za -27° sugerišući značajno smanjenje uvijanja u prisustvu leka, a navedena promena u spiralizaciji indukuje kompenzatorne pozitivne torzione sile (200). Povećanje torzionog stresa utiče na destabilizaciju nukleozoma sa implikacijama u promenama genske ekspresije, naročito ukoliko se ove promene odigravaju u regionu promotora.

Drugi opisani genotoksični mehanizmi delovanja doksorubicina u submikromolarnom opsegu koncentracija obuhvataju alkilaciju DNA i unakrsno povezivanje (umrežavanje), interferiranje sa DNA helikazom i odvijanjem lanaca DNA, ali smatra se da navedeni mehanizmi ne doprinose značajno antitumorskoj aktivnosti leka (207). Doksorubicin takođe inhibira aktivnost telomeraze u malignim ćelijama, onemogućavajući obnavljanja telomera hromozoma (208). Inhibicijom aktivnosti telomeraze se revertuje imortalni fenotip maligne ćelije, dok prekidi u DNA (uključujući i telomernu DNA) pokreću odgovor ćelije na oštećenje DNA, starenje i programiranu ćelijsku smrt.

1.2.2.4. Doksorubicinom-indukovan oksidativni stres

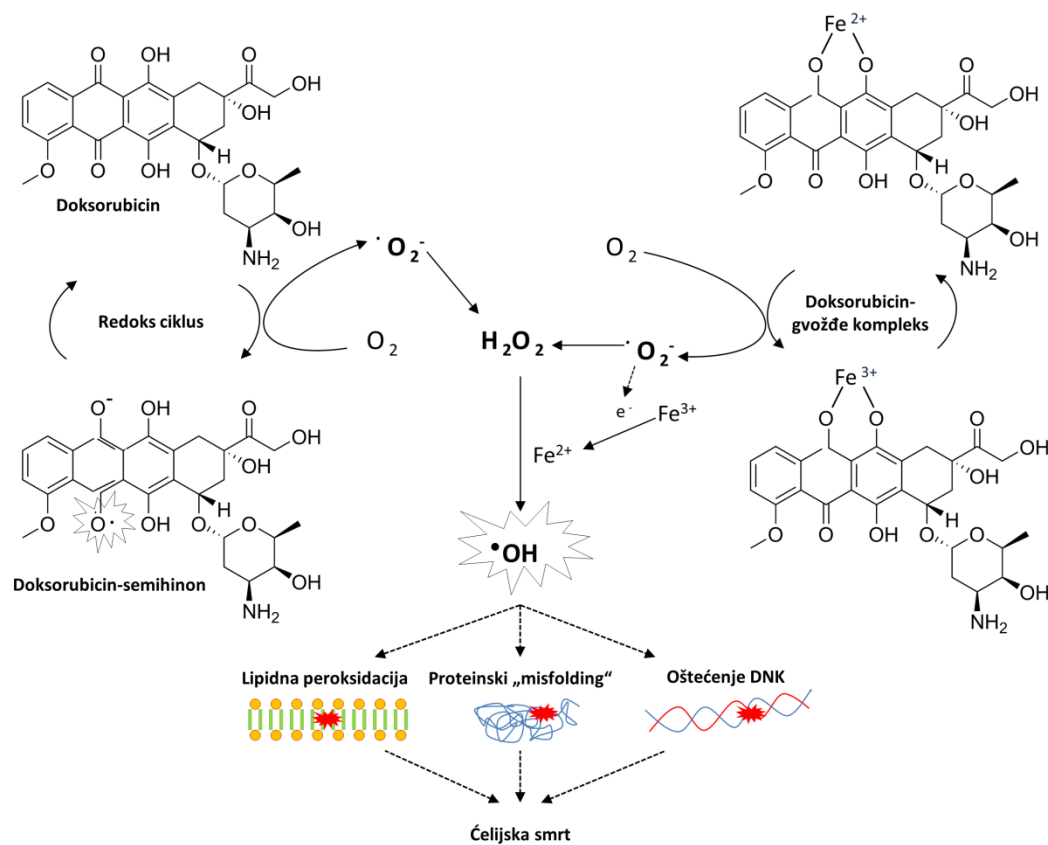
Povećano stvaranje ROS sa posledičnim oksidativnim modifikacijama nukleinskih kiselina, proteina i celularnih membrana parcijalno doprinosi antitumorskoj aktivnosti doksorubicina (opisan je pri koncentracijama $0,1 \mu\text{M}$ (209)), ali se smatra značajnim mehanizmom neželjenih toksičnih efekata. Dve osnovne teorije koje objašnjavaju doksorubicinom-indukovanu produkciju ROS obuhvataju enzimski redoks ciklus semihinona i ne-enzimsko formiranje kompleksa doksorubicina sa gvožđem (**slika 1.2.2.4**).

Zahvaljujući prisustvu hinonskih i hidrohinskih struktura, doksorubicin ima potencijal prihvatanja elektrona i redukcije, odnosno redoks ciklusa. Jednoelektronskom redukcijom hinona pomoću nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH)/ citohrom P-450 reduktaze ili nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) dehidrogenaze nastaje nestabilan semihinonski radikal koji promptno predaje elektron molekularnom kiseoniku pri čemu nastaje superoksid anjon radikal (O_2^-) uz regeneraciju hinona koji, potom, ponovo može da se redukuje (**slika 1.2.2.4**). Ova sekvenca reakcija je poznata kao redoks ciklus doksorubicina (210). Novosintetisani superoksid radikal se zatim, enzimskim putem pomoću superoksid dismutaze (SOD) konvertuje

u vodonik peroksid (H_2O_2). Doksorubicin je dobar helator gvožđa te u prisustvu neadekvatno sekvestriranih tranzicionih metala, naročito Fe^{2+} gradi kompleks koji u *Fenton*-ovoj reakciji katalizuje konverziju vodonik peroksida je u visoko reaktivni hidroksilni radikal ($\cdot OH$). Takođe, u *Haber-Weiss*-ovoj reakciji superoksid radikal predaje elektron oksidovanoj formi gvožđa rezultujući u stvaranju redukovanog gvožđa i promociji stvaranja hidroksilnog radikala *Fenton*-ovom reakcijom (210). Superoksid anjon radikal i vodonik peroksid nisu visoko reaktivni *per se*, zbog čega se ne smatraju visoko štetnim kiseoničnim vrstama. Međutim, hidroksilni radikal je jedan od najpotentnijih ROS koji inicira oksidativno oštećenje DNA, oksidaciju tiolnih grupa funkcionalnih proteina, a usled reakcije sa nesaturisanim masnim kiselinama dovodi do peroksidacije lipidnih membrana sa posledičnim oštećenjem celularne funkcije. Osim toga, superoksid anjon u reakciji sa azot oksidom formira toksični peroksinitritni anjon ($ONOO^-$).

Zahvaljujući redoks ciklusu, male koncentracije doksorubicina koncentracija mogu da produkuju značajne koncentracije superoksid radikala. Opisano je da se redoks ciklus doksorubicina odvija u citosolu, peroksizomima, mitohondrijama i endoplazmatskom (sarkoplazmatskom) retikulumu i katalisan je pomoću NADPH-zavisnih oksidoreduktaza (citohrom P450 ili citohrom b5 reduktaze, mitohondrijalne NADH dehidrogenaze, ksantin dehidrogenaze i endotelne azot oksid sintetaze (reduktazni domen)) (185, 210).

U toku redoks ciklusa moguća je oksidacija semihinona sa reduktivnom deglikozidacijom i formiranjem 7-deoksiaglikona. Zahvaljujući visokoj liposolubilnosti, aglikoni lako interkaliraju u biološke membrane formirajući ROS (211). Tautomer 7-deoksiaglikona, C7-hinon metid se kovalentno vezuje za DNA, ali i produkuje ROS u neposrednoj blizini DNA (193). Iako ne postoji sumnja da, zahvaljujući hemijskoj strukturi, doksorubicin i drugi antraciklini dovode do povećane produkcije ROS u malignim ćelijama uzrokujući oksidativno oštećenje makromolekula, citotoksični efekti na linijama tumorskih ćelija posredovani ROS se javljaju samo pri primeni visokih, suprakliničkih koncentracija doksorubicina (186). Međutim, nakon izlaganja malignih ćelija klinički-relevantnim dozama doksorubicina, inhibicija TOP-II α predstavlja osnovni mehanizam antitumorske aktivnosti.



Slika 1.2.2.4. Mehanizmi doksorubicinom-indukovanog oksidativnog stresa.

1.2.2.5. Povećana produkcija ceramida

Pored povećane produkcije ROS i oksidativnog metabolizma, doksorubicin povećava nivo ceramida, a navedeni efekt je opisan pri koncentracijama 0,3 μM (212). Ceramid, lipid koji se sastoji od sfingozina i masne kiseline je medijator brojnih celularnih procesa uključujući zaustavljanje ćelijskog ciklusa, apoptozu i starenje. Pokazano je da doksorubicin povećava nivo ceramida u MCF-7 ćelijama, ali ne i u doksorubicin-rezistentnoj MCF-7 ćelijskoj liniji, što sugerše da nivo ceramida može da posreduje u razvoju rezistencije. Zaista, povećana ekspresija glikozilceramid sintetaze, enzima koji konvertuje ceramid u glikozilceramid, je udružena sa razvojem rezistencije na doksorubicin, dok supresija ovog enzima uspostavlja ponovnu senzitivnost ćelija (213).

1.2.3. Farmakokinetičke karakteristike i metabolizam doksorubicina

Bioraspoloživost doksorubicina nakon peroralne primene je <1% zbog čega se primenjuje parenteralnim putem. Nakon intravenske administracije, doksorubicin se od 50 do 80% transportuje vezan za proteine plazme sa volumenom distribucije u ravnotežnom stanju 680 L/m² (214). Koncentracija leka u krvi rapidno opada usled brze distribucije (poluvreme distribucije iznosi oko 5 min), prodora u tkiva i intranuklearne retencije u ćelijama. Doksorubicin ulazi u ćelije dominantno pasivnim influksom (i pomoću SLC22A16 transportera organskih katjona) pri čemu se postižu 10 do 500 puta više intracelularne koncentracije u odnosu na ekstracelularni nivo (190). Intracelularno, koncentracija leka u nukleusu je oko 50 puta viša u poređenju sa citoplazmom, dok je oko 0,2% ukupne intracelularne količine leka heterogeno doistribuirano i sekvstrirano u organelama (lizozomi, mitohondrije i Goldžijev aparat) (215, 216). Doksorubicin ne prolazi hemato-encefalnu barijeru. Najveća kumulacija leka je zabeležena u jetri, dok su koncentracije leka u koštanoj srži i leukocitima i do 500 puta više u odnosu na koncentracije u plazmi.

Biotransformacija doksorubicina se odvija primarno u jetri, stereospecifičnom redukcijom okso grupe u C13 položaju pri čemu nastaje alkoholni metabolit – doksorubicinol. Ove reakcije su katalisane od strane citoplazmatskih NADPH-zavisnih enzimskih sistema karbonil reduktaza (CBR) i aldo-keto reduktaza (AKR). Metabolizam doksorubicina i doksorubicinola uključuje i hidrolitičko cepanje glikozidne veze, O-demetilaciju, O-sulfaciju i O-glukuronidaciju. Kiselom hidrolizom glikozidne veze i odvajanjem daunozamina nastaju doksorubicinon (od doksorubicina) i doksorubicinolon (od doksorubicinola). Reduktivnim uklanjanjem šećerne komponente u položaju C7 sa protonacijom C7 aglikonskog radikala nastaje 7-deoksidoksorubicinon odn. 7-deoksidoksorubicinolon. 7-deoksiaglikoni su izrazito lipofilni i za dalju ekskreciju je neophodna konjugacija sa sulfonskom ili glukuronskom kiselinom (189). U poređenju sa najznačajnijim metabolitom doksorubicina, doksorubicinolom, aglikoni se mogu detektovati u telesnim tečnostima pacijenata kratkotrajno i u niskim koncentracijama.

Klirens doksorubicina se dominantno odvija hepatobilijarnom rutom pri čemu se više od 50% leka sekretuje putem žuči unutar prvih 7 dana od početka tretmana. Nakon bolus intravenske injekcije doksorubicin se pojavljuje u žuči nakon 3-5 minuta. Unutar 24 časa se 10-20% leka ekskretuje fecesom, a 40-50% ukupne doze nakon 150 časova. Renalni klirens

doksorubicina je nizak i 12% ukupne doze se izluči urinom u toku 6 dana nakon administracije. Nepromenjen doksorubicin je najzastupljeniji ekskretovan oblik praćen nižim koncentracijama alkoholnog metabolita i aglikona (217). Profil koncentracija doksorubicina u plazmi nakon intravenske primene karakterišu tri faze: rapidna inicijalna distribuciona faza $t_{1/2\alpha}$ 3-5 minuta, intermedijerna faza $t_{1/2\beta}$ 1-2 časa i terminalna faza eliminacije $t_{1/2\gamma}$ 24-36 časova, iako je opisana i četvrta faza eliminacije $t_{1/2\delta}$ od 110 časova što predstavlja 30% ukupne površine ispod krive doksorubicina u vremenu (AUC). Koncentracija doksorubicinola u plazmi se rapidno povećava, a zatim smanjuje prateći dinamiku smanjivanja koncentracija doksorubicina, međutim, administracijom u vidu kontinuirane intravenske infuzije koncentracije doksorubicinola u plazmi mogu da budu više u odnosu na koncentracije doksorubicina. Pojava ponovnog pika doksorubicinola, 4-8 časova nakon administracije doksorubicina, ukazuje na prisustvo entero-hepatičke recirkulacije (218).

1.2.4. Toksodinamske karakteristike doksorubicina

Neselektivno delovanje doksorubicina na tumorsko, ali i zdrava tkiva, rezultuje u pojavi neželjenih dejstava koja obuhvataju širok spektar manifestacija uključujući, mijelosupresiju, reverzibilnu alopeciju, gastrointestinalni mukozitis, ulceracije i nekroze intestinuma i kolona, perifernu neurotoksičnost, nefrotoksičnost, testikularnu toksičnost pri čemu hepatotoksičnost i kardiotoksičnost predstavljaju najveći zdravstveni problem.

1.2.4.1. Hepatotoksičnost doksorubicina

Jetra predstavlja primarni organ uključen u biotransformaciju lekova i često je mesto doksorubicinom-indukovanog oštećenja. Kod oko 40% doksorubicinom-tretiranih pacijenata se javlja neka forma oštećenja jetre (193). Doksorubicin se kumulira u značajnim koncentracijama u jetri i metaboliše, pre svega jednoelektronskom redukcijom pomoću CYP2B1, NADPH reduktaze, ili drugih flavinskih mikrozomalnih enzima prilikom čega dolazi do produkcije visokih koncentracija ROS koji posledično indukuju oksidativno oštećenje makromolekula hepatocita (219). Dodatna deplecija antioksidanasa – pre svega redukovanog glutationa i vitamina E uzrokuje oksidativni stres hepatocita (193). Hiperprodukcija ROS aktivira I κ B kinazu što rezultuje u aktivaciji NF- κ B i proinflamatornih citokina koji zatim indukuju apoptozu. Poremećaji na nivou mitohondrija, uključujući poremećaje respiratornog lanca/sistema

oksidativne fosforilacije rezultuju u depleciji ATP-a, ADP-a i AMP-a čime se smanjuje efluks doksorubicina pomoću ATP-zavisnih ABC transportnih proteina i omogućava intracelularna kumulacija.

1.2.4.2. Kardiotoksičnost doksorubicina

Razvoj antitumorske terapije i unapređenje lečenja onkoloških pacijenata rezultovao je u značajnoj redukciji mortaliteta i u produženju perioda života bez relapsa maligniteta. Međutim, sekundarni, latentni efekti hemoterapije su postali značajan problem. Doksorubicinom-indukovana kardiotoksičnost predstavlja jedan od najvećih izazova u kardio-onkologiji, naročito kod uspešno lečenih onkoloških pacijenata nakon dužeg vremenskog perioda. Doksorubicinska kardiotoksičnost se, u zavisnosti od vremena manifestacije simptoma klasifikuje kao akutna, subhronična i hronična. Akutna se javlja u toku ili nekoliko dana nakon primene visokih doza doksorubicina i najčešće se manifestuje u vidu elektrokardiografskih promena kao što su sinusna tahikardija, pojava prevremenih supraventrikularnih i ventrikularnih kompleksa, smanjene QRS voltaže, prolongacije QT intervala i, retko, u vidu pojave akutne ishemije miokarda (220). Navedene akutne promene se javljaju kod približno 1% pacijenata i tipično se spontano povlače nakon prekida hemoterapije. Subhronična kardiotoksičnost se javlja kod 2% pacijenata, nekoliko dana nakon primene doksorubicina i klinički se manifestuje u vidu perikarditis-miokarditis sindroma. Hronične manifestacije kardiotoksičnosti se manifestuju strukturnim i funkcionalnim promenama, u vidu hronične dilatacione-hipokinetske kardiomiopatije, koja progredira u srčanu insuficijenciju refrakternu na konvencionalnu terapiju (221). Ovu formu kardiotoksičnosti karakteriše loša prognoza sa visokom stopom mortaliteta od 60% unutar dve godine. Za razliku od odraslih pacijenata kod kojih se javlja dilatativna kardiomiopatija, kod pedijatrijskih onkoloških pacijenata kardiomiopatija ima tendenciju progresivnog prelaska u restriktivnu formu (222).

Hronična kardiotoksičnost može da se manifestuje kao rana forma, unutar prve godine nakon primene poslednje doze doksorubicina, i kao kasna, odložena, forma u kojoj se manifestacije kardiotoksičnosti javljaju nekoliko godina i decenija nakon završetka hemoterapije. Odložena forma se javlja češće, naročito kod izlečenih pedijatrijskih onkoloških pacijenata (187).

1.2.4.2.1. Faktori rizika udruženi sa razvojem doksorubicinom-indukovane kardiomiopatije

Jedan od osnovnih faktora koji doprinosi razvoju kardiomiopatije je kumulativna doza doksorubicina. Procenjeni rizik za kumulativnu dozu doksorubicina od 400 mg/m² je 3-5%, za 550 mg/m² je 7-26% a za dozu od 700 mg/m² je 18-48%. Međutim, pojava oštećenja kardiomiocita je zabeležena već pri kumulativnoj dozi od 240 mg/m² što indikuje da bezbedna doza doksorubicina ne postoji. Štaviše, kumulacija doksorubicina u kardiomiocitima počinje od prve primenjene doze (223). Uzrast pacijenata je takođe značajan faktor, budući da je tendencija pojave ovog neželjenog dejstva veća kod dece i starih osoba. Takođe, veći adipozitet doprinosi većoj sklonosti ženskih pacijenata u odnosu na mušku populaciju. Smatra se da su navedene polne razlike u predispoziciji posledica doziranja doksorubicina u odnosu na telesnu masu i smanjene kumulacije doksorubicina u masnom tkivu, što dovodi do ekspozicije kardiomiocita višim koncentracijama doksorubicina (224). Kardiovaskularni komorbiditet, konkomitantna medijstinalna iradijaciona terapija ili konkomitantna upotreba drugih antineoplastika uključujući ciklofosamid, cisplatin, bleomicin, mitoksantron i monoklonalno anti HER-2 antitelo – trastuzumab su faktori koji doprinose kardiotoksičnim efektima doksorubicina (225).

Hronična doksorubicinom-indukovana kardiomiopatija predstavlja značajan javno-zdravstveni problem budući da godinama nakon završetka hemoterapije može da bude asimptomatska, predstavljajući dugoročnu opasnost, sve do progresivne deterioracije u klinički-značajne događaje kao posledica različitih komorbiditeta, promena u stilu života ili dejstva stresora iz okoline. Ovo je naročito relevantno kod odraslih osoba izlečenih od maligniteta u pedijatrijskom uzrastu, budući da se doksorubicin primenjuje u oko 60% hemoterapijskih protokola. Procenjeno je da se kod 10% ovih izlečenih pacijenata simptomatska kardiomiopatija razvija do 15 godina nakon uspešno završene hemoterapije (226).

1.2.4.2.2. Molekularni mehanizmi doksorubicinom-indukovanog oštećenja kardiomiocita

Iako doksorubicin indukuje različite celularne odgovore, antitumorski efekti su uglavnom rezultat interakcija sa nukleusom malignih ćelija. Pretpostavlja se da su mehanizmi kardiotoksičnosti različiti od antitumorskih mehanizama i da se u najznačajnijoj meri zasnivaju

na produkciji ROS, indukovanoj metabolizmom doksorubicina. Prema trenutno važećem konsenzusu, kardiomiopatija se razvija kao sumacija različitih procesa uključujući oksidativni stres, alteracije u homeostazi kalcijuma i gvožđa, poremećaje u mitohondrijalnoj bioenergetskoj funkciji, inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina i proteina, kumulaciju toksičnih metabolita doksorubicina i degradacije miofilamenata i komponenti citoskeleta (227).

Produkcija ROS je uključena u različite mehanizme oštećenja kardiomiocita. U većini somatskih ćelija stvaranje ROS se održava na određenom fiziološkom nivou, zahvaljujući aktivnosti antioksidativnog sistema, u koncentracijama koje zavise od metaboličkog profila tkiva. Međutim, miokard karakteriše izrazita vulnerabilnost prema oksidativnom stresu što je posledica nekoliko specifičnosti. Značajnu frakciju volumena kardiomiocita, oko 35% ćelijskog volumena, čine mitohondrije, zbog zavisnosti ovih ćelija od oksidativnog metabolizma i potrebe kontinuirane produkcije ATP-a u cilju omogućavanja kontinuirane kontraktilne funkcije miokarda (za razliku od miokarda, energetskei metabolizam malignih ćelija se uglavnom zasniva na glikolizi koja se odvija u citosolu usled *Warburg*-ovog efekta). Oštećenje mitohondrija kardiomiocita je jedna od najranijih i najprominentnijih histoloških karakteristika doksorubicinom-indukovanog oštećenja kardiomiocita (228). Kardiomiociti eksprimiraju mitohondrijalnu NAPH dehidrogenazu koja omogućava stvaranje velikih količina ROS u prisustvu doksorubicina (229). Mitohondrije kardiomiocita su jedinstvene po prisustvu NADH dehidrogenaze na intermembranskoj površini unutrašnje mitohondrijalne membrane, pored prisustva ovog enzima na površini membrane okrenute ka mitohondrijalnom matriksu. Drugi tipovi ćelija eksprimiraju ovaj enzim samo na matriksnoj površini unutrašnje mitohondrijalne membrane koja je, inače, impermeabilna za redukcionne ekvivalente iz matriksa. Međutim, kardiomiocitna „intermembranska“ NADH dehidrogenaza ima potencijal da redukuje doksorubicin u semihinon, ali i da uvodi redukcionne ekvivalente iz mitohondrijalnog citosola u elektron transportni sistem (ETS). Visoko lipofilni aglikoni lako prolaze kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu i istiskuju koenzim-Q, narušavajući funkcionalni integritet respiratornog lanca prenošenjem elektrona do molekularnog kiseonika umesto do kompleksa II, što rezultuje u stvaranju superoksid anjon radikala (229). U skladu sa navedenim, koncentracija koenzima-Q se akutno povećava u plazmi pacijenata u toku hemoterapije sa doksorubicinom. Poremećaj funkcije mitohondrija predstavlja Ahilovu tetivu miokarda, s obzirom na to da su ove

organele ujedno izvor i meta ROS. Destabilizacijom mitohondrijalne funkcije se aktivira njihov proapoptogeni potencijal.

Iako koriste značajnu količinu kiseonika, 8 ml O₂/min/100g, sa visokom zastupljenošću mitohondrija kao najznačajnijeg mesta utilizacije kiseonika, što su osnovni preduslovi produkcije ROS, kardiomiociti ekspimiraju nizak nivo antioksidativnih enzima kao što su katalaza (Cat) i glutation peroksidaza (GPx). Dodatno, aktivnost Cat, selen-zavisne GPx i sitosolne Cu, Zn – superoksid dismutaze (Cu, Zn-SOD) u kardiomiocitima se značajno smanjuje nakon tretmana doksorubicinom (230). Povećanje ekspresije Mn-SOD smanjuje oštećenje mitohondrija što je praćeno smanjenjem markera antraciklinima-indukovanog oštećenja kardiomiocita (231).

Jedna od prvih meta dejstva ROS su lipidima bogate membrane. Lipidna peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina rezultuje u formiranju reaktivnih i toksičnih produkata, uglavnom aldehida (kao što je malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal, heksanal ili akrolein). Osim efekata na lokalnom nivou, zahvaljujući dugom polu-životu i sposobnosti difuzije do mesta udaljenih od mesta stvaranja, produkti lipidne peroksidacije deluju u vidu sekundarnih glasnika oksidativnog oštećenja na druge udaljene makromolekularne mete. MDA reaguje sa egzocikličnom amino grupom deoksigvanozina, deoksiadenina i deoksicitidina formirajući alkilirane adukte (232). Oksidativne modifikacije membranskih fosfolipida menjanju permeabilnost ćelijske membrane i dovode do alteracija aktivnosti G protein-spregnutih receptora, enzima i signalnih molekula vezanih za membranu. ROS takođe dovode do promena konformacije i aktivnosti proteina, oksidacijom tiolnih grupa.

Budući da su ROS veoma reaktivni molekuli koji ne putuju daleko od mesta stvaranja, jedna od prvih meta njihovog dejstva je mtDNA koja je, zbog blizine ETS, nedostatka histona i reparacionih mehanizama, veoma vulnerabilna na dejstvo ROS. U kardiomiocitima je značajno intenzivnije doksorubicinom-indukovano oštećenje mtDNA u poređenju sa jedarnom DNA (233). Kumulativna oksidativna oštećenja mtDNA dovode do smanjene produkcije funkcionalnih mitohondrijalnih proteina i komponenti ETS, smanjujući bioenergetski kapacitet organele. Ovakav mehanizam deplecije ATP-a je značajan faktor nastanka kasne kardiomiopatije. Disfunkcionalnost ETS uz oštećenje mtDNA takođe može dovesti do dalje hiperprodukcije ROS, zatvarajući *circulus vitiosus*. Osim brojnih metaboličkih konsekvenci, deplecija ATP-a

onemogućava efluks doksorubicina pomoću ATP-zavisnih ABC transportnih proteina (233, 234).

Jedna od značajnih posledica dejstva ROS u miokardu je oslobađanje kalcijuma iz sarkoplazmatskog retikuluma. U kardiomiocitima se mitohondrije nalaze u neposrednoj blizini kalcijum-oslobađajućih mesta sarkoplazmatskog retikuluma i imaju potencijal prihvatanja značajne količine oslobođenog kalcijuma, što je u fiziološkim uslovima značajan tranzitorni mehanizam homeostaze ovog katjona. Međutim, tretman doksorubicinom i kumulacija ROS narušavaju mehanizme homeostaze citosolnog kalcijuma pomoću sarkoplazmatskog retikuluma. Ovo je praćeno nakupljanjem kalcijuma u matriksu mitohondrija što može da dovede do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, otvaranja MPT i oslobađanja proapoptotskih signalnih glasnika (235).

Osim produkcije ROS jednoelektronskom redukcijom doksorubicina u semihinon i oksidativnog oštećenja, dvoelektronskom redukcijom katalisanom pomoću NADPH-zavisnih CBR ili AKR nastaje doksorubicinol, sekundarni alkoholni metabolit. Doksorubicinol ima značajno slabiju antitumorsku aktivnost u odnosu na doksorubicin, ali ispoljava izrazita kardiotoksična svojstva – naročito u hroničnoj fazi primene doksorubicina. Doksorubicinol je značajno polarniji u odnosu na doksorubicin i teže se uklanja iz kardiomiocita predstavljajući dugotrajni toksični rezervoar. Budući da doksorubicinol ima mali potencijal jednoelektronske redukcije hinona, ovaj metabolit nema značajan prooksidantni potencijal. Međutim, doksorubicinol je veoma potentan inhibitor membranskih ATP-aza, kalcijum-regulatornih proteina ciklusa kontrakcije i relaksacije kao i citoplazmatske akonitaza/gvožđe regulatornog proteina-1, čime dovodi do progresije hronične kardiomiopatije (236).

1.2.4.2.3. Strategije u prevenciji doksorubicinske kardiotoksičnosti

Činjenica u razlikama koje postoje između mehanizma antitumorske aktivnosti doksorubicina i mehanizama kardiotoksičnosti, otvara prostor za razvoj kardioprotektivnih strategija bez umanjivanja potencijala antitumorske aktivnosti leka.

Odnos između farmakokinetičkih osobina doksorubicina, citotoksičnosti i kliničkog ishoda sugerše da povećanje pika koncentracije doksorubicina u plazmi direktno korelira sa povećanom incidencom kardiotoksičnih pojava (237). Stoga, rane strategije u prevenciji

kardiotoksičnosti su obuhvatile redukciju doze citostatika i prelazak sa bolus na sporu i.v. infuziju. Na ovaj način je smanjenje kumulativne doze i smanjenjem pika serumskih koncentracija smanjena i količina doksorubicina koja se kumulira u miokardu. Savremene smernice naglašavaju limit kumulativne doze do 450 mg/m^2 (223). Protokoli sa redukovanom dozom su umanjili, ali ne i kompletno eliminisali rizik od odložene kardiotoksičnosti.

Otkrivanje strukturnih analoga doksorubicina je preventivna strategija koja je rezultovala u sintezi epirubicina, 4'-epidoksorubicina, analoga koji se razlikuje od doksorubicina u aksijalno-ekvatorijalnoj epimerizaciji C4' hidroksilne grupe daunozamina (**slika 1.2.1**). Epirubicin je indikovao u lečenju mikrocelularnog karcinoma pluća, karcinoma dojke i želuca i uznapredovalog karcinoma ovarijuma. Epirubicin je ima znatno bezbednosni profil i kumulativne doze $>600 \text{ mg/m}^2$ nose rizik ekvivalentan dozi doksorubicina od 450 mg/m^2 , što je, smatra se, posledica razlika u sekvenciji u različitim subcelularnim kompartmanima i zaobilazanju mitohondrija (238). Međutim, epirubicin ispoljava približno 1,5 puta manju antitumorsku aktivnost u odnosu na doksorubicin. Pretpostavlja se da je ovo posledica razlika u metabolizmu i glukuronidaciji epirubicina u jetri posredstvom UGT2B7 i bilijarne i renalne ekskrecije. Epirubicin takođe ima manji potencijal interkaliranja u DNA malignih ćelija u odnosu na doksorubicin (239).

Primena pegilovanih lipozomalnih formulacija smanjuje koncentraciju slobodnog leka u plazmi i omogućava ciljanu distribuciju i kumulaciju doksorubicina u oblasti tumora. Veličina ovih nano-nosača je dovoljna za prolazak leka kroz diskontinuiran endotel neovaskulature tumorskog tkiva, a ujedno velika za prolazak između endotelnih ćelija koronarnih krvnih sudova, što rezultuje u selektivnom preuzimanju doksorubicina od strane tumorskog tkiva i smanjenog preuzimanja u miokardu, čak i pri dozama iznad 500 mg/m^2 (190). Međutim, primena lipozomalnih formulacija nije značajno povećala terapijsku efikasnost doksorubicina uglavnom zbog lošije internalizacije partikula i sporijeg oslobađanja inkapsuliranog leka (240).

Konkomitantna primena antioksidanasa sa hemoterapijskim protokolima ima racionalnu teorijsku osnovu, s obzirom na značaj ROS u patogenezi kardiotoksičnosti i manje značajnoj ulozi oksidativnog stresa u antitumorskoj aktivnosti doksorubicina. U skladu s tim, različite *in vitro* i *in vivo* animalne studije sa antioksidansima uključujući N-acetilcistein, vitamine A, C, E, glutation, polifenole, koenzim Q10, L-karnitin, karvedilol i druge antioksidanse su demonstrirale

kardioprotektivne efekte bez redukovanja antitumorske aktivnosti doksorubicina (241). Međutim, mogućnost izvesnog stepena impliciranosti ROS u antitumorskoj aktivnosti doksorubicina otvorila je debatu o korisnosti kliničke primene antioksidanasa u toku hemoterapije. Selektivna kardioprotektivna svojstva antioksidanasa bez uticaja na antitumorske efekte doksorubicina su zasnovana na nekoliko postulata: doprinos ROS antitumorskoj aktivnosti leka se postiže samo pri suprakliničkim koncentracijama leka; doksorubicin proizvodi manje količine ROS u malignim ćelijama u odnosu na normalne usled manje količine mitohondrija kao sistema za proizvodnju ROS i povećane aktivnosti antioksidativnih mehanizama; oko 99,7% doksorubicina stupa u interakciju sa DNA malignih ćelija bez mogućnosti redukcije u semihinonski radikal. Međutim klinička korisnost primene antioksidanasa kao potencijalnih kardioprotektora je složena i zahteva pažljivu evaluaciju. Nekoliko kliničkih studija je pokazalo da primena antioksidanasa ne obezbeđuje kardioprotektivni efekt niti odlaže oštećenje srčane funkcije (242-246). Međutim, studije sa karvedilolom su pokazale značajan kardioprotektivni potencijal koji se zasniva na antioksidativnim efektima (247, 248). Studije sa kardioprotektivnim potencijalom dijetarnih ili farmakoloških antioksidanasa su još uvek ograničene malim brojem pacijenata, sa malom statističkom snagom i neophodan je oprez pri tumačenju rezultata.

Deksrazoksan je jedini klinički dostupan, registrovani kardioprotektant. Deksrakozan je prolek koji intracelularno podleže hidrolizi pri čemu nastaje aktivna helirajuća, metal-vezujuća forma, ADR-925. Deksrakozan dokazano vrši protekciju kardiomiocitnih mitohondrija od genetskih i funkcionalnih lezija uklanjajući gvožđe iz kompleksa sa doksorubicinom i redukujući formiranje superoksidnih i hidroksilnih radikala bez kompromitovanja onkološke efikasnosti (249). Deksrakozan takođe selektivno inhibira doksorubicinom-indukovane DNA lezije posredovane TOP-II β , enzimom koji je eksprimiran u diferentovanim ćelijama uključujući kardiomiocite (250). Preskripcija dekrazoksana u kombinaciji sa doksorubicinom je trenutno ograničena na pacijente koji su primili minimalnu kumulativnu dozu od 300 mg/m² doksorubicina. Kliničke smernice predlažu upotrebu odnosa dekrazoksan-antraciklin 10:1 ili 20:1, 15-30 minuta pre primene hemoterapijskog protokola (251). Na ovaj način se omogućava primena viših kumulativnih doza doksorubicina. Međutim, opisana mogućnost potenciranja mijelosupresivnih efekata doksorubicina kao i rizik od pojave sekundarnih maligniteta su faktori koji još uvek utiču na ambivalentnost kliničkih onkologa i hematologa za preskripciju ovog kardioprotektivnog agensa (252).

Pretpostavlja se da je kardiotoksičnost doksorubicina rezultat lokalizovanog oksidativnog stresa koji narušava redoks ekvilibrijum u različitim ćelijskim kompartmanima sa uticajem na redoks homeostazu i prenos signala između celularnih kompartmana. Razlike u efikasnosti helatora gvožđa i antioksidanasa mogu biti objašnjene razlikama u njihovoj intracelularnoj lokalizaciji ili/i kumulaciji, ili činjenicom da antioksidansi mogu naruše redoks homeostazu u specifičnim subcelularnim kompartmanima dovodeći do pojave antioksidativnog stresa (253). S obzirom na ulogu mitohondrija u amplifikaciji doksorubicinom-indukovanog oksidativnog stresa, derivati antioksidanasa vitamina E i koenzima Q kuplovanih sa trifenilfosfonijum katjonom, Mito-E i Mito-Q, se ciljano preuzimaju od strane mitohondrija u kojima ispoljavaju antioksidativno dejstvo su pokazali pozitivne efekte u prekliničkim studijama (254, 255). Dalji razvoj novih sintetskih i semisintetskih ksenobiotika sa antioksidantnim svojstvima, sa ciljanom kumulacijom i dejstvom u mitohondrijama kao subcelularnim kompartmanima odgovornim za molekularne mehanizme neželjenih efekata na nivou kardiomiocita, može predstavljati novi korak u budućim kardioprotektivnim strategija.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Prvi cilj ovog istraživanja predstavlja komparativno ispitivanje uticaja žučnih kiselina - dva prirodna epimera, ursodeoksiholne i henodeoksiholne kiseline i semisintetskog derivata, 12-monoketoholne kiseline (12-okso-henodeoksiholna kiselina, 3 α ,7 α -dihidroksi-12-okso-5 β -holan-24-oična kiselina) na antitumorsku tj. citotoksičnu aktivnost doksorubicina na *in vitro* ćelijskom modelu - MCF-7 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke, kao i ispitivanje molekularnih mehanizama uključenih u potencijalne farmakodinamske interakcije.

Drugi cilj ovog rada predstavlja ispitivanje uticaja tretmana navedenim žučnim kiselinama, primenjenih u ekvimolarnim koncentracijama, na odložene toksodinamske efekte doksorubicina (hepato- i kardiotoksičnost) u *in vivo* sistemu.

Treći cilj ovog istraživanja je komparativno ispitivanje uticaja pretretmana ursodeoksiholnom, henodeoksiholnom odn. 12-monoketoholnom kiselinom na farmakokinetički profil doksorubicina u serumu, bilijarnu ekskreciju i kumulaciju leka u miokardu i jetri *in vivo* nakon bolus intravenske administracije doksorubicina. Takođe cilj rada predstavlja i ispitivanja uticaja žučnih kiselina na intracelularnu kumulaciju doksorubicina *in vitro* u MCF-7 ćelijama humanog adenokarcinoma dojke.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Žučne kiseline, ursodeoksiholna i henodeoksiholna i 12-monoketoholna kiselina značajno povećavaju antitumorsku aktivnost doksorubicina *in vitro* u MCF-7 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke.

2. Žučne kiseline značajno smanjuju hepatotoksične i kardiotoksične efekte doksorubicina *in vivo*.

3. Žučne kiseline značajno smanjuju kumulaciju doksorubicina u tkivu jetre i u miokardu i povećavaju bilijarnu ekskreciju doksorubicina *in vivo*, istovremeno povećavajući prodor i kumulaciju doksorubicina *in vitro* u MCF-7 ćelijama humanog adenokarcinoma dojke.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Doksorubicin hidrohlorid je korišćen u vidu komercijalno dostupnog preparata *Adriablastina*[®] *RD* (*Actavis Italy SPA*). Pre primene, doksorubicin je rastvoren u fiziološkom rastvoru, a dobijeni rastvor je stabilan tokom 48 h na +4 °C. Žučne kiseline: henodeoksiholna (čistoće ≥ 97%) i ursodeoksiholna (čistoće ≥ 98%) su nabavljene od proizvođača *Sigma-Aldrich* dok je 12-monoketoholna kiselina (čistoće 96,5% sa 3,1% holata kao glavnom nečistoćom) sintetisana na Zavodu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Tokom *in vivo* ispitivanja, svakodnevno su pravljene sveži rastvori žučnih kiselina u propilen glikolu (*Sigma-Aldrich*), dok su tokom *in vitro* ispitivanja žučne kiseline rastvarane u dimetil-sulfoksidu (*Sigma-Aldrich*).

3.2. Čelijska kultura i *in vitro* eksperimentalni model

U *in vitro* delu ispitivanja sprovedenom u Institutu za onkologiju Vojvodine (odobrenje Stručnog saveta Instituta za onkologiju Vojvodine br 975/p) korišćene su ćelije humanog adenokarcinoma dojke MCF-7 (ATCC[®] HTB-22TM). MCF-7 ćelijska linija je kontinuirana ćelijska linija izolovana 1970. godine iz pleuralnog efuzata 69. godišnje pacijentkinje sa invazivnim duktalnim karcinomom dojke. Ove ćelije su zadržale nekoliko karakteristika diferentovanih epitelnih ćelija kao što je pozitivnost na estrogenski i progesteronski receptor (ER+ i PR+). Čelije su gajene u specijalno formulisanom medijumu – *Dubelcco's Modified Eagles Medium* (DMEM) (*Sigma-Aldrich*), sa natrijum piruvatom i L-glutaminom (*Sigma-Aldrich*), sa dodatkom 10% fetalnog bovinog seruma (FBS) (*PAA Lab GmbH Pasching*), u prisustvu penicilina (100 IJ/mL) i streptomicina (100 µg/mL) (*ICN Galenika, Srbija*). Čelijska linija je održavana u flaskonima od 25 cm² (*Grainer Bio-One*) u inkubatoru na 37 °C u atmosferi sa 100% vlage i 5% CO₂. MCF-7 ćelije rastu u vidu jednog sloja i pri postizanju konfluentnosti od 80-90% se presađuju. U eksperimentima su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta, između trećeg i desetog dana nakon presađivanja.

Ćelijska suspenzija je dobijana dodavanjem 0,5% rastvora tripsina nakon čega se ćelije inkubiraju na 37 °C tokom 5 min. Dodavanjem DMEM-a sa 10% FBS-a, se zaustavlja enzimski reakcija pri čemu komponente FBS-a dovode do inaktivacije tripsina. Dobijena ćelijska

suspenzija je centrifugirana 10 min na 1500 rpm, a ćelijski pelet resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj i vijabilnost ćelija.

3.2.1 Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

Vijabilnost ćelija je ispitana testom ekskluzije boje Tripan plavo (256). Ova metoda se zasniva na aktivnom efluksu boje iz vijabilnih ćelija dok se nevijabilne ćelije kao i ćelije sa narušenim integritetom ćelijske membrane boje plavo. U 50 μL ćelijske suspenzije je pipetirano 200 μL 0,1% rastvora Tripan plavog (*Sigma-Aldrich*) u 0,9% NaCl. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi tokom 2 min broj vijabilnih i nevijabilnih ćelija je određen pomoću Bürker-Türk-ovog hemocitometra na invertnom mikroskopu. Broj ćelija u 1 mL suspenzije izračunat je prema sledećoj formuli:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5$$

pri čemu je N ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije; N_0 broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra; 5 faktor razblaženja; 10^4 = korekcionni faktor (dubina komore i volumen izražen u mL).

Procenat vijabilnih ćelija se izračunava prema sledećoj formuli:

$$V(\%) = (N_0/N_0+M_0) \times 100$$

gde je M_0 = broj nevijabilnih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra.

U eksperimentima su korišćeni samo uzorci iz ćelijskih kultura čija je vijabilnost bila veća od 90%.

3.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti kolorimetrijskim MTT testom

Citotoksičnost ispitivanih supstanci i ćelijska proliferacija je indirektno merena prema metodi Mosmann-a putem određivanja sposobnosti ćelija da metabolički redukuju tetrazolijum boju (MTT) u plavo-crni produkt formazan (257). Tetrazolijum se se metaboliše u aktivnim mitohondrijama živih ćelija dejstvom enzima dehidrogenaze.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem tokom 10 min na 200 x g i određena im je vijabilnost pomoću 0,1% tripan plavog. Vijabilne ćelije su posejane u oktuplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora (*BD Biosciences*), tako da je u 90 µL medijuma bilo 5×10^3 MCF-7 ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama su inkubirane narednih 24 h na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO₂. Po isteku inkubacije, tj. stabilizacije, u sve otvore osim kontrolnih je dodato po 10 µL rastvora ispitivane supstance (DOX, CDCA, UDCA ili 12-MKC) u rastućim koncentracijama i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku narednih 48 h. Tokom pilot eksperimenata eksperimentalne grupe su tretirane rastućim koncentracijama ispitivanih supstanci: doksorubicin u opsegu 0,05-5 µM, UDCA u opsegu 50-500 µM, CDCA u opsegu 10-200 µM i 12-MKC u opsegu 25-500 µM, kako bi se odabrale koncentracije za dalji, kombinovani tretman ćelija. Žučne kiseline su prethodno rastvorene u DMSO (0,5% v/v), a DOX je rastvoren u 0,9% NaCl.

Nakon 48 h u svaki otvor mikrotitarske ploče je dodato 10 µL sveže pripremljenog MTT rastvora (*Sigma-Aldrich*) i inkubacija je nastavljena tokom naredna 3 h (u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂). Po isteku 3 h u svaki otvor je dodato po 100 µL izopropanola acidifikovanog sa 100 µL 0,04 M HCl. Apsorbanca je očitana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (*Multiskan MCC/340, Thermo-Scientific*) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba.

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$$CI = (1 - A_s / A_k) \times 100$$

pri čemu je A_k apsorbanca kontrolnih uzoraka, a A_s apsorbanca uzoraka sa ispitivanom supstancom.

Nakon ispitivanja citotoksične aktivnosti pojedinačnih supstanci ispitana je citotoksičnost prilikom kombinovane primene odabrane koncentracije doksorubicina i žučne kiseline. Trideset minuta pre tretmana ćelija doksorubicinom u koncentraciji 0,25 µM, koja odgovara vrednosti IC₃₅, ćelije su pre-tretirane žučnim kiselinama u koncentracijama koje odgovaraju vrednostima IC₂₀ za svaku pojedinačnu žučnu kiselinu. Nakon 48 h ispitana je antiproliferativna aktivnost u skladu sa prethodno opisanom procedurom, pri čemu su ćelije zasejane u oktuplikatu, a sama

procedura je ponovljena u vidu dva nezavisna eksperimenta. Na osnovu rezultata ispitivanja citotoksičnosti dobijenih kombinacijama fiksnih koncentracija doksorubicina sa fiksnim koncentracijama izabranih žučnih kiselina dobijenih iz dva nezavisna eksperimenta, kvantitativnom analizom odnosa doza-efekat primenom *CompuSyn* softvera (*BIOSOFT*) utvrđena je vrsta interakcije (sinergizma, antagonizma ili aditivnog efekta) između doksorubicina i žučnih kiselina primenjenih u izabranim dozama na osnovu CI (*Combination Index*) kvantitativnog deskriptora koji su opisali Chou i Talalay (258).

3.2.3. Tretman i priprema MCF-7 ćelija za ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

U flaskone od 25 cm² je zasejano 1x10⁶ MCF-7 ćelija i kultivisano u skladu sa prethodno opisanim uslovima. Nakon postizanja konfluentnosti (5x10⁶ ćelija), eksperimentalne grupe ćelija su pre-tretirane dodavanjem IC₂₀ koncentracije žučnih kiselina (50 µM UDCA, 6 µM CDCA ili 25 µM 12-MKC) rastvorenih u DMSO (0,5% v/v), 30 min pre dodavanja 0,25 µM doksorubicina (IC₃₅). Negativnoj kontrolnoj grupi je dodat samo DMSO (0,5% v/v), a pozitivnoj DMSO 30 min pre dodavanja 250 µM doksorubicina. Medijum je dekantovan 24 časa nakon dodavanja doksorubicina i ćelije su isprane pomoću Dubelkovog fosfatnog pufera (*Dubelcco's Phosphate Buffer Saline, PBS, Life technologies*). Dodatkom 500 µL 0,5% rastvora tripsina i inkubacijom na 37 °C tokom 5 min je dobijena ćelijska suspenzija koja je zatim resuspendovana u DMEM-u sa 10% FBS-a i centrifugirana 10 min na 1500 rpm. Ćelijski pelet je resuspendovan u 5 mL PBS pufera (u proseku 1x10⁶ ćelija/mL).

Ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima je izvršeno u uzorcima citosolne frakcije ćelija, koja se dobija dodatkom 2,5 µg digitonina (*Sigma-Aldrich*) na 1x10⁶ ćelija, upotrebom 1% w/v rastvora digitonina u DMSO (10 mg/1 mL), i centrifugiranjem 10 minuta na 4000 rpm. Dobijeni supernatant je čuvan na -20 °C, do analize enzimske aktivnosti.

3.2.4. Tretman i priprema MCF-7 ćelija za kvantifikaciju genske ekspresije

U flaskone od 25 cm² je zasejano 1,25x10⁶ MCF-7 ćelija i kultivisano u skladu sa prethodno opisanim uslovima. Eksperimentalne grupe ćelija su pre-tretirane 24 h nakon zasejavanja dodavanjem IC₂₀ koncentracije žučnih kiselina (50 µM UDCA, 6 µM CDCA ili 25 µM 12-MKC) rastvorenih u DMSO, 30 min pre dodavanja 0,25 µM doksorubicina (IC₃₅).

Negativnoj kontrolnoj grupi je dodat samo DMSO, a pozitivnoj DMSO 30 min pre dodavanja 0,25 μ M doksorubicina. 24 h nakon dodavanja doksorubicina medijum je dekantovan, a ćelije su isprane pomoću PBS pufera. Dodatkom 500 μ L 0,5% rastvora tripsina i inkubacijom na 37 °C tokom 5 min je dobijena ćelijska suspenzija koja je zatim resuspendovana u DMEM-u sa 10% FBS-a i centrifugirana na 1500 rpm tokom 10 min. Ćelijski sediment je resuspendovan u 3 mL *RNAlater*®-a (*Sigma-Aldrich*). Dobijena ćelijska suspenzija je čuvana na -20 °C do izolacije RNA i reverzne transkripcije.

3.2.5. Tretman i priprema MCF-7 ćelija za određivanje intracelularne kumulacije doksorubicina

U T25 flaskone je zasejano $1,25 \times 10^6$ MCF-7 ćelija i kultivisano u skladu sa prethodno opisanim uslovima. Eksperimentalne grupe ćelija su pre-tretirane 24 h nakon zasejavanja dodavanjem IC₂₀ koncentracije žučnih kiselina (50 μ M UDCA, 6 μ M CDCA ili 25 μ M 12-MKC) rastvorenih u DMSO, 30 min pre dodavanja 0,25 μ M doksorubicina. Inkubacija ćelija je trajala 3 h nakon dodavanja doksorubicina nakon čega je medijum dekantovan, a ćelije dva puta isprane u ledenom PBS puferu. Ćelije su tehnikom grebanja odvojene od unutrašnje površine flaskona i resuspendovane u 1 mL PBS pufera. Ćelijska suspenzija je čuvana na -20 °C do pripreme ćelija za HPLC analizu.

3.3. Eksperimentalne životinje

Istraživanje je sprovedeno na polno zrelih, zdravih, muškim jedinkama albino laboratorijskih pacova soja *Wistar*, telesne mase 190-250 g, odgajanih na farmi za eksperimentalne životinje Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su tokom nedelju dana aklimatizovane u vivarijumu za laboratorijske životinje Zavoda za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Do momenta istraživanja i u toku eksperimenta životinje su boravile u *Uni-Protect* sistemu za čuvanje laboratorijskih životinja (*Ehret, Emendingen*) sa filterskim sistemom za protok vazduha u plastičnim kavezima (šest životinja po kavezu) sa standardnim uslovima: kontrolisanim temperaturom (22 ± 1 °C) i vlažnošću vazduha 55%, cirkardijalnim ritmom (smenjivanje svetlosti i mraka u trajanju od 12 časova) uz pristup standardnoj briketiranoj hrani za sitne životinje (Veterinarski institut Zemun) i vodi *ad libitum*. Svi postupci sa životinjama su vršeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti oglednih

životinja, direktivom Evropske Unije (2010/63/EU) i *ARRIVE* smernicama. Izvođenje oglada je odobreno od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu (broj odobrenja 01-160/4).

3.4. *In vivo* eksperimentalni modeli

In vivo ogledi su obuhvatili dva različita eksperimentalna modela. U prvom eksperimentalnom modelu su analizirani odloženi efekti administracije doksorubicina sa ili bez naizmenične administracije žučnih kiselina na biohemijske markere oštećenja hepatocita i kardiomiocita, parametre antioksidativne zaštite u tkivu jetre i srca i promene genske ekspresije u ovim tkivima. U drugom *in vivo* modelu su analizirani efekti akutne primene žučnih kiselina i doksorubicina na vrednosti koncentracija doksorubicina u krvi i žuči, kao i uticaj žučnih kiselina na kumulaciju doksorubicina u jetri i srcu.

3.4.1. Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na biohemijske i molekularno-biološke efekte administracije doksorubicina

U prvom *in vivo* eksperimentalnom modelu praćen je uticaj administracije ekvimolarnih koncentracija tri žučne kiseline (CDCA, UDCA i 12-MKC) na odložene biohemijske efekte i molekularno-biološke efekte administracije doksorubicina praćenjem biohemijskih markera oštećenja hepatocita i kardiomiocita, parametre antioksidativne zaštite u tkivu jetre i srca i analizom promene genske ekspresije. Ukupno 36 laboratorijskih životinja je podeljeno u 6 grupa koje su bile tretirane na sledeći način (**slika 3.4.1.**):

- ❖ Grupa 1 - K1 (n=6): fiziološki rastvor (vehikulum za doksorubicin) 1mL/kg intraperitonealno (i.p) svakog drugog dana, ukupno 3 doze;
- ❖ Grupa 2 - K2 (n=6): fiziološki rastvor 1mL/kg intraperitonealno (i.p) svakog drugog dana, ukupno 3 doze + propilen glikol (P.G.,vehikulum za žučne kiseline) 1 mL/kg *per os* (p.o.) pomoću gastrične sonde svakog drugog dana, ukupno 3 doze počevši 1 dan nakon primene fiziološkog rastvora;
- ❖ Grupa 3 - D (n=6): doksorubicin 3 mg i.p. svakog drugog dana, ukupno 3 doze (kumulativna doza 9 mg/kg);

- ❖ Grupa 4 - DU (n=6): doksorubicin 3 mg i.p. svakog drugog dana, ukupno 3 doze + UDCA 25 mg/kg p.o. svakog drugog dana, ukupno 3 doze, počevši jedan dan pre primene doksorubicina;
- ❖ Grupa 5 - DC (n=6): doksorubicin 3 mg i.p. svakog drugog dana, ukupno 3 doze + CDCA 25 mg/kg p.o. svakog drugog dana, ukupno 3 doze, počevši jedan dan pre primene doksorubicina;
- ❖ Grupa 6 - DM (n=6): doksorubicin 3 mg i.p. svakog drugog dana, ukupno 3 doze + 12-MKC 26 mg/kg p.o. svakog drugog dana, ukupno 3 doze, počevši jedan dan pre primene doksorubicina.

Grupa	Dan	1	2	3	4	5	6	7-27	28
K1	Tretman	-	0,9% NaCl	-	0,9% NaCl	-	0,9% NaCl	Pauza	Eutanazija
	Dan	1	2	3	4	5	6	7-27	28
K2	Tretman	P.G.	0,9% NaCl	P.G.	0,9% NaCl	P.G.	0,9% NaCl	Pauza	Eutanazija
	Dan	1	2	3	4	5	6	7-27	28
D	Tretman	-	DOX	-	DOX	-	DOX	Pauza	Eutanazija
	Dan	1	2	3	4	5	6	7-27	28
DU	Tretman	UDCA	DOX	UDCA	DOX	UDCA	DOX	Pauza	Eutanazija
	Dan	1	2	3	4	5	6	7-27	28
DC	Tretman	CDCA	DOX	CDCA	DOX	CDCA	DOX	Pauza	Eutanazija
	Dan	1	2	3	4	5	6	7-27	28
DM	Tretman	12-MKC	DOX	12-MKC	DOX	12-MKC	DOX	Pauza	Eutanazija
	Dan	1	2	3	4	5	6	7-27	28

Slika 3.4.1. Shema tretmana životinja.

Dvadeset osmog dana nakon početka tretmana, odnosno tri sedmice nakon završetka tretmana, životinje su uvedene u anesteziju pomoću uretana (25% w/v, 5 mL/kg, i.p.) (*Sigma-Aldrich*) i izvedena je eutanazija kardiopunkcijom.

Neposredno nakon eutanazije iz uzetih uzoraka krvi centrifugiranjem na 6000 rpm tokom 10 min na + 4 °C u centrifugi sa hlađenjem *Mikro 22R (Hettich)* je izdvojen serum dok su uzorci tkiva jetre (periferno od hilusa) i miokarda odmah isprani ledenim fiziološkim rastvorom i čuvani na temperaturi od -20 °C radi daljih biohemijskih analiza. U cilju kvantifikacije genske ekspresije uzorci tkiva jetre i miokarda su odmah stavljeni u *in situ* RNA-stabilizacioni reagens *RNAlater® (Sigma-Aldrich)* i do izolacije RNA čuvani na temperaturi od -20 °C u skladu sa preporukama proizvođača.

3.4.2. Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na vrednosti koncentracije doksorubicina u krvi i žuči i kumulaciju doksorubicina u srcu i jetri

U drugom eksperimentalnom *in vivo* modelu je komparativno ispitan uticaj trodnevnog p.o. tretmana žučnim kiselinama (CDCA, UDCA i 12-MKC) u ekvimolarnim koncentracijama na koncentracije doksorubicina (primenjenog u unidozi) u krvi i žuči kao i na kumulaciju doksorubicina u jetri i miokardu. Ukupno 24 laboratorijska pacova soja *Wistar* su podeljeni u 4 grupe:

- ❖ Grupa 1 (n=6): propilen glikol (vehikulum za žučne kiseline) 1 mL/kg p.o. gastričnom sondom tokom uzastopna 3 dana + doksorubicin 10 mg/kg i.v. 24 h nakon poslednje doze žučne kiseline;
- ❖ Grupa 2 (n=6): UDCA 25 mg/kg tokom uzastopna 3 dana + doksorubicin 10 mg/kg i.v. 24 h nakon poslednje doze žučne kiseline;
- ❖ Grupa 3 (n=6): CDCA 25 mg/kg tokom uzastopna 3 dana + doksorubicin 10 mg/kg i.v. 24 h nakon poslednje doze žučne kiseline;
- ❖ Grupa 4 (n=6): 12-MKC 26 mg/kg tokom uzastopna 3 dana + doksorubicin 10 mg/kg i.v. 24 h nakon poslednje doze žučne kiseline.

Rastvori žučnih kiselina su svakodnevno pripremani u propilen glikolu i primenjeni p.o. pomoću gastrične sonde jedan put dnevno u toku tri uzastopna dana. 24 h nakon primene poslednje doze žučne kiseline životinje su uvedene u anesteziju primenom uretana (25% w/v, 5 mL/kg i.p.). Nakon uvođenja životinje u anesteziju je preparisana leva *v. femoralis* i *ductus choledochus* u koje je uvedena kanila. Doksorubicin je primenjen u vidu bolus i.v. injekcije (10 mg/kg u 0,9% NaCl) preko *v. femoralis*. Uzorkovanje krvi i žuči je vršeno tokom dva časa od

momenta administracije doksorubicina. Uzorci krvi (200 μ L) su prikupljeni iz repne vene u osam vremenskih tačaka i to nakon: 3 min, 6 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min i 120 min, dok su uzorci žuči prikupljeni u prethodno izmerene polipropilenske tube od 1.5 mL (*Eppendorf*) u intervalima od 20 min (0-19 min, 20-39 min, 40-59 min, 60-79 min i 80-99 min, 100-120 min) od momenta primene doksorubicina. Dobijeni uzorci krvi su centrifugirani 10 min na 6000 rpm (*Hettich*) nakon čega je izdvojen supernatant (serum). Dva časa nakon primene doksorubicina izvršena je eutanazija životinja kardiopunkcijom i uzeti su uzorci tkiva jetre (1g) i miokard, isprani fiziološkim rastvorom i zamrznuti na temperaturi od -20 °C do dalje pripreme za analitičku obradu.

3.4.3. Homogenizacija organa

Nakon odmrzavanja, uzorci tkiva jetre i miokarda životinja iz prvog eksperimentalnog modela su homogenizovani na ledu pomoću *Potter-Elvehjem* homogenizatora (*Braun*), tri puta po deset sekundi, uz prethodno usitnjavanje tkiva hirurškim makazama u cilju olakšane homogenizacije. Homogenat jetre je pripreman u TRIS-KCL puferu, pH=7,4 (0,05 M TRIS : 1,15 M KCL = 1:1) u odnosu 1:3 (jedan deo jetre : tri dela pufera), dok je homogenat srca pripremljen u istom puferu u odnosu 1:5. Dobijeni homogenat je podeljen u dva dela:

1. Grubi homogenat za određivanje koncentracije TBARS i proteina,
2. Centrifugiranjem frakcije grubog homogenata tokom 20 min na 3600 rpm na 4 °C je izdvojena citosolna frakcija za određivanje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima.

Do momenta biohemijskih ispitivanja grubog homogenata i citosolne frakcije ćelija, homogenati su čuvani na temperaturi od -20 °C. Uzorci tkiva jetre i miokarda iz drugog *in vivo* eksperimentalnog modela homogenizovani su na isti način, u destilovanoj vodi u odnosu 1:3. Dobijeni homogenati su čuvani na -20 °C do analitičke obrade.

3.5. Biohemijska ispitivanja

3.5.1. Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na vrednosti serumskih biohemijskih parametara (ALT, AST, CK-MB) kod životinja tretiranih doksorubicinom

Vrednosti serumskih biohemijskih parametara oštećenja hepatocita i kardiomiocita: alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotranferaze (AST), kardiospecifičnog izoenzima

kreatin kinaze (CK-MB) i N-acetil cisteinom reaktivisane CK-MB (CK-NAC) određeni su standardnim spektrofotometrijskim metodama pomoću komercijalnih setova na automatskom sistemu za biohemijske analize *Beckman Coulter AU480* u skladu sa uputstvima proizvođača. Kvantitativno određivanje ALT je zasnovano na principu reakcije u kojoj se vrši transaminacija između L-alanina i alfa-ketoglutarata u prisustvu ALT pri čemu nastaju L-glutamat i piruvat. Piruvat se u drugoj reakciji, u prisustvu NADH, redukuje pod dejstvom enzima laktat dehidrogenaze u laktat pri čemu se prati pad apsorbance u vremenu na 340 nm koji je proporcionalan oksidaciji NADH u NAD (259). Princip određivanja AST je zasnovan prenosu amino grupa između L-aspartata i i alfa-ketoglutarata pri čemu nastaju L-glutamat i oksaloacetat. Nastali oksaloacetat u drugoj reakciji se redukuje u malat u prisustvu malat dehidrogenaze i koenzima NADH. Pad apsorbance na 340 nm je proporcionalan aktivnosti AST u uzorku (260). Aktivnost (CK-MB) je određena pomoću metode u kojoj ovaj enzim reverzibilno katališe transfer fosfatne grupe sa kreatin fosfata na adenzin difosfat (ADP) pri čemu nastaju kreatin i adenzin trifosfat (ATP). Nastali ATP vrši fosforilaciju glukoze pomoću enzima heksokinaze, a nastali produkt glukoza-6-fosfat se oksidiše u 6-fosfoglukonat pod dejstvom enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze uz simultanu redukciju koenzima NADP u NADPH. Porast apsorbance na 340 nm je direktno proporcionalna aktivnosti CK u uzorku (261). Pre reakcije se u uzorak dodaje reagens koji sadrži antitelo koje vezuje i inaktivniše subjedinicu M (te u potpunosti inaktivira izoenzim MM) dok subjedinica B u uzorku ostaje slobodna i aktivna prema supstratu (sa ili bez prethodne aktivacije pomoću N-acetil cisteina, NAC).

3.5.2. Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina u grubom homogenatu i citosolnim frakcijama jetre i srca i MCF-7 ćelijskoj liniji vršeno je biuretskom metodom koja se zasniva na reakciji peptidne veze sa jonima bakra u alkalnoj sredini, pri čemu se stvara ljubičasto obojeni kompleks. Intenzitet nastalog obojenog kompleksa je direktno proporcionalan koncentraciji proteina, a apsorbance je očitana na 540 nm. Određivanje koncentracije proteina je izvedeno pomoću komercijalnog seta proizvođača *Sentinel Diagnostic*, prema uputstvima proizvođača.

Izvođenje analize: u 1 mL reagensu (6 mmol CuSO₄, 6 mmol KJ, 0,75 mmol NaOH, pH ≥ 10) dodato je 0,01 mL uzorka. U slepu probu je dodato 0.01 mL destilovane vode, a u standard

ista zapremina standardnog rastvora (6 g/dL). Reakciona smeša se dobro pomeša i nakon 15 min se mere apsorbance standarda (AS) i uzorka (AU), normalizovane u odnosu na slepu probu.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Koncentracija proteina} = (\text{AS/AU}) \times \text{koncentracija standardnog rastvora}$$

3.5.3. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Princip: Metoda se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malondialdehidom (MDA) koji nastaje tokom peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u sastavu bioloških membrana, pod dejstvom ROS. MDA je pokazatelj lipidne peroksidacije te se koristi u evaluaciji oksidativnog stresa. U uslovima visoke temperature i u kiseloj sredini MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat crvene boje koji ima maksimum apsorpcije monohromatske svetlosti na talasnoj dužini od 535 nm (262).

Izvođenje analize: 300 μL uzorka grubog homogenata jetre odn. 250 μL grubog homogenata srca je dodato u 1 mL smeše TBA (0,375% w/v) i trihlorsirćetne kiseline (TCA) (15% w/v) u 0,25 M HCl, izmeša na vorteksu i zagrevano na vodenom kupatilu 15 minuta na 90 °C. Nakon hlađenja na ledu 5 min, epruvete su centrifugirane na 10000 rpm u toku 10 minuta. Koncentracija MDA je određena iz supernatanta spektrofotometrijski na 535 nm uz TCA-TBA-HCl reagens sa destilovanom vodom kao slepom probom.

Izračunavanje rezultata:

$$C_{\text{MDA}} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 10}{1,56 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

Pri čemu je:

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL], V_{uz} - zapremina uzorka [mL], C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]. Molarni apsorpcioni koeficijent za konjugat MDA-TBA iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Koncentracija MDA je izražena u nmol/mg proteina.

3.5.4. Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Princip: U reakciji ksantina sa ksantin oksidazom stvara se superoksid anjon radikal, koji redukuje oksidovani citohrom c. Brzina redukcije se prati spektrofotometrijski na 550 nm. SOD, katališući reakciju dismutacije superoksid anjon radikala smanjuje brzinu redukcije citohroma c. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD. Aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije citohroma c za 50% (pri promeni apsorbance od 0,025/min) je definisana kao jedinica aktivnosti ovog enzima (263).

Izvođenje analize: Za izvođenje analize pripremljeni su rastvor I (50 µL 100 mmol EDTA, 50 µL 30 mmol NaN₃, 500 µL 5mM ksantina, 200 µL 5 mmol citohroma C, dopunjeno do 50 mL 0,1 M fosfatnim puferom pH=7,8) i rastvor II (400 µL 1 mmol EDTA, 3595 µL 0,1 M fosfatni pufer pH=7,8, 20 µL ksantin oksidaze (50U/ 2mL). U spektrofotometrijsku kivetu je pipetirano 650 µL rastvora I, 200 µL uzorka (suspenzije ćelija) i 50 µL rastvora II. Dodatkom rastvora II počela je reakcija, a apsorbance se pratila tokom 3 min na talasnoj dužini 550 nm.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{specifična aktivnost SOD} = \frac{\Delta A_{sp} \times 50 \times 1000}{\Delta A_{uz} \times 100 \times C_{pr}}$$

pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL].

Specifična aktivnost CAT je izražena u jedinicama aktivnosti enzima na mg proteina u uzorku.

3.5.5. Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT)

Princip: Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik peroksida u prisustvu katalaze na 240 nm (264).

Izvođenje analize: U 0,05 M fosfatni pufer (pH=7,0) je pipetiran 30 % H₂O₂ tako da apsorbance slepe probe na 240 nm bude 0,525-0,550. U 1,5 mL podešenog rastvora H₂O₂ u fosfatnom puferu je dodato 10 µL uzorka nakon čega odmah započinje reakcija. Pad apsorbance na 240 nm je praćen tokom tri minuta na temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{specifična aktivnost CAT} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 1000}{43,6 \times V_{uz} \times C_{pr}}$$

pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL], V_{uz} - zapremina uzorka [mL], C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL].

Specifična aktivnost CAT je izražena u jedinicama aktivnosti enzima na mg proteina u uzorku.

3.5.6. Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Princip: Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovane forme glutationa (GSSG) u redukovanu formu (GSH) (265).

Izvođenje analize: U kvarcnu spektrofotometrijsku kivetu pipetirano je 0.2 mL fosfatnog pufera (0,5 M, pH=7,4), 0,3 mL GSSG (2 mM), 0,3 mL uzorka i vode do 1 mL. Reakcija je počela dodavanjem 0,03 mL NADPH (0,1 mM). Promena apsorbance na 340 nm je praćena tokom 3 minuta na optimalnoj temperaturi reakcije (37 °C).

Izračunavanje rezultata:

$$\text{specifična aktivnost GR} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 1000}{6,22 \times V_{uz} \times C_{pr}}$$

pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL], V_{uz} - zapremina uzorka [mL], C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]. Molarni apsorpcioni koeficijent za NADP na 340 nm iznosi $6,22 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Specifična jedinica aktivnosti je definisana kao broj nmol NADPH oksidovanih u minuti po mg proteina.

3.5.7. Određivanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)

Princip: GST katalizuje konjugaciju 1-hloro-2,4-dinitro benzena (CDNB) sa tiol- grupom glutationa. Nastali konjugat CDNB-S-glutation ima maksimum apsorpcije na 340 nm. Merenjem promene apsorpcije na toj talasnoj dužini određuje se aktivnost enzima (266).

Izvođenje analize: U kvarcnu spektrofotometrijsku kivetu pipetirano je 200 μL fosfatnog pufera (0,5 M, pH=6,5), 20 μL CDNB (25 mM u 95% etanolu) i 680 μL destilovane vode. Nakon inkubacije na 37 °C u trajanju od 10 min u smešu je pipetirano 50 μL redukovanog glutationa (20 mM) i 50 μL uzorka homogenata tkiva odn. ćelija, a u slepu probu 50 μL destilovane vode. Promena apsorbanca na 340 nm je praćena tokom 3 min.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{specifična aktivnost GST} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 1000}{9,6 \times V_{uz} \times C_{pr}}$$

pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbanca uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbanca slepe probe, V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL], V_{uz} - zapremina uzorka [mL], C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]. Molarni apsorpcioni koeficijent za konjugat CDNB-glutation iznosi $9,6 \text{ Lmmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Specifična aktivnost GST je izražena kao br nmol GSH/min/mg proteina.

3.5.8. Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Princip: Glutation peroksidaza (GPx) katalizuje redukciju organskog peroksida uz nastajanje oksidovanog glutationa, GSSG. GSSG se ponovo redukuje do GSH pomoću NADPH (kao donora redukcionih ekvivalenata), a reakciju katalizuje enzim glutation reduktaza (GR). Aktivnost GSH-Px se prati spektrofotometrijski, indirektno, praćenjem pada apsorbanca na 340 nm koja potiče od NADPH (267).

Izvođenje analize: U kvarcnu spektrofotometrijsku kivetu je pipetirano: 0,5 mL destilovane vode, 0,1 mL rastvora redukovanog glutationa (1 mM), 0,2 mL rastvora NADPH (0,2 mM u 1% NaHCO_3), 0,033 mL NaN_3 (1 mM), 0,033 mL EDTA (1 mM), 0,1 mL fosfatnog pufera (0,5 M, pH=7,0), 0,033 mL t-butil hidroperoksida (0,03 M) i 50 μL uzorka. Smeša je

inkubirana tokom 10 min na 37 °C. Dodavanjem 1,7 µL GR (105 IU/mg proteina) je počela reakcija. Pad apsorbance na 340 nm je očitavan u toku 3 min. U slepu probu je umesto GR dodato 1,7 µL destilovane vode.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{spec aktivnost GPx} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{6,22 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL], V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL], V_{uz} - zapremina uzorka [mL]. Molarni apsorpcioni koeficijent za NADP na 340 nm iznosi $6,22 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Specifična aktivnost GPx je izražena kao broj nmol NADPH oksidovanih po minuti po mg proteina.

3.6. Izolacija, kvantifikacija i procena kvaliteta RNA

Izolacija RNA iz tkiva jetre i miokarda eksperimentalnih životinja kao i RNA iz MCF-7 ćelijske linije je izvršena pomoću komercijalnog kit-a *GenElute Mammalian total RNA mini prep kit* (Sigma-Aldrich) koji sadrži sve potrebne reagense i silikon-membranozne kolone za izolaciju ukupne RNA. Izolacija RNA je izvršena u skladu sa protokolima proizvođača pri čemu je za izolaciju RNA iz srca dodatno korišćen enzim proteinaza-K (*Sigma-Aldrich*) u cilju efikasnije disrupcije tkiva miokarda i povećanja prinosa RNA. Koncentracija RNA je određena spektrofotometrijski pomoću instrumenta *NanoDrop* (*BioSpec-Nano, Shimadzu Scientific Instruments*). Osim koncentracije RNA, pomoću *NanoDrop*-a je određena i čistoća izolovanih uzoraka RNA i to određivanjem odnosa apsorbanci na 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) i određivanjem odnosa apsorbanci na 260 i 230 nm (A_{260}/A_{230}). Vrednost A_{260}/A_{280} ukazuje na kontaminiranost dobijenih uzoraka proteinima dok vrednost odnosa A_{260}/A_{230} ukazuje na kontaminaciju uzoraka fenolom, tiocijanatima i drugim organskim molekulima korišćenim u proceduri izolacije. S obzirom na to da su se vrednosti A_{260}/A_{280} kretale u opsegu normalnih vrednosti (1.8-2.2) kao i A_{260}/A_{230} (2.0-2.2) izolovani uzorci RNA su se mogli smatrati čistim od kontaminanata.

Kvalitet odnosno integritet ekstrahovane RNA je utvrđen pomoću instrumenta *Bioanalyser 2100 (Agilent)* primenom *Agilent RNA 6000 Nano Kit-a (Agilent)* u skladu sa uputstvima proizvođača. *Bioanalyser 21000* kvantifikuje 28S i 18S ribozomalnu RNA (rRNA) pomoću kapilarne elektroforeze i primenom RIN (*RNA Integrity Number*) algoritma pomoću *Agilent 2100 Expert* softvera je utvrđen kvalitet dobijene RNA. RIN vrednosti se opisuju na skali od 1 (potpuno degradirana RNA) do 10 (potpuno intaktna RNA) pri čemu se RIN vrednosti ≥ 7 smatraju za prihvatljiv integritet RNA, adekvatan za dalje ispitivanje. RIN vrednosti ispitivanih uzoraka su se kretale u opsegu 7.4-8.9 za uzorke izolovanu RNA iz tkiva jetre, 6.9-7.8 za RNA iz miokarda i 10 za MCF-7 ćelije što ukazuje da su uzorci izolovane RNA minimalno degradirani i adekvatni za dalju reverznu transkripciju i amplifikaciju pomoću RT-qPCR metode.

3.7. Reverzna transkripcija

Izolovana RNA iz uzoraka tkiva, jetre i MCF-7 ćelijske linije je transkribovana u jednolančanu komplementarnu DNA (cDNA) pomoću komercijalnog kit-a *Enhanced Avian First Strand Synthesis Kit (Sigma-Aldrich)* u skladu sa preporukama proizvođača. Kao matrica za reverznu transkripciju upotrebljen je 1 μg RNA iz tkiva jetre i MCF-7 ćelija odnosno 0.5 μg RNA iz uzoraka miokarda (zbog niskih prinosa) čime je omogućena normalizacija tj. dalji rad sa jednakim koncentracijama RNA za različite uzorke iz jednog tkiva. Za proces reverzne transkripcije pomoću enzima reverzne transkriptaze korišćeni su deoksinukleotidi kao supstrati, a u svojstvu prajmera (engl. *primers*, tj. oligonukleotidni graničnici) korišćena je kombinacija jednakih količina oligo (dT)₂₃ i nasumičnih (*random*) nonamera, kako bi prinos cDNK odgovarao početnoj koncentraciji RNA. Reverzna transkripcija je izvedena na temperaturi od 50 °C pomoću reverzne transkriptaze uz dodatak inhibitora RNAze. Sintetisana cDNA je čuvana na temperaturi od -20 °C do izvođenja RT-qPCR analize.

3.8. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (*quantitative real-time polymerase chain reaction – qRT-PCR*)

Kvantifikacija genske ekspresije je izvršena pomoću qRT-PCR metode. Osnovni cilj kvantifikacije mRNA je poređenje ekspresije gena u različitim organima ili ćelijskim linijama, odnosno između eksperimentalnih grupa i netretirane kontrolne, grupe. Lančana reakcija polimeraze (PCR), kao nezaobilazni metod u biomedicinskim ispitivanjima, se zasniva na

umnožavanju sekvenci nukleinskih kiselina u tri koraka koji oponašaju *in vivo* replikaciju DNA: (1) denaturacija (razdvajanje lanaca DNA), (2) hibridizacija oligonukleotidnih graničnika-prajmera (*annealing*) za jednolančanu DNA matricu i (3) elongacija lanca tokom kojih DNA polimeraza kreira novosintetisani DNA lanac u regionu ograničenom oligonukleotidnim prajmerima.

qRT-PCR metod se zasniva na detekciji i kvantifikaciji intenziteta fluorescentnog signala koji se povećava proporcionalno kumulaciji PCR produkta sa svakim ciklusom amplifikacije. Ekspresija gena se određuje na osnovu broja ciklusa neophodnih za dobijanje traženog nivoa fluorescencije tzv. Ct (*Cycle Threshold*) vrednosti. S obzirom da je Ct proporcionalan logaritmu inicijalne količine ciljnog molekula u uzorku (mRNA za gen ili transkript od interesa), relativna koncentracija jednog ciljnog molekula u odnosu na drugi se iskazuje kao razlika broja ciklusa ($\Delta Ct = Ct \text{ gena od interesa} - Ct \text{ referentnog gena}$), neophodnih da se dostigne isti nivo fluorescencije. Kao fluorofora korišćen je *SYBR Green* (*Life Technologies*), fluorogena interkalaciona boja, koja emituje snažan fluorescentni signal nakon vezivanja za dvostruki DNA heliks, dok nevezana boja u rastvoru ispoljava nedetektibilnu fluorescenciju. Najčešći metod za kvantifikaciju genske ekspresije predstavlja analiza ekspresije ciljnog gena relativno u odnosu na kontrolni, referentni gen tzv. "*house-keeping*" gen - gen koji pokazuje konstitutivnu i uniformnu ekspresiju u svim ćelijama i tkivima, na koju ne utiče eksperimentalni tretman.

Za pravilnu interpretaciju qRT-PCR-a neophodna je adekvatna normalizacija uzoraka. Uzorci koji su korišćeni tokom našeg ispitivanja su normalizovani pomoću dve strategije. Prvo, za amplifikaciju je korišćena ista početna koncentracija RNA (iz koje je reverzno transkribovana matrica cDNA) u svakoj reakciji. Drugo, ekspresija svakog pojedinačnog ispitivanog gena u svakom uzorku je normalizovana u odnosu na ekspresiju pažljivo odabranog referentnog gena čime je umanjena varijabilnost koja može da nastane usled manipulacija uzorkom. Kao referentni geni korišćeni su gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) i beta-aktin.

Oligonukleotidni graničnici (prajmeri) za gene od interesa su dizajnirani koristeći *Primer Express 3.0* softver (*Applied Biosystems*) upotrebom metode premošćavanja introna (*intron spanning*) odn. metodom povezivanja egzona (*exon-exon junction*) čime je omogućena amplifikacija samo sekvenci za ciljanu mRNA i sprečavanje amplifikacije eventualnih kontaminanata poreklom genomske DNA. Za qRT-PCR esej se smatra da ga karakteriše

premošćavanje introna kada je najmanje jedna egzon/egzon granica direktno pokrivena jednim od prajmera, ili se nalazi između sekvenci za koje se hibridizuju prajmeri.. *In silico* testiranjem pomoću programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) je isključena homologija dizajniranih sekvenci prajmera sa pseudogenima i drugim neželjenim hibridizacionim metama. U analizi su korišćeni prajmeri čije sekvence su prikazane u **tabeli 3.8.1**.

Reakcione ploče sa 96 otvora (*MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems*) su sadržale reakcione smeše ispitivanih uzoraka u triplikatu kao i kontrole bez matrice cDNA (*Non Template Control – NTC*). NTC su korisne u cilju detekcije PCR kontaminacije ili/i formiranja dimera prajmera. Reakciona smeša ukupnog volumena 20 µL se sastojala od 5 µL cDNA, 5 µL 2.4 µM smeše *forward* i *reverse* prajmera i 10 µL *Power SYBR[®] Green Master Mix-a (Applied Biosystems)* koji sadrži sve komponente neophodne za PCR amplifikaciju (Taq DNA polimerazu, smešu deoksi nukleotid 3-fosfata, Mg²⁺, pufer, dejonizovanu sterilnu vodu i fluoroforu *SYBR Green*). U otvore sa NTC je umesto cDNA pipetirano 5 µL vode za molekularnu biologiju (*Sigma-Aldrich*)

RT-qPCR reakcija je izvedena pomoću *StepOne Plus (Applied Biosystems)* instrumenta, amplifikacijom od 50 ciklusa, a svaki ciklus se sastojao od denaturacije na 95 °C tokom 15 sec i potom hibridizacije i elongacije na 60 °C u trajanju od 1 min. Detektovani fluorescentni signal produkata PCR amplifikacije je automatski analiziran standardnim softverskim paketom (*Applied Biosystems StepOneTM Real-Time PCR software v. 2.0*).

Broj kopija gena u ampikonu je izražen aritmetičkom formulom $2^{-\Delta Ct}$,

pri čemu je:

$$\Delta Ct = Ct \text{ ispitivanog gena} - Ct \text{ referentnog gena}$$

Relativna kvantifikacija genske ekspresije je izvršena i pomoću komparativne Ct metode ($\Delta\Delta Ct$ metode) koja numerički pokazuje koliko je puta ekspresija ispitivanog gena u eksperimentalnoj grupi veća ili manja u odnosu na kontrolnu grupu.

$\Delta\Delta Ct$ vrednost se izračunava po sledećoj formuli:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ eksperimentalne grupe} - \Delta Ct \text{ kontrolne grupe}$$

Ekspresija ispitivanog gena u eksperimentalnoj grupi, normalizovana u odnosu na referentni gen, u odnosu na kontrolnu grupu se izražava aritmetičkom formulom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (268).

Tabela 3.8.1. Sekvence prajmera korišćenih u qRT-PCR.

NCBI genska sekvenca	Gen	Vrsta	Sekvenca prajmera		Dužina produkta (bp)
NM_006066.3	AKR1A1	<i>Homo sapiens</i>	L	CTTGCTCAGGTGGCAGGT	184
			R	TCTCTTCCCATCCACCGTAA	
NM_138764.4	BAX	<i>Homo sapiens</i>	L	TTTGCTCAGGGTTTCATCC	168
			R	GCAATCATCCTCTGCAGCTC	
NM_001010922.2	BCL-2	<i>Homo sapiens</i>	L	GATTCAGGAGAGCCTTGTCT	142
			R	GTATAGCTCCTGTCTGTCCCTTA	
NM_001101.3	ACT-B	<i>Homo sapiens</i>	L	GGCATCCTCACCTGAAGTA	184
			R	ACATGATCTGGGTCATCTTCTC	
NM_001752.3	CAT	<i>Homo sapiens</i>	L	TCCACTGTTGCTGGAGAATC	203
			R	ATGTCCGGATCCTCAGATG	
NM_001757.3	CBR-1	<i>Homo sapiens</i>	L	CATCGCCTTCAAGGTTGCT	138
			R	ACGTTCACTCTCCCTTG	
NM_001206993.1	FXR	<i>Homo sapiens</i>	L	ACAAAGTCATGCAGGGAGAA	181
			R	GTACATGATTGGTTGCCATTT	
NM_001289746.1	GAPDH	<i>Homo sapiens</i>	L	AGCCTCAAGATCATCAGCAAT	109
			R	GGACTGTGGTCATGAGTCCTT	
NM_000637.3	GR	<i>Homo sapiens</i>	L	TCTCCAGGTCAAGGAGGT	182
			R	ATCGGTTTGAATCCCCAGTT	
NM_005347.4	GRP-78	<i>Homo sapiens</i>	L	ACTCCTGAAGGGGAACGTC	153
			R	CACCTTGAACGGCAAGAAC	
NM_145740.3	GST	<i>Homo sapiens</i>	L	GAGAGAGCCCTGATTGATATGTA	189
			R	GCCAACAAGGTAGTCTTGTC	
NM_000927.4	MDR1	<i>Homo sapiens</i>	L	GGAAGATCGCTACTGAAGCA	195
			R	ACCGGAAACATCCAGCATAG	
NM_001024466.1	SOD	<i>Homo sapiens</i>	L	CGTCACCGAGGAGAAGTACC	196
			R	CTGATTTGGACAAGCAGCAA	
NM_004996.3	MRP1	<i>Homo sapiens</i>	L	CCACACTGAATGGCATCAC	149
			R	CACGGAGCCCTTGATAGC	
NM_000392.3	MRP2	<i>Homo sapiens</i>	L	GCTGCTGAAATTGCTGATCT	203
			R	TGGATAGGGTCAATGCCTTC	

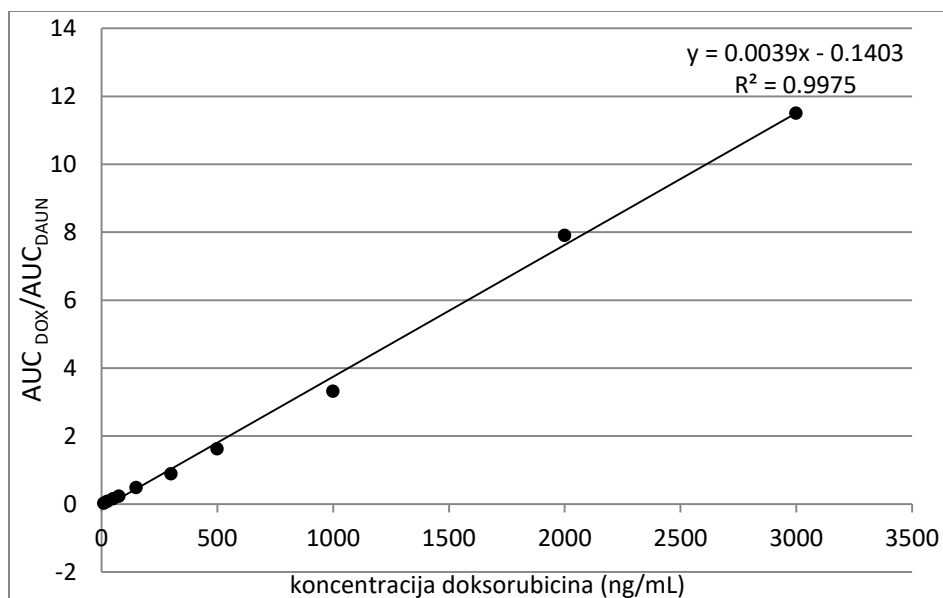
NM_001145412.2	NRF-2	<i>Homo sapiens</i>	L	CCAACTACTCCCAGGTTGC	119
			R	CGTAGCCGAAGAAACCTCAT	
NM_001126118.1	p53	<i>Homo sapiens</i>	L	TGCTCAGATAGCGATGGTCT	144
			R	ACAGTCAGAGCCAACCTCAG	
NM_021969.2	SHP	<i>Homo sapiens</i>	L	TCCTCTTCAACCCCGATGT	193
			R	AAGAAGAGGTCCCCAAGCAG	
NM_031000.3	Akr1A1	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	CTGGTCAGGTGAAAGCAGCT	143
			R	CTCTCGAGGTACTGCCTTGC	
NM_019170.2	Cbr1	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	CTTCAAAGTTGTTGACCCAC	131
			R	CATTCACCACTCTGCCTTGG	
NM_013083.2	Grp78	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	GAAGGTCACCCATGCAGTTG	126
			R	GCTGCTGTTGGCTCATTGAT	
NM_133401.1	Mdr1a	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	TCACAATGTTTCGCTATGCAG	212
			R	GTACGTGGTCATTTGCCTCT	
NM_022281.2	Mrp1	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	TGGATTACAGGGATGATGGTG	151
			R	CAGGCTGCTTCCTCGACTTA	
NM_012833.1	Mrp2	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	TCAAGATCCTGAAATACTTTGCC	152
			R	CACAGACACCAGGATTGGAG	
NM_057133.1	Shp	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	CCCAAGGAGTACGCATACCTGA	125
			R	TCCAGGACTTCACACAATGCC	
NM_030989.3	p53	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	CCAAGAAGGGCCAGTCTACGT	57
			R	GCCCCACTTTCTTGATCATTG	
NM_031144.3	Act-b	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	TACTGCCCTGGCTCCTAGCA	90
			R	GCCAGGATAGAGCCACCAATC	
NM_017008.4	Gapdh	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	TTCAACGGCACAGTCAAGGC	101
			R	TCACCCCATTTGATGTTAGCG	
NM_021745.1	Fxr	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	GTGACAAAGAAGCCGCGAAT	114
			R	GCAGGTGAGCGCGTTGTAAT	
NM_016993.1	Bcl2	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	GATCCAGGATAACGGAGGCT	102
			R	CTGAGCAGCGTCTTCAGAGA	
NM_017059.2	Bax	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	CCGCGTGGTTGCCCTCTTCT	159
			R	AGGCCTTCCCAGCCACCCTG	
NM_012520.2	Cat	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	CTGTCCCTACCGTGCTCGCG	81
			R	TTGGGAGCACCACCCTGGTTGT	
NM_053906.2	Gr	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	GTGGTCTTCAGCCACCCGCC	110
			R	ATCGGGGTGAAGGCGGTCTGA	
NM_017050.1	Sod1	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	TTCGAGCAGAAGGCAAGCGGTG	176
			R	TCTTCATCCGCTGGACCGCCA	

NM_030826.4	Gpx	<i>Rattus Norvegicus</i>	L	TCGGACATCAGGAGAATGGCAAGAA	163
			R	GCTGGCAAGGCATTCCGCAG	

3.9. Određivanje koncentracije doksorubicina HPLC metodom

3.9.1. Instrumenti i hromatografski uslovi

Određivanje koncentracije doksorubicina u ćelijama, tkivu jetre i srca, u serumu i žuči vršeno je primenom tečne hromatografije visoke efikasnosti (HPLC, *High performance liquid chromatography*, *Dionex*) sa fluorescentnim detektorom (*Agilent*). Za separaciju ispitivanog analita korišćena je kolona *ZORBAX Eclipse plus C18* (150 mm x 2.1 mm, 5µm, *Agilent*) uz primenu pretkolone *ZORBAX Eclipse plus C18* (12.5 mm x 2.1 mm, 5µm, *Agilent*). Hromatografski uslovi sa izokratskom elucijom primenjeni su po metodu Alvarez-Cedron i sar. (269). Mobilna faza se sastojala od smeše metanola i 0.01 M fosfatnog pufera (65:35, v/v) čija pH vrednost je podešena na $2,96 \pm 0,01$ pomoću 19 M KCl. Mobilna faza je pripremana svakodnevno, degasirana pomoću *Elmasonic* ultrazvučnog kupatila (*Carl-Roth*) i filtrirana pomoću celulozne filter membrane (*Agilent*). Brzina protoka mobilne faze do stabilizacije bazne linije je bila konstantna, 0,4 mL/min a temperatura sistema je održavana na $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Fluorescentna detekcija je vršena podešavanjem ekscitatorne talasne dužine na 470 nm, a emisione talasne dužine na 555 nm. Kvantifikacija doksorubicina u ispitivanim uzorcima je vršena uz primenu internog standarda, daunorubicina. Ispitivani analiti su identifikovani na osnovu retencionog vremena referentnih standardnih supstanci (*Sigma-Aldrich*). Retenciono vreme za doksorubicin je iznosilo 2.8-3.1 min a za daunorubicin 4.9-5.8 min. U navedenim retencionim vremenima nije postojala interferencija analita sa drugim supstancama. Metod je bio linearan u rasponu od 10 ng/mL do 3 µg/mL ($R^2=0,997$) (**grafikon 3.9.1.**). Limit detekcije za doksorubicin je iznosio 3.32 ng/mL.



Grafikon 3.9.1. Zavisnost vrednosti koncentracije doksorubicina i odnosa površine ispod pika u vremenu (AUC) doksorubicina i daunorubicina (4 µg/mL).

3.9.2. Priprema uzoraka za HPLC

Pre injektovanja u HPLC sistem uzorci su pripremljeni denaturacijom i precipitacijom proteina prema metodi Zhou i sar. (270). 50 µL uzorka (suspenzije MCF-7 ćelija, homogenata jetre, homogenata miokarda, seruma ili žuči) je pipetirano u 1,5 mL polipropilensku epruvetu (*Eppendorf*) nakon čega je dodato 10 µL vodenog rastvora internog standarda - daunorubicina (4 µg/mL) (*Sigma-Aldrich*) i 140 µL ledeno-hladnog metanola. Sadržaj u epruveti je tokom 30 s mešan pomoću vorteks-mešalice i nakon toga centrifugiran tokom 10 min na 15000 rpm. Supernatanti su preneseni u vijale autosamplera i 40 µL je direktno injektovano u HPLC sistem. Svi postupci tokom pripreme uzoraka za analizu su vršeni u zamračenom ambijentu kako bi se sprečila fotodegradacija doksorubicina.

3.9.3. Farmakokinetička analiza

Farmakokinetički profil doksorubicina primenjenog u *in vivo* eksperimentalnom modelu je analiziran korišćenjem softvera *PKSolver* (271) pomoću podataka koncentracija-vreme primenom nekompartmanske analize. Ukupna površina ispod krive koncentracija-vreme do merenog vremena (AUC_{0-t}) i ekstrapoliranog vremena u beskonačnost (AUC_{0-∞}) je izračunata korišćenjem trapezoidalnog metoda:

$$AUC_{0-t} = \int_0^t C_{pt} * dt$$

$$AUC_{0-\infty} = \int_0^t C_{pt} * dt + C_{pt} / \lambda_z = \int_0^{\infty} C_{pt} * dt$$

pri čemu je: C_{pt} - koncentracija u vremenu t; dt - diferencijalna razlika vremena.

Koreliranjem vrednosti koncentracija-vreme sa vremenom dobija se kriva prvog momenta gde se trapezoidalnim metodom može izračunati površina ispod krive prvog momenta (AUMC):

$$AUMC_{0-t} = \int_0^t t C_{pt} * dt$$

Konstanta eliminacije (λ_z) se dobija iz poslednjih tačaka krive u sistemu lnC_{pt}-vreme i određuje se linearnom regresijom, odnosno konstanta eliminacije je nagib prave u logaritamskom sistemu.

$$\lambda_z = \Delta \ln C_{pt} / \Delta t$$

Poluvreme eliminacije (t_{1/2}) je moguće izračunati preko konstante eliminacije λ_z :

$$t_{1/2} = \ln(2) / \lambda_z$$

Srednje vreme zadržavanja leka u organizmu (MRT) je računato preko površine ispod krive AUC:

$$MRT = AUMC_{0-t} / AUC_{0-t}$$

Ukupan klirens leka (Cl) je izračunat preko formule:

$$Cl = \text{Doza leka} / AUC_{0-\infty}$$

Volumen distribucije (Vd) je određen korišćenjem formule:

$$Vd = \text{Doza leka} / AUC_{0-\infty} * \lambda_z$$

3.10. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza dobijenih rezultata je izvršena pomoću *SPSS* statističkog softvera, ver. 19.0 (*Systat Software Inc*). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički u vidu aritmetičke sredine (\bar{x}) ± standardna devijacija (SD). Za ispitivanje stepena zavisnosti između promenljivih

korišćena je regresiona analiza, a jačina zavisnosti je utvrđena *Pearson*-ovim koeficijentom linearne korelacije. Testiranje razlika između nezavisnih varijabli vršeno je Studentovim t-testom za nezavisne uzorke i jednofaktorskom analizom varijanse (jednosmerna ANOVA) pri čemu je korišćen *Tuckey post hoc* test. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 5% (0,05). Za grafičke prikaze je korišćen softverski paket *Microsoft Office Excel 2010*.

4. REZULTATI

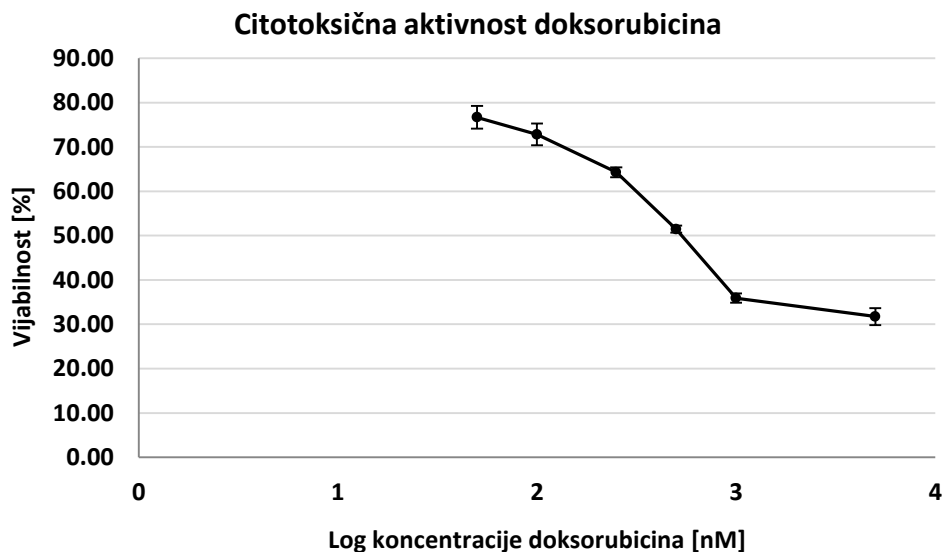
4.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti doksorubicina i žučnih kiselina na MCF-7 ćelijskoj liniji

4.1.1. Citotoksična aktivnost doksorubicina na MCF-7 ćelijskoj liniji

Citotoksična aktivnost antineoplastičkog agensa doksorubicina na ćelijskoj liniji MCF-7 prikazana je na **tabeli 4.1.1** i **grafikonu 4.1.1**. Utvrđena je koncentracijski-zavisna citotoksična aktivnost doksorubicina nakon 48h tretmana MCF-7 ćelija u opsegu ispitivanih koncentracija. Dobijeni rezultati ukazuju na veoma izraženo citotoksično dejstvo pri čemu je razlika u citotoksičnoj aktivnosti između koncentracija 0,05 i 5 μM bila 3 puta, a izračunata IC_{50} vrednost za DOX je iznosila 0,64 μM .

Tabela 4.1.1. Koncentracijska zavisnost citotoksične aktivnosti doksorubicina na MCF-7 ćelijskoj liniji.

Dokсорubicin [μM]	0,05	0,1	0,25	0,5	1	5
Citotoksičnost [%]	23,32 \pm 2,54	27,19 \pm 2,47	35,71 \pm 1,13	48,54 \pm 0,08	64,09 \pm 1,03	68,27 \pm 1,89



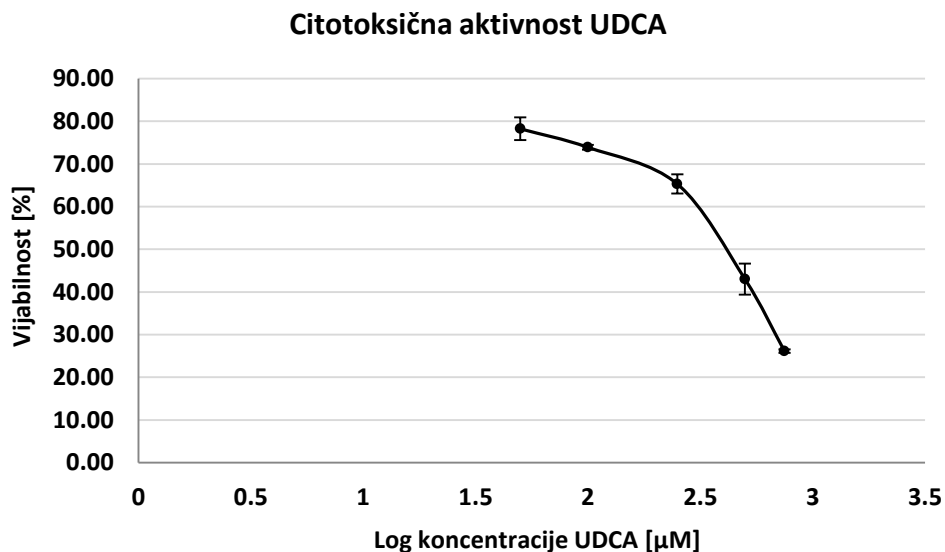
Grafikon 4.1.1. Koncentracijska zavisnost citotoksične aktivnosti dokсорubicina na MCF-7 ćelijskoj liniji.

4.1.2. Citotoksična aktivnost ursodeoksiholne kiseline (UDCA) na MCF-7 ćelijskoj liniji

Na tabeli 4.1.2 i grafikonu 4.1.2 su prikazani rezultati citotoksične aktivnosti UDCA, prirodne hidrofilne žučne kiseline koja nastaje metabolisanjem CDCA u intestinalnom traktu pod dejstvom probiotskih bakterija. UDCA je ispoljila koncentracijski-zavisnu citotoksičnost na MCF-7 ćelijama u opsegu ispitivanih koncentracija. Izračunata IC_{50} vrednost, odnosno koncentracija UDCA koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% ćelija, je iznosila 320,5 μ M.

Tabela 4.1.2. Koncentracijska zavisnost citotoksičnosti UDCA na MCF-7 ćelijskoj liniji.

UDCA [μ M]	50	100	250	500	750
Citotoksičnost [%]	21,77 \pm 2,65	26,11 \pm 0,55	34,70 \pm 2,26	57,00 \pm 3,66	73,88 \pm 0,40



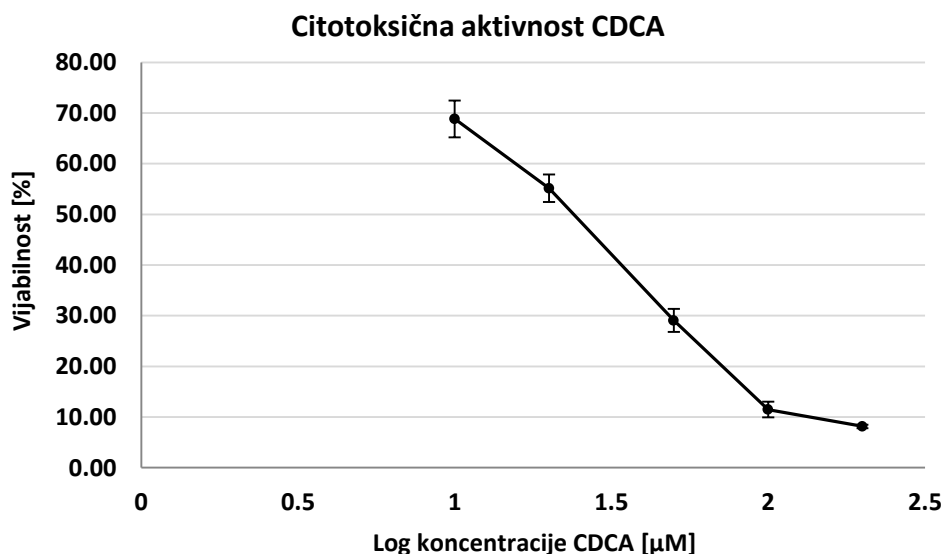
Grafikon 4.1.2. Koncentracijska zavisnost citotoksične aktivnosti UDCA na MCF-7 ćelijskoj liniji.

4.1.3. Citotoksična aktivnost henodeoksiholne kiseline (CDCA) na MCF-7 ćelijskoj liniji

Rezultati citotoksične aktivnosti CDCA, prirodne hidrofobne žučne kiseline koja se sintetiše u hepatocitima, su prikazani na **tabeli 4.1.3** i **grafikonu 4.1.3**. U opsegu ispitivanih koncentracija, od 10 do 200 μM CDCA je takođe ispoljila značajnu citotoksičnu aktivnost. U poređenju sa UDCA, CDCA je ispoljila veću citotoksičnu aktivnost, s obzirom na to da je vrednost izračunate IC_{50} koncentracije iznosila 22,53 μM .

Tabela 4.1.3. Koncentracijska zavisnost citotoksičnosti CDCA na MCF-7 ćelijskoj liniji.

CDCA [μM]	10	20	50	100	200
Citotoksičnost [%]	31,17 \pm 3,63	44,87 \pm 2,72	70,94 \pm 2,27	88,53 \pm 1,56	91,86 \pm 0,34



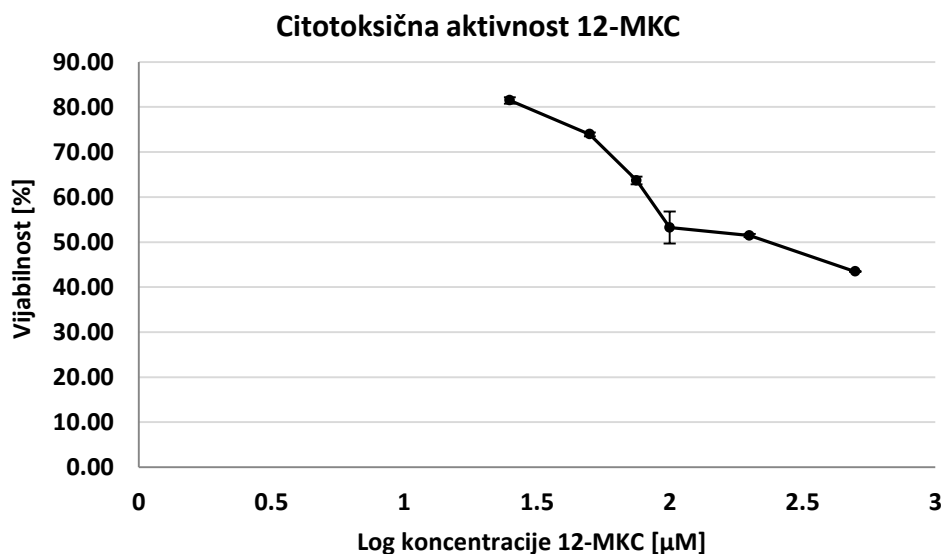
Grafikon 4.1.3. Koncentracijska zavisnost citotoksične aktivnosti CDCA na MCF-7 ćelijskoj liniji.

4.1.4. Citotoksična aktivnost 12-monoketoholne kiseline (12-MKC) na MCF-7 ćelijskoj liniji

Rezultati citotoksične aktivnosti semisintetske žučne kiseline 12-monoketoholne kiseline (12-MKC) u ćelijama humanog adenokarcinoma dojke su prikazani u **tabeli 4.1.4** i na **grafikonu 4.1.4**. Utvrđen je koncentracijski zavisni porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u opsegu koncentracija od 25 do 500 μM . Izračunata vrednost koja inhibira rast 50% ćelija (IC_{50}) za 12-MKC je iznosila 223,5 μM .

Tabela 4.1.4. Koncentracijska zavisnost citotoksičnosti 12-MKC na MCF-7 ćelijskoj liniji.

12-MKC [μM]	25	50	75	100	200	500
Citotoksičnost [%]	18,54 \pm 0,70	26,07 \pm 0,42	36,32 \pm 0,83	46,77 \pm 3,53	48,54 \pm 0,34	56,55 \pm 0,11



Grafikon 4.1.4. Koncentracijska zavisnost citotoksične aktivnosti 12-MKC na MCF-7 ćelijskoj liniji.

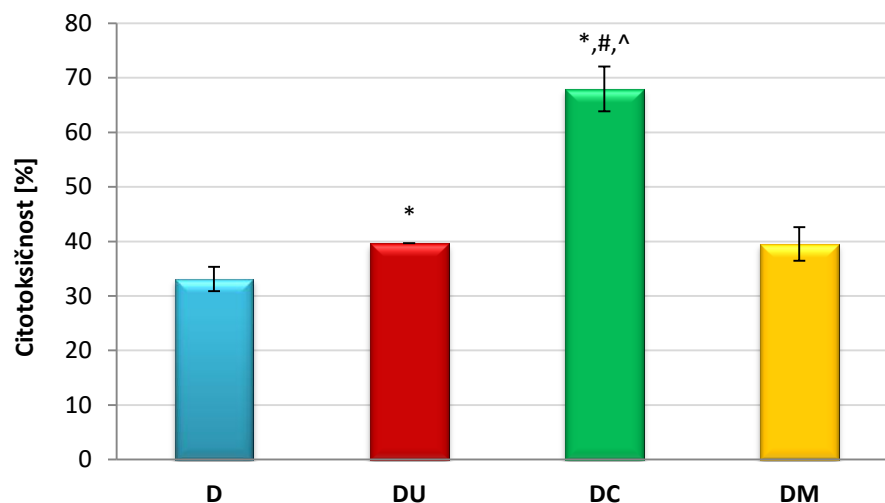
4.1.5. Ispitivanje uticaja žučnih kiselina na citotoksičnu aktivnost doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji

Rezultati kotretmana MCF-7 ćelijske linije sa 0,25 μM doksorubicina i koncentracijama žučnih kiselina koje inhibiraju 20% ćelijskog rasta (IC_{20}) su prikazani na **tabeli 4.1.5.1** i **grafikonu 4.1.5.1**. Kotretman ćelija sa 0,25 μM doksorubicina i 50 μM UDCA je doveo do statistički značajnog povećanja citotoksične aktivnosti doksorubicina ($p=0,05$). U odnosu na tretman doksorubicinom koji je inhibisao rast 33,36% MCF-7 ćelija (IC_{33}), kotretman sa 6 μM CDCA je rezultovao u statistički značajnom povećanju citotoksičnosti na 68,23% ($p=0,008$). MKC primenjena u koncentraciji 25 μM u kombinaciji sa doksorubicinom je takođe dovela do povećanja citotoksičnosti, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

Poređenjem citotoksičnog efekta između grupa tretiranih doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama, uočeno je da je kotretman sa CDCA statistički značajno povećao citotoksičnu aktivnost u odnosu na kotretman sa UDCA ($p=0,01$) i MKC ($p=0,015$).

Tabela 4.1.5.1. Uticaj žučnih kiselina na citotoksičnu aktivnost doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD iz dva nezavisna eksperimenata u oktuplikatu. D - doksorubicin, DU – doksorubicin + UDCA, DC – doksorubicin + CDCA, DM – doksorubicin + MKC. * $p < 0,05$ vs. D; # $p < 0,05$ vs. DU, ^ $p = 0,05$ vs. DM.

Grupa	D	DU	DC	DM
Citotoksičnost [%]	33,27 \pm 2,23	39,67 \pm 0,01*	68,23 \pm 4,10 ^{*,#,^}	39,14 \pm 3,07

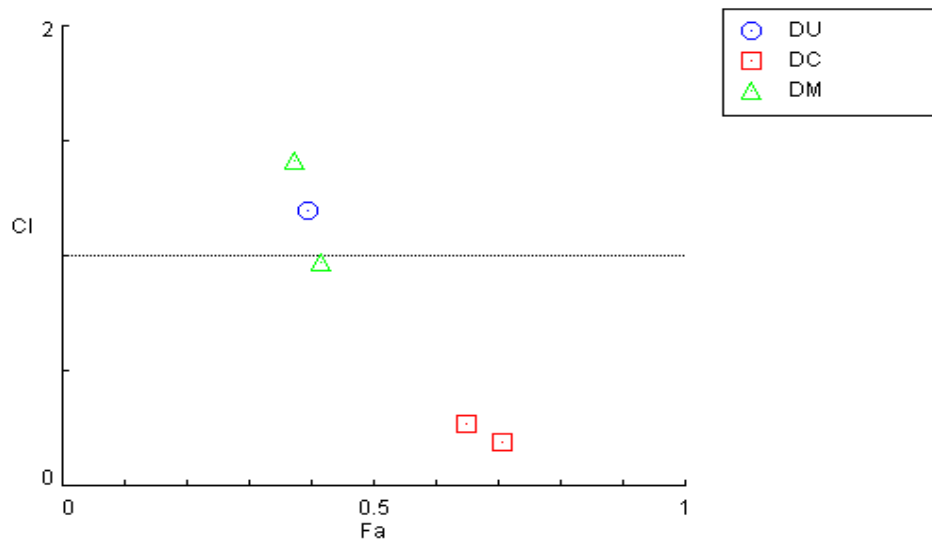


Grafikon 4.1.5.1. Uticaj žučnih kiselina na citotoksičnu aktivnost doksorubicina MCF-7 ćelijskoj liniji. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD iz dva nezavisna eksperimenata u oktuplikatu. D - doksorubicin, DU – doksorubicin + UDCA, DC – doksorubicin + CDCA, DM – doksorubicin + MKC. * $p < 0,05$ vs. D; # $p < 0,05$ vs. DU, ^ $p = 0,05$ vs. DM.

Na osnovu rezultata ispitivanja citotoksičnosti dobijenih kombinacijama doksorubicina sa izabranim žučnim kiselinama dobijenih iz dva nezavisna eksperimenta, kvantitativnom analizom odnosa doza-efekat primenom *CompuSyn* softvera utvrđena je vrsta interakcije (sinergizma, antagonizma ili aditivnog efekta) između doksorubicina i žučnih kiselina primenjenih u izabranim dozama na osnovu CI kvantitativnog deskriptora. Primenom CI algoritma odnosa doze i efekta utvrđeno je da UDCA i 12-MKC ispoljavaju blagi aditivni efekat dok CDCA ispoljava veoma snažan sinergistički efekat sa doksorubicinom (**tabela 4.1.5.2, grafikon 4.1.5.2**).

Tabela 4.1.5.2. Vrednosti CI indeksa kao deksriptora tipa interakcije doksorubicina i žučnih kiselina primenjenih na MCF-7 ćelijskoj liniji tokom 48h

Grupa	DU	DC	DM
CI indeks	1,20 \pm 0,0009	0,06 \pm 0,0559	1,19 \pm 0,3087
Tip interakcije	Aditivni	Sinergizam	Aditivni



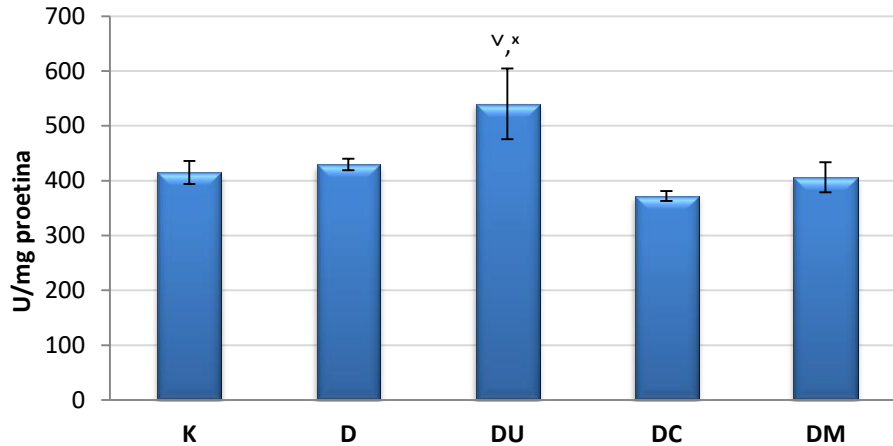
Grafikon 4.1.5.2. Prikaz vrednosti CI indeksa kao deksriptora tipa interakcije doksorubicina i žučnih kiselina primenjenih na MCF-7 ćelijskoj liniji tokom 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD iz dva nezavisna eksperimenata u oktuplikatu.

4.2. Specifična aktivnost antioksidativnih enzima u MCF-7 ćelijskoj liniji

Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u MCF-7 ćelijama je bila neznatno povišena nakon tretmana doksorubicinom u odnosu na kontrolnu grupu (**tabela 4.2, grafikon 4.2.1**). Kotretman ćelija sa UDCA je rezultovao u povećanju specifične aktivnosti SOD koje nije bilo značajno povišeno u odnosu na kontrolnu grupu i grupu ćelija tretiranih doksorubicinom, ali je ekspresija ovog enzima je bila značajno viša u odnosu na grupu ćelija kotetiranih sa CDCA ($p=0,02$) i 12-MKC ($p=0,05$).

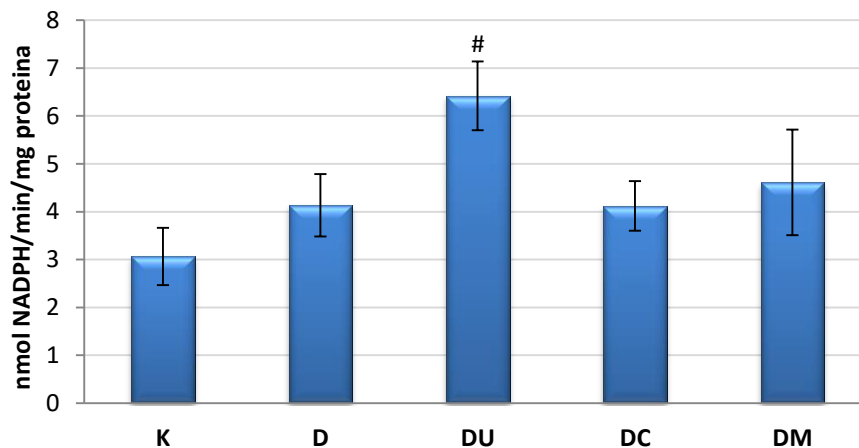
Tabela 4.2. Rezultati specifične aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom i koinkubacije doksorubicinom (D) i odgovarajućom žučnom: UDCA (DU), CDCA (DC) i 12-MKC (DM). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. D, ^ $p<0,05$ vs. DU, $\vee p<0,05$ vs. DC; * $p<0,05$ vs. DM.

Enzim	Grupa				
	K	D	DU	DC	DM
SOD	415,09 \pm 21,03	429,61 \pm 10,38	540,24 \pm 64,75 ^{^,x}	371,88 \pm 9,03	406,16 \pm 27,45
GPX	3,06 \pm 0,60	4,13 \pm 0,65	6,42 \pm 0,72 [#]	4,12 \pm 0,52	4,61 \pm 1,10
GR	3,39 \pm 1,41	3,84 \pm 1,95	5,30 \pm 1,88	10,42 \pm 1,49 ^{*,#,x}	1,75 \pm 0,03
GST	12,24 \pm 0,65	16,56 \pm 1,17	12,45 \pm 5,00	10,40 \pm 4,42	8,72 \pm 2,56

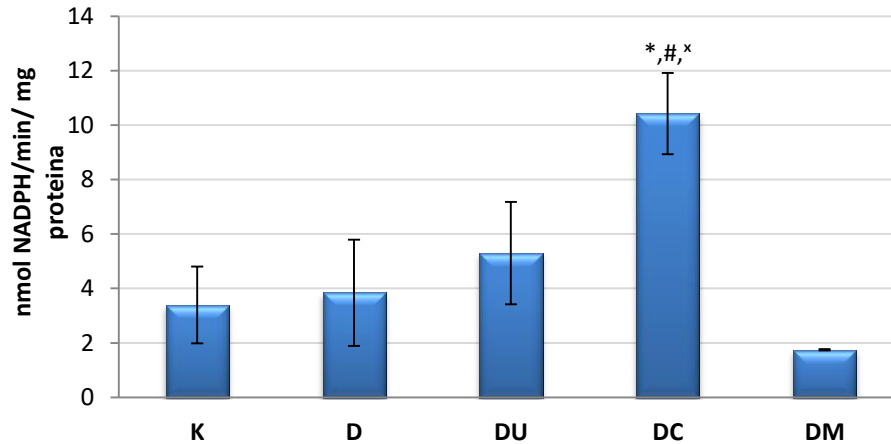


Grafikon 4.2.1. Specifična aktivnost SOD u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije doksorubicinom sa/bez dodatka žučnih kiselina tokom 24h. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. ^v $p < 0,05$ vs. DC; ^x $p < 0,05$ vs. DM.

Inkubacija MCF-7 ćelija doksorubicinom kao i koinkubacija doksorubicinom sa UDCA, CDCA ili 12-MKC je rezultovao u povećanju specifične aktivnosti glutathion peroksidaze (GPX) pri čemu je jedino povećanje u UDCA kotretiranoj grupi ćelija bilo statistički značajno u poređenju sa doksorubicin-tretiranom grupom ćelija ($p = 0,032$) (**grafikon 4.2.2, tabela 4.2**). Kotretman ćelija sa doksorubicinom i drugim žučnim kiselinama, CDCA i 12-MKC, nije statistički značajno povećao specifičnu aktivnost GPX.



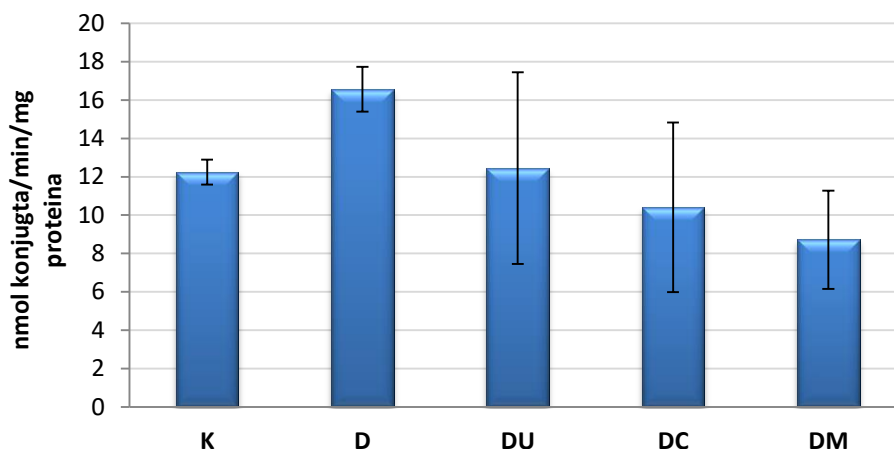
Grafikon 4.2.2. Specifična aktivnost GPX u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom sa/bez dodatka žučnih kiselina tokom 24h. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. [#] $p < 0,05$ vs. D.



Grafikon 4.2.3. Specifična aktivnost GR u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom sa/bez dodatka žučnih kiselina tokom 24h. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, * $p < 0,05$ vs. DM.

Specifična aktivnost glutathion reduktaze (GR) u MCF-7 ćelijskoj liniji je bila povišena nakon tretmana ćelija doksorubicinom i nakon kotretmana sa doksorubicinom i UDCA odn. CDCA (**grafikon 4.2.3, tabela 4.2**). Jedino u grupi ćelija kotretiranih sa CDCA povećanje specifične aktivnosti ovog enzima je bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,029$), ćelije tretirane samo doksorubicinom ($p=0,038$) i 12-MKC kotretiranu grupu ćelija ($p=0,012$). Kotretman sa 12-MKC je rezultovao u smanjenju aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu grupu, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno u odnosu na druge eksperimentalne grupe osim CDCA-kotretiranu grupu.

Specifična aktivnost glutathion-S-transferaze (GST) u MCF-7 ćelijskoj liniji je bila povišena nakon tretmana doksorubicinom i nakon kotretmana sa UDCA, međutim statistička značajnost u obe grupe u odnosu na kontrolnu grupu nije postojala (**grafikon 4.2.4, tabela 4.2**). Kotretman ćelija sa CDCA i 12-MKC je smanjio aktivnost GST, ali bez statističkog značaja u odnosu na druge eksperimentalne grupe.

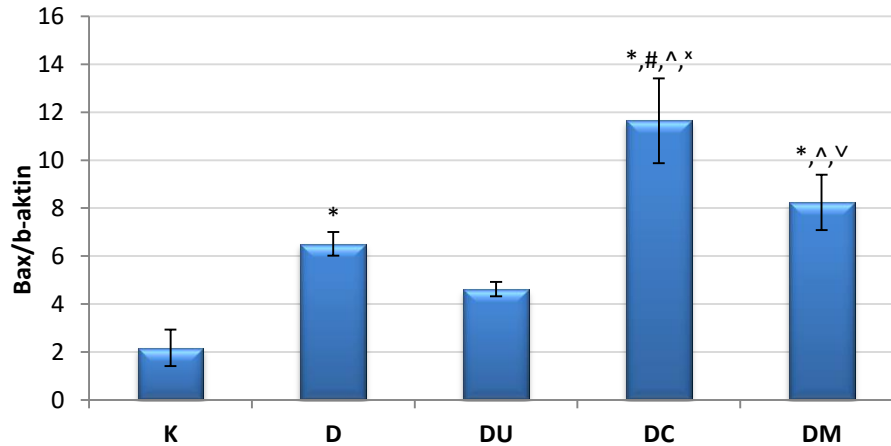


Grafikon 4.2.4. Specifična aktivnost GST u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom sa/bez dodatka žučnih kiselina tokom 24h. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD.

4.3. Analiza ekspresije gena u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom u prisustvu/odsustvu žučnih kiselina

4.3.1. Ekspresija gena induktora i inhibitora apoptoze

Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu, relativnom kvantifikacijom u odnosu na beta aktin kao referentni gen, utvrđeno je da je ekspresija mRNA gena za proapoptotski protein BAX (*Bcl-2-associated X protein*) bila statistički značajno povišena u grupi ćelija tretiranih doksorubicinom odnosno kotretiranih doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom (**grafikon 4.3.1, tabela 4.3.1**). Nakon tretmana doksorubicinom ekspresija mRNA za BAX je bila značajno povišena u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,003$), dok je nakon kotretmana sa doksorubicinom i CDCA odn. doksorubicinom i 12-MKC bila visoko statistički značajno povišena ($p<0,001$). Kotretman sa UDCA nije doveo do značajnog povećanja ekspresije *BAX* gena u odnosu na kontrolnu grupu.



Grafikon 4.3.1. Relativna ekspresija *BAX* mRNA u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. D, ^p<0,05 vs. DU, v p<0,05 vs. DC, xp<0,05 vs. DM.

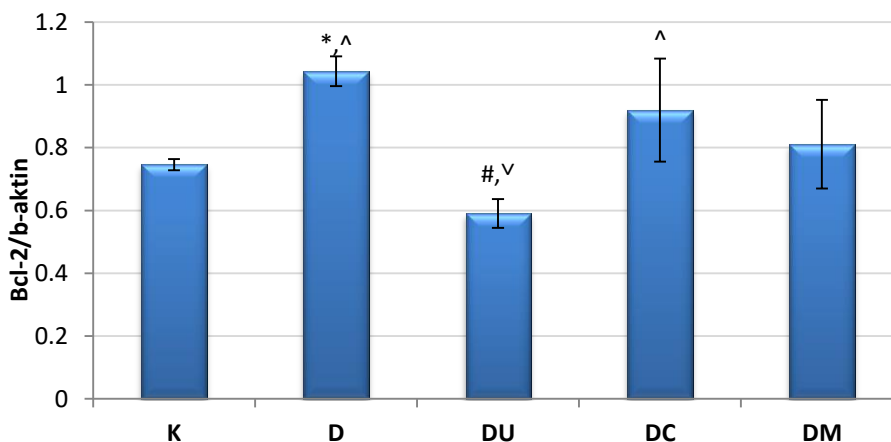
Poređenjem efekata kotretmana doksorubicinom i različitim žučnim kiselinama uočeno je da je kotretman sa CDCA doveo do najizraženijeg povećanja ekspresije *BAX* u odnosu na tretman doksorubicinom (p=0,001) i kombinaciju doksorubicina sa drugim žučnim kiselinama: UDCA (p<0,001) i 12-MKC (p=0,016). 12-MKC je značajno povećala ekspresiju *BAX* u odnosu na kotretman sa UDCA (p=0,016).

Tabela 4.3.1. Rezultati relativne ekspresije *BAX*, *BCL2* i *p53* mRNA u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. D, ^p<0,05 vs. DU, v p<0,05 vs. DC, xp<0,05 vs. DM.

Grupa	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>	<i>p53</i>
K	2,17 ± 0,76	0,75 ± 0,01	0,88 ± 0,23
D	6,51 ± 0,49*	1,04 ± 0,05*^	2,12 ± 0,33*^
DU	4,62 ± 0,30	0,59 ± 0,04#^v	1,75 ± 0,09*
DC	11,63 ± 1,77*#^x	0,91 ± 0,16^	1,12 ± 0,25#
DM	8,24 ± 1,15*^v	0,81 ± 0,14	2,54 ± 0,23*^v

Rezultati ekspresije mRNA za protein inhibitor apoptoze *BCL2* (*B-cell lymphoma-2*) su prikazani na **grafikonu 4.3.2** i **tabeli 4.3.1**. U odnosu na kontrolnu grupu, jedino u grupi ćelija tretiranih doksorubicinom ekspresija *BCL2* je bila statistički značajno povišena (p=0,03). Kotretman doksorubicinom i žučnim kiselinama je ispoljio različite efekte na ekspresiju *BCL2*:

kotretman sa UDCA je značajno smanjio ekspresiju *BCL2* u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom ($p=0,002$) kao i u odnosu na ćelije kotretirane doksorubicinom i CDCA ($p=0,018$). Kotretman sa CDCA je značajno povećao ekspresiju *BCL2* u odnosu na grupu ćelija kotretiranih sa UDCA ($p=0,018$), dok kotretman sa 12-MKC nije doveo do značajnog povećanja ekspresije *BCL2*.

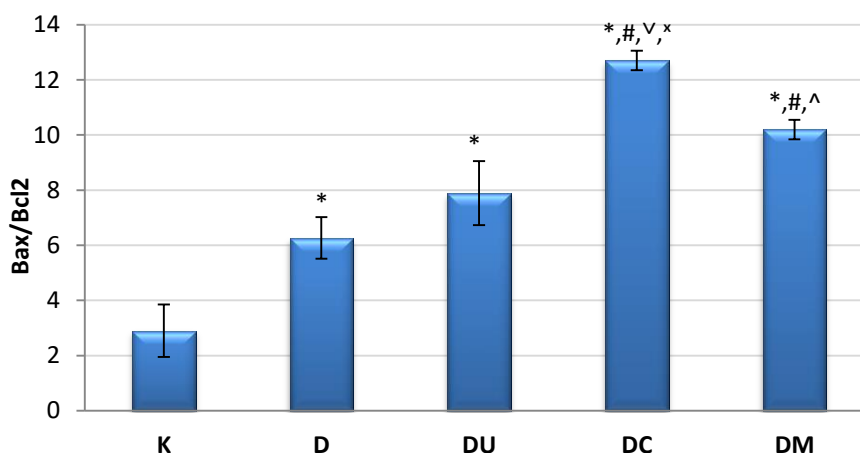


Grafikon 4.3.2. Relativna ekspresija *BCL2* mRNA u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. D, ^ $p<0,05$ vs. DU, v $p<0,05$ vs. DC.

Odnos količina pro- i anti-apoptotske mRNA, *BAX/BCL2*, koji ukazuje na kaspaza-3-vođenu apoptozu je prikazan u **tabeli 4.3.2** i na **grafikonu 4.3.3**. Iz dobijenih rezultata se može zapaziti da tretman doksorubicinom kao i kotretman sa sve tri žučne kiseline značajno povećava apoptozu MCF-7 ćelija posredovanu kaspaza-3-zavisnom apoptotskom kaskadom. Tretman ćelija doksorubicinom je značajno povećao *BAX/BCL2* odnos u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,003$), kao i kotretman sa UDCA ($p<0,001$), CDCA ($p<0,001$) i 12-MKC ($p<0,001$). U odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom, značajno povećanje *BAX/BCL2* odnosa je uzrokovao kotretman sa CDCA ($p<0,001$) i 12-MKC ($p=0,001$). Različite žučne kiseline su ispoljile različite efekte pri čemu je CDCA značajno povećala *BAX/BCL2* odnos u odnosu na ćelije kotretirane sa UDCA ($p<0,001$) i 12-MKC ($p=0,019$), dok je 12-MKC značajno povećala *BAX/BCL2* odnos u odnosu na grupu ćelija kotretiranih sa UDCA ($p=0,031$).

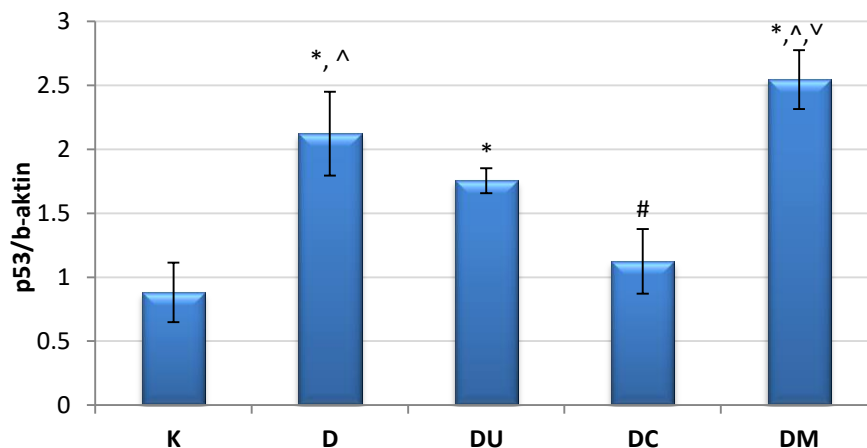
Tabela 4.3.2. Odnos *BAX/BCL2* mRNA u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom u prisustvu/odsustvu odgovarajuće žučne kiseline. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	K	D	DU	DC	DM
BAX/BCL-2	2,9±0,95	6,3±0,76*	7,9±1,16*	12,7±0,36*	10,2±0,35*,#,^, \vee ,x



Grafikon 4.3.3. Odnos *BAX/BCL2* mRNA u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom u prisustvu/odsustvu odgovarajuće žučne kiseline. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

Tretman doksorubicinom i kotretman doksorubicinom i žučnim kiselinama je takođe uticao na ekspresiju mRNA za tumor-supresor *p53*. Tretman doksorubicinom je značajno povećao ekspresiju *p53* u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,001$), kao i kotretman sa UDCA ($p = 0,008$) i 12-MKC ($p < 0,001$), dok kotretman sa CDCA nije značajno povećao ekspresiju *p53* u odnosu na kontrolnu grupu (**grafikon 4.3.4, tabela 4.3.1**). Žučne kiseline primenjene u kombinaciji sa doksorubicinom su ispoljile različite efekte u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom. Prirodne žučne kiseline UDCA i CDCA su smanjile ekspresiju *p53*, pri čemu je smanjenje *p53* u grupi ćelija kotretiranih sa CDCA bilo statistički značajno ($p = 0,003$). 12-MKC je povećala ekspresiju *p53* u odnosu na grupe ćelija kotretiranih doksorubicinom sa UDCA ($p = 0,015$) i sa CDCA ($p < 0,001$). Komparativna ekspresija mRNA za BAX, BCL2 i *p53* u MCF-7 ćelijskoj liniji izražena u odnosu na kontrolnu grupu i grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom prikazana je u **tabeli 4.3.2** i **grafikonu 4.3.5**.

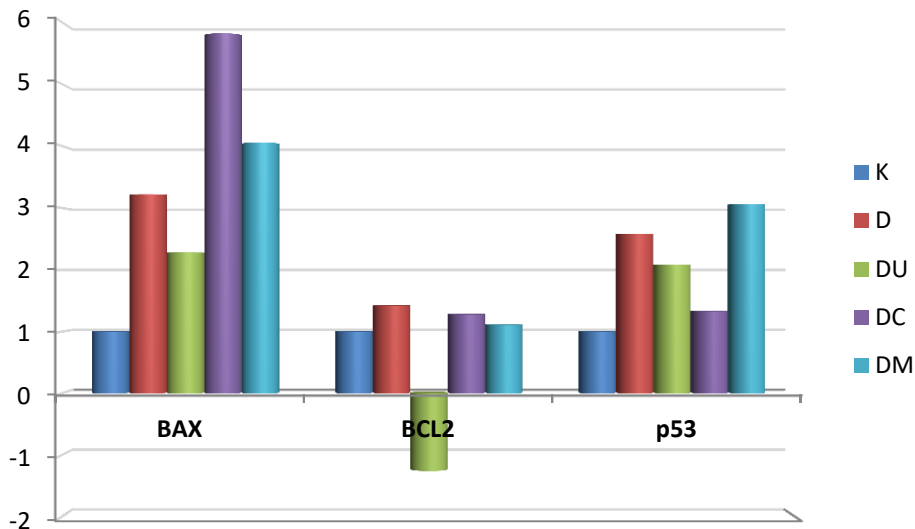


Grafikon 4.3.4. Rezultati relativne ekspresije mRNA za p53 u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doxorubicinom ili koinkubacije sa doxorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, v $p < 0,05$ vs. DC.

Tabela 4.3.2. Promene ekspresije mRNA za BAX, BCL2 i p53 u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doxorubicinom ili koinkubacije sa doxorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena komparativnim Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranih doxorubicinom.

Grupa	BAX		Grupa	BCL2	
	vs. K	vs. D		vs. K	vs. D
K	1	-	K	1	-
D	3,22 \pm 1,20	1	D	1,42 \pm 0,36	1
DU	2,29 \pm 0,83	-1,45 \pm 0,53	DU	-1,2 \pm 0,30	-1,79 \pm 0,43
DC	5,81 \pm 2,54	1,87 \pm 0,82	DC	1,27 \pm 0,54	-1,20 \pm 0,50
DM	4,06 \pm 1,49	1,30 \pm 0,48	DM	1,11 \pm 0,59	-1,43 \pm 0,47

Grupa	p53	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	2,58 \pm 1,20	1
DU	2,09 \pm 0,69	-1,23 \pm 0,41
DC	1,34 \pm 0,54	-1,98 \pm 0,80
DM	3,07 \pm 1,24	1,26 \pm 0,51



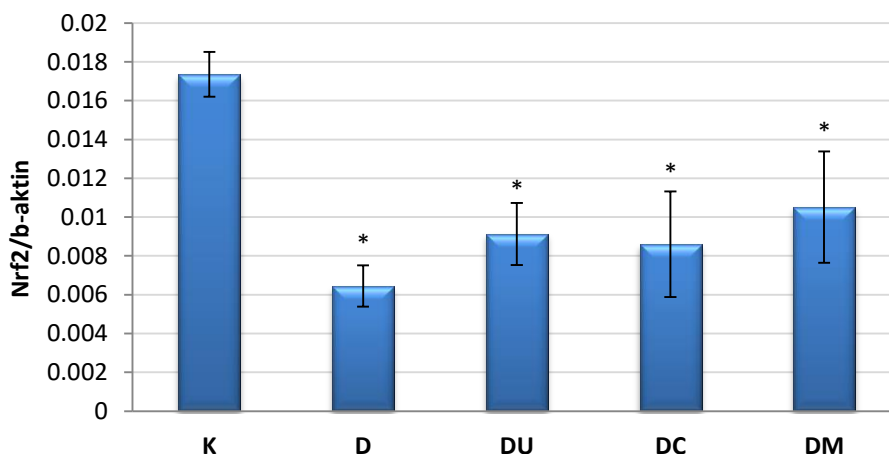
Grafikon 4.3.5. Promene ekspresije mRNA za BAX, BCL2 i p53 u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom u prisustvu/odsustvu odgovarajuće žučne kiseline, izraženo komparativnim Ct metodom u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4. Ekspresija gena sistema antioksidativne zaštite u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom u prisustvu/odsustvu žučnih kiselina

Ekspresija transkripcionog faktora nuklearnog faktora eritroid 2-povezanog faktora-2, NRF2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2*) mRNA je prikazana na **tabeli 4.4.1** i **grafikonu 4.4.1**. Tretman MCF-7 ćelija doksorubicinom je visoko statistički značajno smanjio ekspresiju NRF2 gena u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Kotretman doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama je takođe značajno smanjio ekspresiju NRF2 u odnosu na kontrolnu grupu pri čemu je do najmanjeg smanjenja došlo prilikom kotretmana sa 12-MKC ($p = 0,014$), zatim UDCA ($p = 0,004$) te CDCA ($p = 0,002$). Kotretman doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama (UDCA, CDCA i 12-MKC) je povećao ekspresiju ovog transkripcionog faktora kao pozitivnog regulatora protektivnih celularnih mehanizama uključujući i antioksidativnu zaštitu, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom.

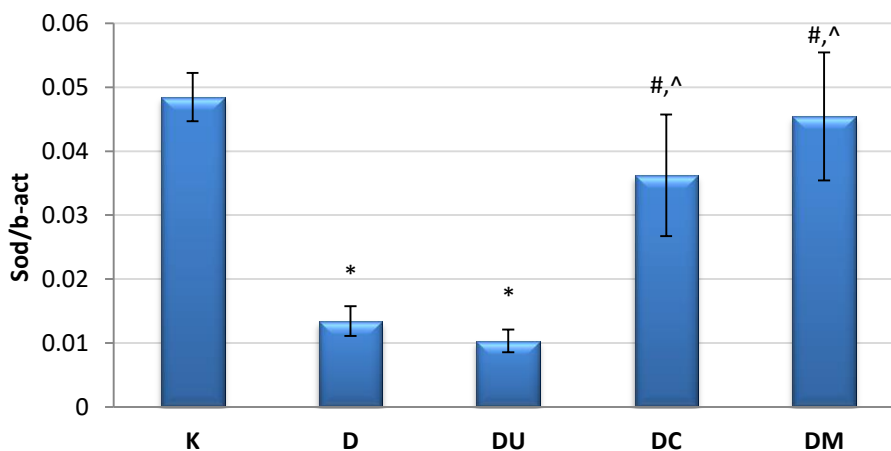
Tabela 4.4.1. Rezultati ekspresije *NRF2*, *SOD*, *CAT* i *GR* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon tretmana doksorubicinom ili kotretmana doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

Grupa/gen	<i>NRF2</i>	<i>SOD</i>	<i>CAT</i>	<i>GR</i>
K	0,017 \pm 0,001	0,048 \pm 0,003	0,038 \pm 0,004	0,0052 \pm 0,0005
D	0,006 \pm 0,001*	0,013 \pm 0,002*	0,056 \pm 0,012	0,0020 \pm 0,0003*
DU	0,009 \pm 0,001*	0,010 \pm 0,001*	0,080 \pm 0,018* \vee , \times	0,0003 \pm 4,7E-05* \wedge , \times
DC	0,008 \pm 0,002*	0,036 \pm 0,009# \wedge	0,005 \pm 0,001* \wedge , \times	0,0052 \pm 0,0001# \wedge
DM	0,010 \pm 0,002*	0,045 \pm 0,010# \wedge	0,034 \pm 0,008 \wedge , \vee	0,0042 \pm 0,0009# \wedge



Grafikon 4.4.1. Relativna ekspresija mRNA gena *NRF2* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon tretmana doksorubicinom ili kotretmana doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K.

Ekspresija mRNA za superoksid dismutazu (*SOD*) je bila negativno regulisana u grupama MCF-7 ćelija tretiranih doksorubicinom sa/bez dodatka žučnih kiselina (**grafikon 4.4.2**, **tabela 4.4.1**). Tretman ćelija doksorubicinom kao i kotretman doksorubicinom i UDCA su visoko statistički značajno smanjili ekspresiju *SOD* u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). U odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom, kotretman sa CDCA odn 12-MKC je značajno povećao ekspresiju *SOD* ($p = 0,011$ za CDCA; $p < 0,001$ za 12-MKC). Takođe, ekspresija *SOD* mRNA je bila značajno povećana u grupama ćelija kotretiranih sa CDCA ($p = 0,005$) i 12-MKC ($p < 0,001$) u odnosu na UDCA kotretiranu grupu.

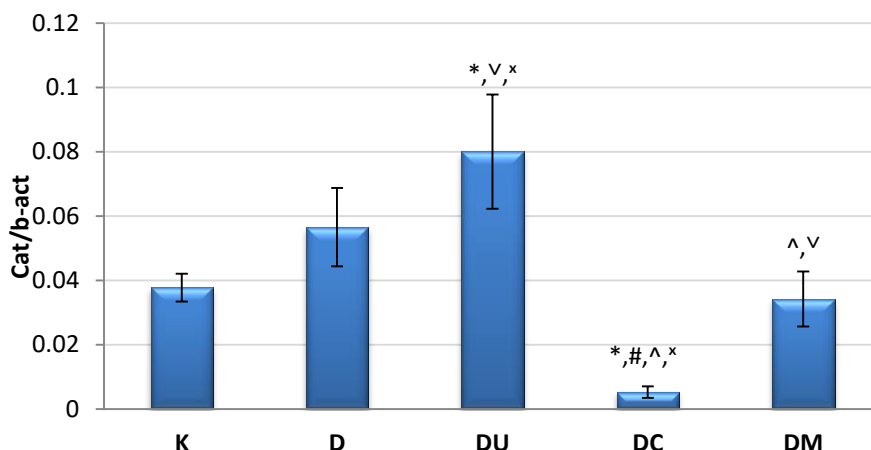


Grafikon 4.4.2. Rezultati relativne ekspresije *SOD* mRNA u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU.

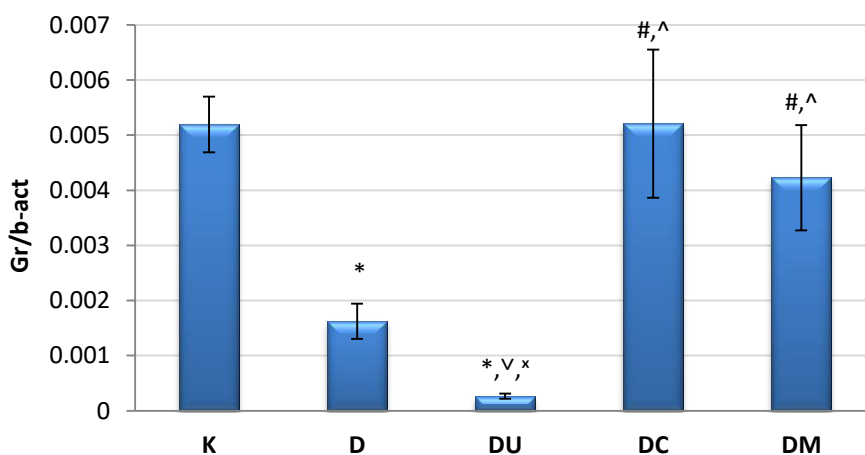
Na **grafikonu 4.4.3** i u **tabeli 4.4.1** su prikazani rezultati ekspresije mRNA za katalazu (CAT) u MCF-7 ćelijskoj liniji tretiranoj doksorubicinom odn. doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama. Tretman MCF-7 ćelija doksorubicinom je povećao ekspresiju *CAT* u odnosu na kontrolnu grupu ćelija ali bez statističke značajnosti. Kotretman ćelija sa doksorubicinom i UDCA je statistički značajno povećao ekspresiju *CAT* mRNA u odnosu na kontrolnu grupu ćelija ($p=0,004$). Pored toga, kotretman sa UDCA je značajno povećao ekspresiju *CAT* u poređenju sa CDCA ($p < 0,001$) i 12-MKC ($p=0,002$). Kotretman sa CDCA je rezultovao u značajnoj inhibiciji ekspresije *CAT* u odnosu na sve grupe: kontrolnu ($p=0,024$), doksorubicinom tretirane ćelije ($p=0,001$), UDCA- ($p < 0,001$) i 12-MKC-kotretiranu grupu ćelija ($p=0,046$).

Grafikon 4.4.4 i **tabela 4.4.1** prikazuju rezultate ekspresije mRNA za glutation reduktazu (*GR*) u MCF-7 ćelijama tretiranih doksorubicinom sa/bez dodatka žučnih kiselina. Tretman doksorubicinom kao i kotretman doksorubicinom i UDCA je statistički značajno smanjio ekspresiju *GR* ($p=0,002$; $p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, kotretman sa UDCA je značajno smanjio ekspresiju *GR* u odnosu na kotretman sa doksorubicinom i druge dve žučne kiseline, CDCA ($p < 0,001$) i 12-MKC ($p=0,001$). Kotretman sa doksorubicinom i CDCA je takođe visoko statistički značajno povećao ekspresiju *GR* u odnosu na kotretman sa 12-MKC ($p < 0,001$). Kotretman sa CDCA je povećao ekspresiju *GR* u odnosu na kontrolnu grupu (bez

statističke značajnosti), a ovo povećanje je bilo značajno u odnosu na ćelije tretirane doksorubicinom ($p=0,002$) i ćelije kotretirane sa UDCA ($p<0,001$). Dodatno, kotretman sa 12-MKC je značajno povećao ekspresiju *GR* u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom ($p=0,015$).



Grafikon 4.4.3. Rezultati ekspresije mRNA za CAT u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. D, ^ $p<0,05$ vs. DU, \vee $p<0,05$ vs. DC, \times $p<0,05$ vs. DM.



Grafikon 4.4.4. Rezultati ekspresije mRNA za GR u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili kotretmana doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. D, ^ $p<0,05$ vs. DU, \vee $p<0,05$ vs. DC, \times $p<0,05$ vs. DM.

Komparativna ekspresija *NRF2*, *SOD*, *CAT* i *GR* izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i ćelije tretirane samo doksorubicinom prikazana je u tabeli 4.4.2 i grafikonu 4.4.5.

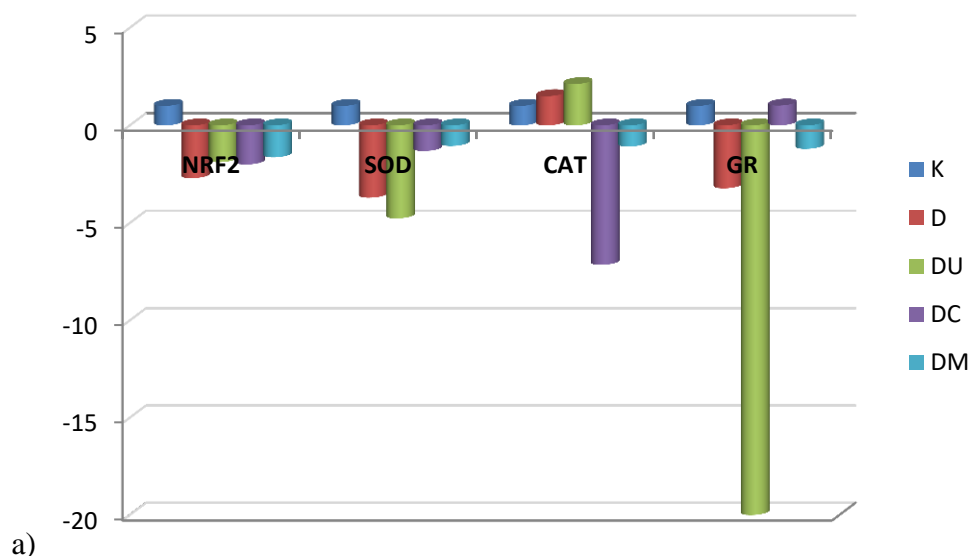
Tabela 4.4.2. Promene ekspresije *NRF2*, *SOD*, *CAT* i *GR* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon tretmana doksorubicinom ili kotretmana doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena komparativnim Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom.

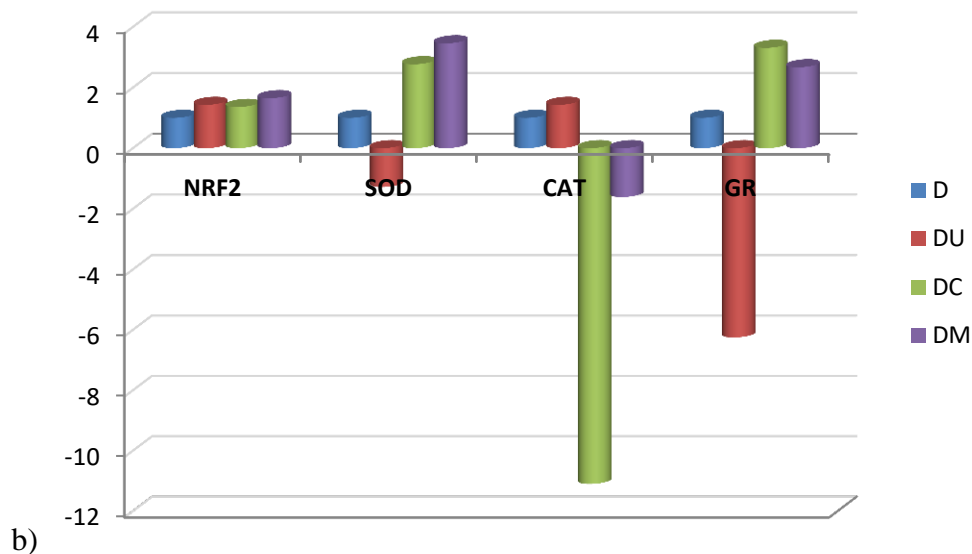
Grupa	<i>NRF2</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	-2,74±0,57	1
DU	-1,94±0,42	1,43±0,31
DC	-2,17±0,86	1,36±0,54
DM	-1,74±0,59	1,65±0,56

Grupa	<i>SOD</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	-3,68±0,78	1
DU	-4,78±1,03	-1,31±0,28
DC	-1,42±0,56	2,77±1,10
DM	-1,11±0,37	3,46±1,17

Grupa	<i>CAT</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	1,50±0,34	1
DU	2,12±0,49	1,43±0,33
DC	-7,69±3,09	-11,3±4,58
DM	-1,15±0,39	-1,71±0,57

Grupa	<i>GR</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	-3,26±0,71	1
DU	-19,8±4,30	-6,14±1,33
DC	1,02±0,41	3,31±1,32
DM	-1,28±0,43	2,67±0,90





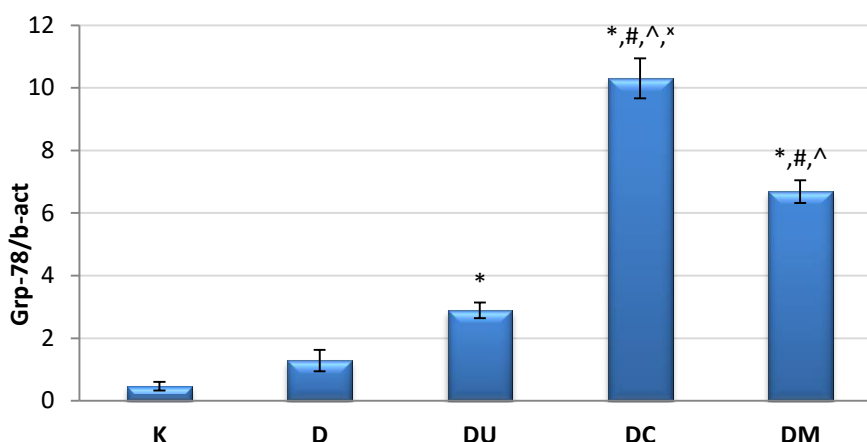
Grafikon 4.4.5. Promene ekspresije *NRF2*, *SOD*, *CAT* i *GR* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon tretmana doksorubicinom ili kotretmana doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom, izraženo komparativnim Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija (a) i grupu ćelija tretiranih doksorubicinom (b).

4.5. Ekspresija *GRP-78* u MCF-7 ćelijskoj liniji tretiranoj doksorubicinom ili doksorubicinom sa žučnim kiselinama

U tabeli 4.5.1 i grafikonu 4.5 prikazana je ekspresija mRNA za *GRP-78*, marker stresa endoplazmatskog retikuluma. Tretman MCF-7 ćelijske linije doksorubicinom je povećao ekspresiju *GRP-78* mRNA, ali bez statističkog značaja u odnosu na kontrolnu grupu. Kotretman sa UDCA, CDCA i 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *GRP-78* u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Primena sve tri žučne kiseline u kombinaciji sa doksorubicinom je značajno povećala ekspresiju *GRP-78* u odnosu na ćelije tretirane samo ovim antitumorskim agensom: UDCA ($p = 0,004$), CDCA ($p < 0,001$) i 12-MKC ($p < 0,001$). Kotretman sa doksorubicinom i CDCA odn. 12-MKC je takođe visoko statistički značajno povećalo ekspresiju *GRP-78* ($p < 0,001$) u odnosu na grupu ćelija kotretiranih sa doksorubicinom i UDCA. Komparativna ekspresija *GRP-78* izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i ćelije tretirane samo doksorubicinom prikazana je u tabeli 4.5.2.

Tabela 4.5.1. Rezultati ekspresije *GRP-78* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, * $p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	<i>GRP-78</i>
K	0,46 \pm 0,13
D	1,28 \pm 0,33
DU	2,89 \pm 0,25*
DC	10,30 \pm 0,64*,#,^,x
DM	6,68 \pm 0,36*,#,^



Grafikon 4.5. Relativna ekspresija mRNA za GRP78 u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, * $p < 0,05$ vs. DM.

Tabela 4.5.2. Promene ekspresije mRNA za *GRP-78* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom.

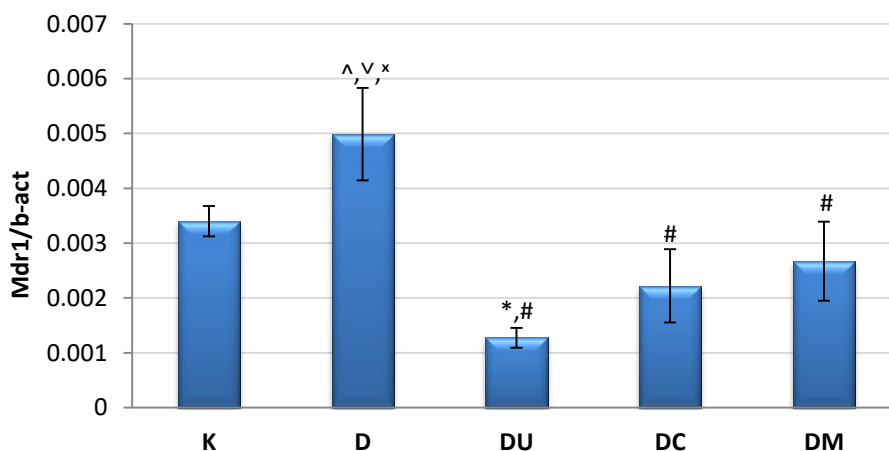
Grupa	<i>GRP-78</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	2,86 \pm 1,00	1
DU	6,42 \pm 1,03	2,31 \pm 0,37
DC	22,89 \pm 2,90	8,24 \pm 1,04
DM	14,85 \pm 1,93	5,35 \pm 0,69

4.6. Ekspresija mRNA transmembranskih transportnih efluks proteina u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom sa ili bez prisustva žučnih kiselina

U tabeli 4.6.1 i grafikonu 4.6.1 prikazana je ekspresija gena koji kodira translaciju p-likoproteina, *MDR1* (*Multi-Drug Resistance Protein-1*), u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon tretmana doksorubicinom odnosno kotretmana doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama. Tretman doksorubicinom je rezultovao u povećanju ekspresije *MDR1*, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu. Do značajnog smanjenja ekspresije *MDR1* mRNA u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom rezultovao je kotretman ćelija doksorubicinom i žučnim kiselinama: UDCA ($p < 0,001$), CDCA ($p = 0,002$) i 12-MKC ($p = 0,006$). Kotretman sa UDCA je značajno smanjio ekspresiju *MDR1* mRNA u odnosu na kontrolnu grupu ćelija ($p = 0,01$).

Tabela 4.6.1. Rezultati ekspresije *MDR1*, *MRP1* i *MRP2* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

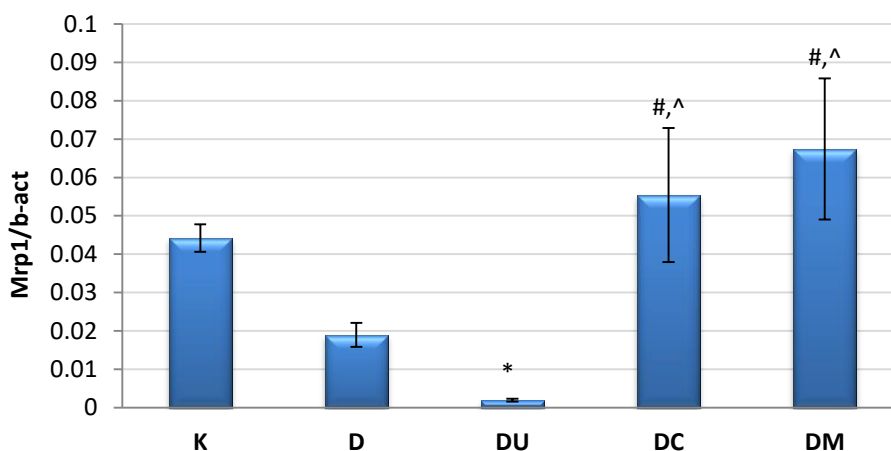
Grupa	MDR1	MRP1	MRP2
K	0,003 \pm 0,0003	0,044 \pm 0,0036	0,037 \pm 0,0026
D	0,005 \pm 0,0008 ^{^, \vee, \times}	0,019 \pm 0,0032	0,019 \pm 0,0035
DU	0,001 \pm 0,0002 ^{*, #}	0,002 \pm 0,0003 [*]	0,037 \pm 0,0065
DC	0,002 \pm 0,0007 [#]	0,055 \pm 0,0175 ^{#, ^}	0,142 \pm 0,0386 ^{*, #, ^}
DM	0,003 \pm 0,0007 [#]	0,067 \pm 0,0184 ^{#, ^}	0,170 \pm 0,0374 ^{*, #, ^}



Grafikon 4.6.1. Relativna ekspresija mRNA za *MDR1* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom.

Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM..

Tretman MCF-7 ćelija doksorubicinom nije značajno smanjio ekspresiju MRP1 (Multi-drug resistance associated protein-1) u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, kombinovani tretman doksorubicinom i UDCA je značajno smanjio ekspresiju mRNA ovog transportnog proteina ($p = 0,008$) (grafikon 4.6.2, tabela 4.6.1). Kotretman ćelija sa CDCA i 12-MKC je statistički značajno povećao ekspresiju MRP1 u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom ($p = 0,021$ za CDCA; $p = 0,003$ za 12-MKC) kao i u grupi ćelija kotretiranih sa UDCA ($p = 0,001$ za CDCA; $p < 0,001$ za 12-MKC). Kotretman ćelija sa doksorubicinom i CDCA odn. 12-MKC je povećao ekspresiju *MRP1*, međutim ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

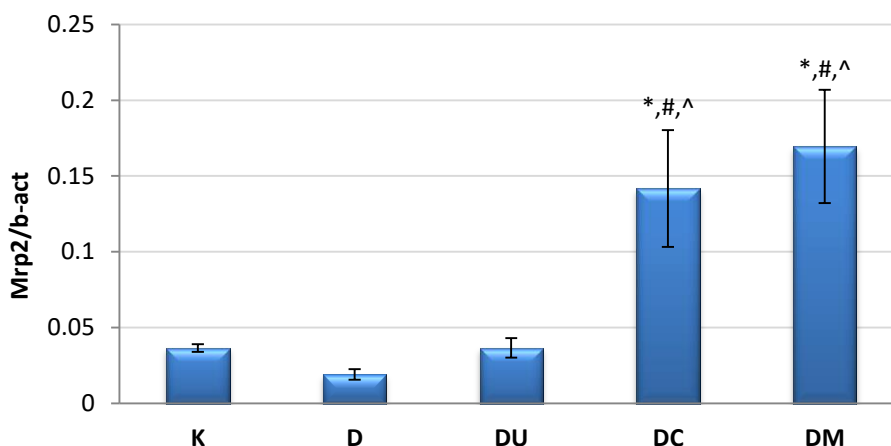


Grafikon 4.6.2. Relativna ekspresija *MRP1* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU.

Inkubacija MCF-7 ćelija u medijumu sa doksorubicinom je rezultovala u smanjenju ekspresije MRP2 (*Multi-drug resistance associated protein-2*) mRNA, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu (**grafikon 4.6.3, tabela 4.6.1**). Kotretman ćelija doksorubicinom i UDCA je doveo do ekspresije MRP2 jednakoj kontrolnoj grupi dok je kotretman sa CDCA i 12-MKC doveo do značajnog povećanja ekspresije MRP2 mRNA. U odnosu na kontrolnu grupu CDCA je značajno povećala ekspresiju MRP2 ($p = 0,002$), u odnosu na ćelije tretirane samo doksorubicinom ($p = 0,001$) i na UDCA-kotretiranu grupu ćelija

($p=0,002$). 12-MKC je u kombinaciji sa doksorubicinom visoko statistički značajno povećala ekspresiju MRP2 u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0,001$), doksorubicinom tretiranu grupu ($p<0,001$) i UDCA-kotretiranu grupu ćelija ($p<0,001$).

Komparativna ekspresija *MDR1*, *MRP1* i *MRP2* izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i ćelije tretirane samo doksorubicinom prikazana je u **tabeli 4.6.2** i **grafikonu 4.6.4**.



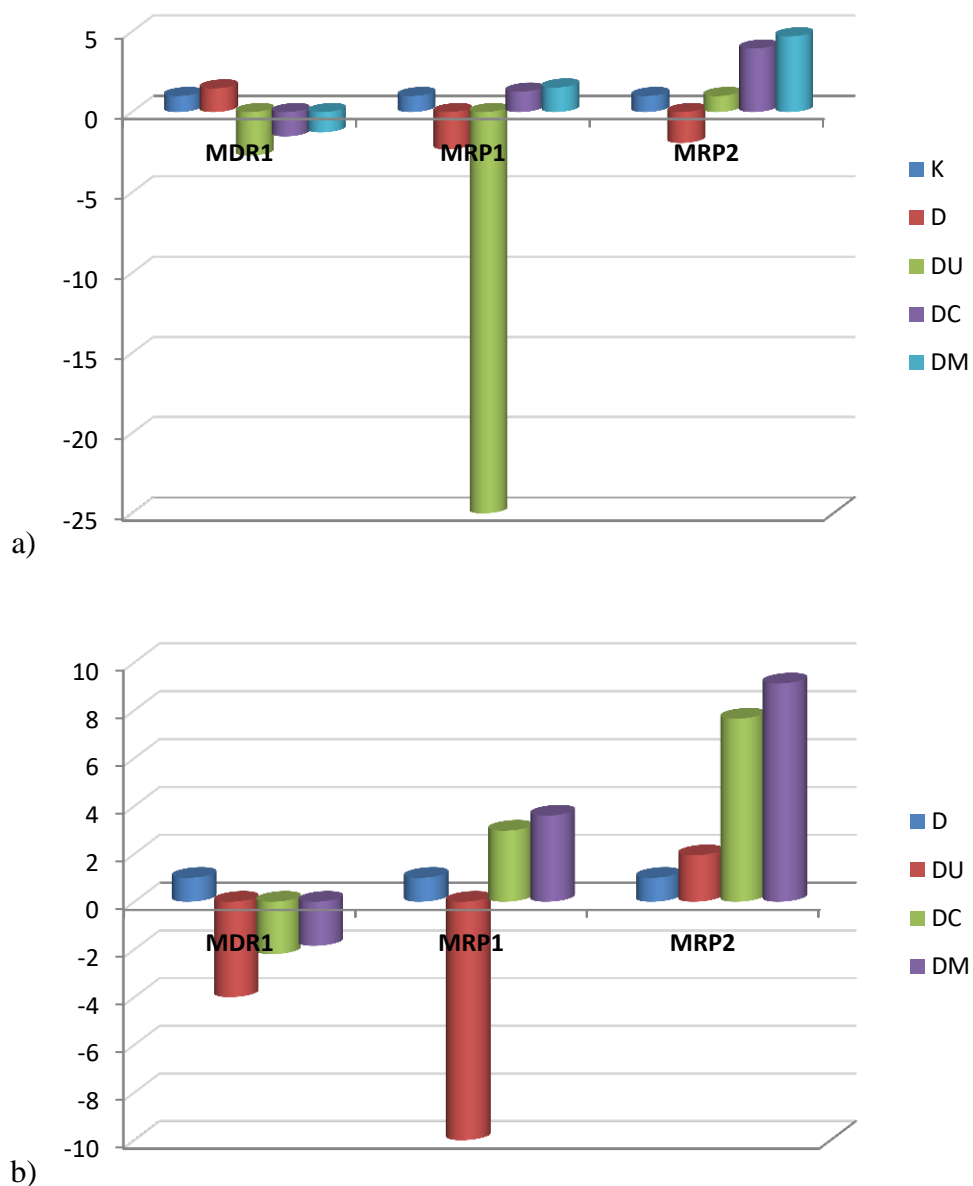
Grafikon 4.6.3. Relativna ekspresija *MRP2* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. D, ^ $p<0,05$ vs. DU.

Tabela 4.6.2. Promene ekspresije *MDR1*, *MRP1* i *MRP2* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena komparativnim Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom.

Grupa	<i>MDR1</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	1,47 \pm 0,31	1
DU	-2,71 \pm 0,59	-3,95 \pm 0,08
DC	-1,63 \pm 0,65	-2,83 \pm 0,95
DM	-1,34 \pm 0,45	-1,95 \pm 0,66

Grupa	<i>MRP1</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	-2,73 \pm 0,50	1
DU	-22,9 \pm 4,97	-9,78 \pm 2,12
DC	1,27 \pm 0,5	2,97 \pm 1,18
DM	1,53 \pm 0,52	3,60 \pm 1,22

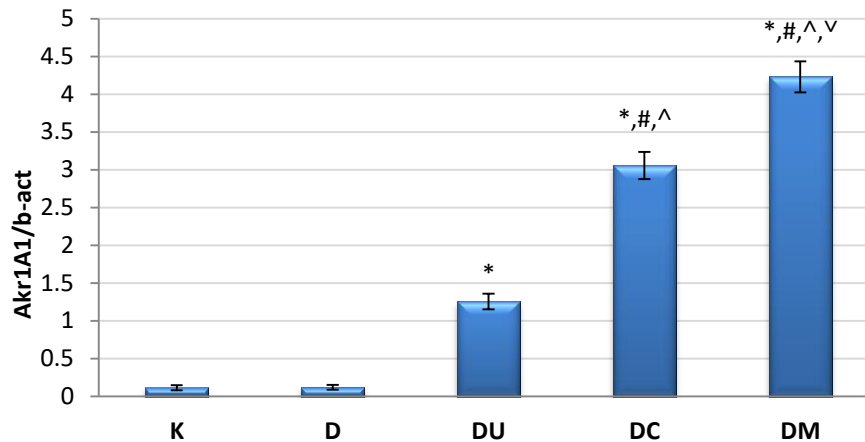
Grupa	MRP2	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	-1,95±0,42	1
DU	1,00±0,21	1,94±0,42
DC	3,95±1,57	7,65±3,04
DM	4,71±1,60	9,12±3,10



Grafikon 4.6.4. Promene ekspresije mRNA za *MDR1*, *MRP1* i *MRP2* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doxorubicinom ili koinkubacije sa doxorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena komparativnim Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija (**a**) i grupu ćelija tretiranih doxorubicinom (**b**).

4.7. Ekspresija gena koji kodiraju sintezu enzima uključenih u metabolizam doksorubicina

Tretman MCF-7 ćelijske linije doksorubicinom nije doveo do statistički značajnih promena ekspresije *AKR1A1* (*Aldo-Keto Reductase Family 1 Member A1*) (**grafikon 4.7.1, tabela 4.7.1**). Kotretman doksorubicinom i UDCA, CDCA ili 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *AKR1A1* mRNA ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Kotretman sa CDCA i 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *AKR1A1* mRNA ($p < 0,001$) u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom i UDCA-kotretiranu grupu ($p < 0,001$), dok je kotretman sa 12-MKC povećao ekspresiju *AKR1A1* u odnosu na UDCA- ($p < 0,001$) i CDCA- kotretirane grupe ($p < 0,001$).

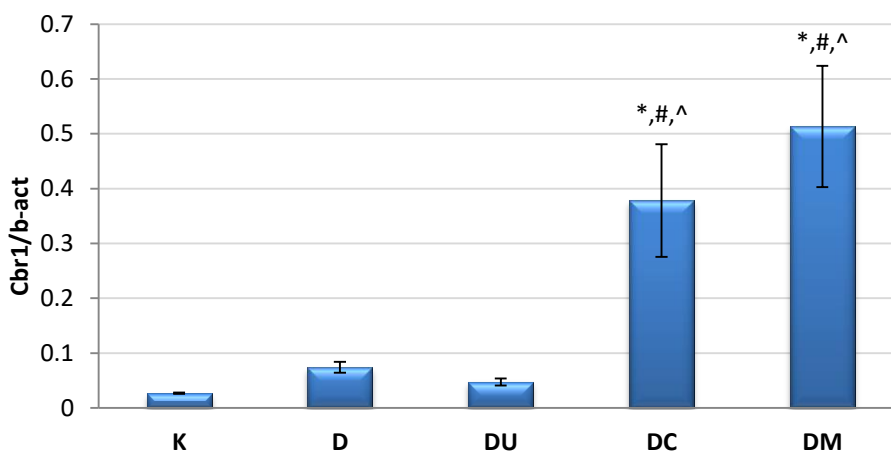


Grafikon 4.7.1. Relativna ekspresija mRNA za *AKR1A1* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplicate su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, v $p < 0,05$ vs. DC.

Tabela 4.7.1. Rezultati ekspresije *AKR1A1* i *CBR1* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplicate su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, v $p < 0,05$ vs. DC.

Grupa	AKR1A1	CBR1
K	0,113 \pm 0,033	0,027 \pm 0,0011
D	0,121 \pm 0,031	0,074 \pm 0,0099
DU	1,257 \pm 0,104*	0,047 \pm 0,0065
DC	3,056 \pm 0,181*,#	0,378 \pm 0,1027*,#,^
DM	4,231 \pm 0,205*,#,^,v	0,514 \pm 0,1105*,#,^

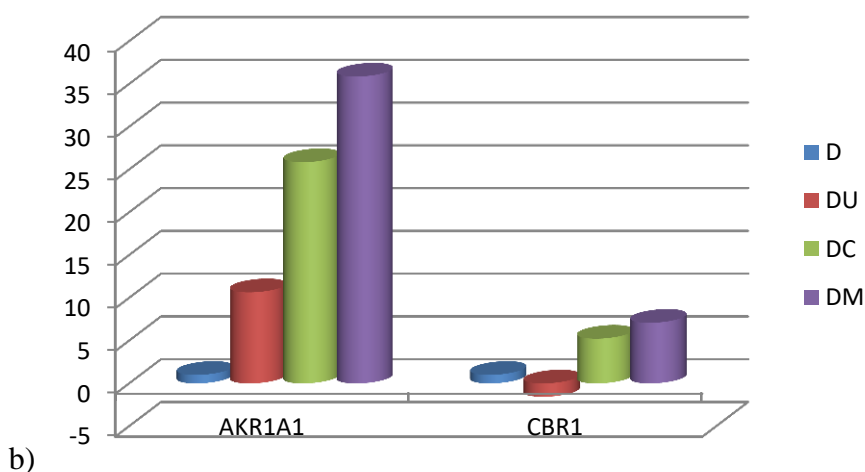
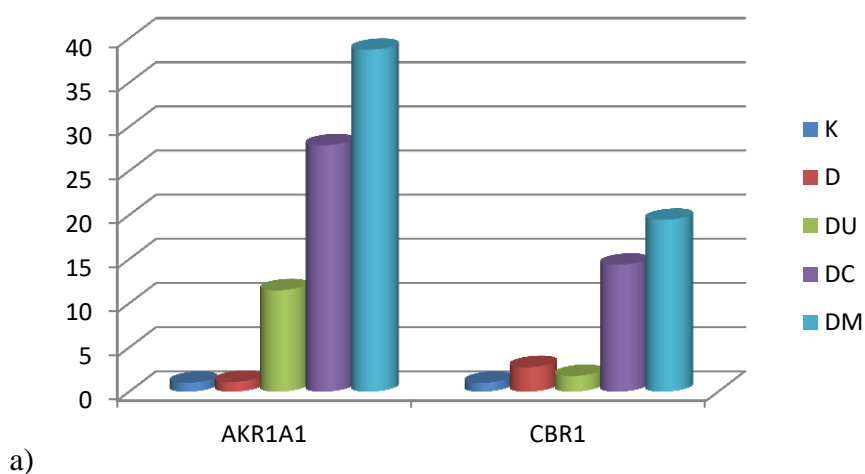
Inkubacija MCF-7 ćelija sa doksorubicinom nije rezultovala u statistički značajnom povećanju ekspresije *CBR1* (*Carbonyl reductase-1*) u odnosu na kontrolnu grupu (**grafikon 4.7.2, tabela 4.7.1**). Kotretman doksorubicinom i UDCA nije značajno promenio ekspresiju *CBR1* u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao ni ćelije tretirane doksorubicinom, dok je kotretman sa CDCA i 12-MKC visoko statistički značajno povećao ekspresiju mRNA za navedeni enzim u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$), značajno povećao ekspresiju *CBR1* u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom ($p = 0,002$ za CDCA i $p < 0,001$ za 12-MKC), ali i UDCA-kotretiranom grupom ćelija ($p < 0,001$ za CDCA i 12-MKC). 12-MKC je povećala ekspresiju *CBR1* u odnosu na CDCA ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno. Komparativna ekspresija *CBR1* izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i ćelije tretirane samo doksorubicinom prikazana je u **tabeli 4.7.2** i **grafikonu 4.7.3**.



Grafikon 4.7.2. Relativna ekspresija mRNA za *CBR1* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU.

Tabela 4.7.2. Promene ekspresije *AKR1A1* i *CBR1* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon tretmana doksorubicinom ili kotretmana doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena komparativnim Ct metodom u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom.

<i>Grupa</i>	<i>AKR1A1</i>		<i>Grupa</i>	<i>CBR1</i>	
	vs. K	vs. D		vs. K	vs. D
K	1	-	K	1	-
D	1,11±0,39	1	D	2,78± ,59	1
DU	11,49±1,83	10,65±1,69	DU	1,78±0,38	-1,57±0,34
DC	27,91±3,58	25,86±3,31	DC	14,38±5,72	5,23±2,08
DM	38,71±5,79	35,87±5,37	DM	19,46±6,63	7,09±2,41



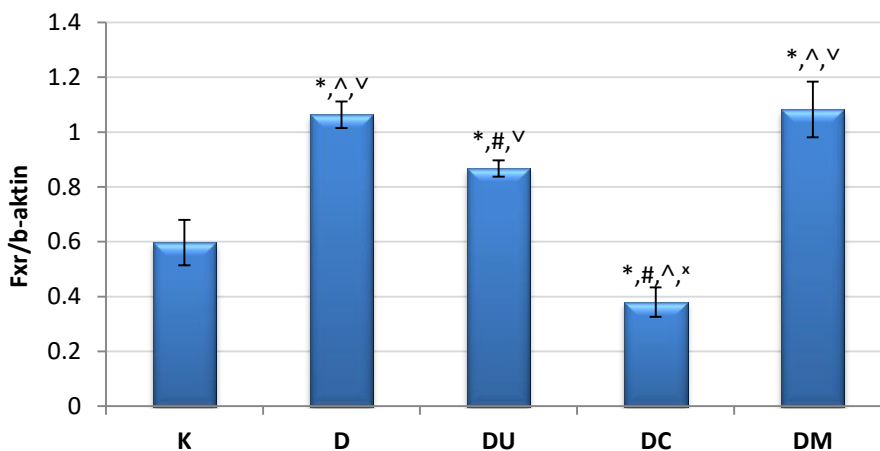
Grafikon 4.7.3. Promene ekspresije mRNA za *AKR1A1* i *CBR1* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon tretmana doksorubicinom ili kotretmana doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena komparativnim Ct metodom u odnosu na kontrolnu grupu ćelija (a) i grupu ćelija tretiranih doksorubicinom (b).

4.8. Ekspresija farnezoid X receptora u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije u medijumu sa doksorubicinom sa/bez dodatka žučnih kiselina

Rezultati ekspresije mRNA nuklearnog receptora FXR prikazani su u **tabeli 4.8.1** i **grafikonu 4.8.1**. Tretman MCF-7 ćelija doksorubicinom, ali i kotretman doksorubicinom i UDCA odn 12-MKC je statistički značajno povećao ekspresiju FXR u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$ za doksorubicin; $p = 0,005$ za UDCA i $p < 0,001$ za 12-MKC), dok je kotretman sa CDCA značajno smanjio ekspresiju FXR ($p = 0,019$). U odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom, kotretman sa UDCA u CDCA je značajno smanjio ekspresiju FXR ($p = 0,034$, $p < 0,001$). Kotretman sa 12-MKC je značajno povećao ekspresiju FXR u odnosu na kotretman sa UDCA ($p = 0,020$) i CDCA ($p < 0,001$). Komparativna ekspresija FXR izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i ćelije tretirane samo doksorubicinom prikazana je u **tabeli 4.8.2**.

Tabela 4.8.1. Rezultati ekspresije FXR i SHP u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	FXR	SHP
K	0,59 \pm 0,08	0,48 \pm 0,070
D	1,06 \pm 0,04 ^{*,^,\vee}	0,43 \pm 0,009
DU	0,87 \pm 0,03 ^{*,#\vee}	0,13 \pm 0,006 ^{*,#\vee,x}
DC	0,38 \pm 0,05 ^{*,#\wedge,x}	0,64 \pm 0,094 ^{*,^}
DM	1,08 \pm 0,10 ^{*,^,\vee}	0,76 \pm 0,063 ^{*,#\wedge}



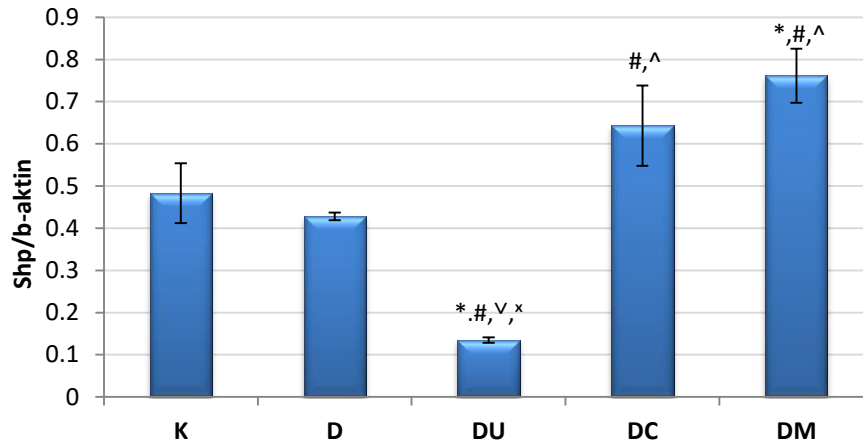
Grafikon 4.8.1. Relativna ekspresija mRNA za FXR u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom.

Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Tabela 4.8.2. Promene ekspresije *FXR* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom.

<i>Grupa</i>	<i>FXR</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	1,84 \pm 0,62	1
DU	1,50 \pm 0,46	-1,25 \pm 0,38
DC	-1,66 \pm 0,75	-2,97 \pm 1,35
DM	1,89 \pm 0,75	1,06 \pm 0,41

Promene ekspresije mRNA transkripcionog faktora *SHP* (*Small Heterodimer Partner*) su zabeležene u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon kotretmana sa doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama (**tabela 4.8.1**, **grafikon 4.8.2**). Tretman ćelija doksorubicinom nije rezultovao u značajnim promenama ekspresije *SHP* u odnosu na kontrolnu grupu. Kotretman sa UDCA je visoko statistički značajno smanjio ekspresiju *SHP* u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$), grupu ćelija tretiranih doksorubicinom ($p = 0,001$) i u odnosu na obe grupe ćelija kotetiranih doksorubicinom i CDCA ($p < 0,001$) odn. 12-MKC ($p < 0,001$). Nasuprot UDCA, kotretman sa CDCA je značajno povećao ekspresiju *SHP* u odnosu na ćelije tretirane samo doksorubicinom ($p = 0,01$) dok je kotretman sa 12-MKC značajno povećao ekspresiju *SHP* u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,002$), grupu tretiranu doksorubicinom ($p < 0,001$) i grupu tretiranu doksorubicinom i UDCA ($p < 0,001$). Komparativna ekspresija *SHP* izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i ćelije tretirane samo doksorubicinom prikazana je u **tabeli 4.8.3**.



Grafikon 4.8.2. Relativna ekspresija mRNA za SHP u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, v $p < 0,05$ vs. DC, x $p < 0,05$ vs. DM.

Tabela 4.8.3. Promene ekspresije *SHP* u MCF-7 ćelijskoj liniji nakon inkubacije sa doksorubicinom ili koinkubacije sa doksorubicinom i odgovarajućom žučnom kiselinom. Promena ekspresije je izražena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom.

Grupa	<i>SHP</i>	
	vs. K	vs. D
K	1	-
D	-1,14 \pm 0,35	1
DU	-3,63 \pm 1,10	-3,24 \pm 0,98
DC	1,40 \pm 0,63	1,57 \pm 0,71
DM	1,65 \pm 0,67	1,85 \pm 0,75

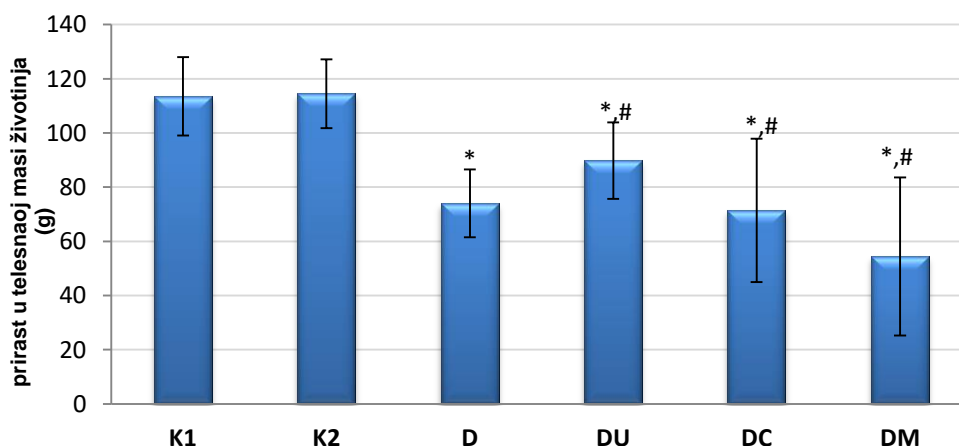
4.9. Promena vrednosti telesne mase životinja

Promene u telesnoj masi životinja praćene su jednom nedeljno od početka tretmana do eutanazije 28. dana. Životinje su tretirane fiziološkim rastvorom i.p. svakog drugog dana u ukupno tri puta (grupa K1), propilen glikolom p.o. i fiziološkim rastvorom i.p. naizmenično tokom šest dana (grupa K2), doksorubicinom (3 mg/kg i.p svakog drugog dana ukupno 3 doze; kumulativna doza 9 mg/kg, grupa D) ili naizmenično doksorubicinom i ekvimolarnim koncentracijama žučnih kiselina (25 mg/kg UDCA, 25 mg/kg CDCA odn. 26 mg/kg 12-MKC) ukupno po tri doze, pri čemu je tretman žučnim kiselinama započet jedan dan pre primene

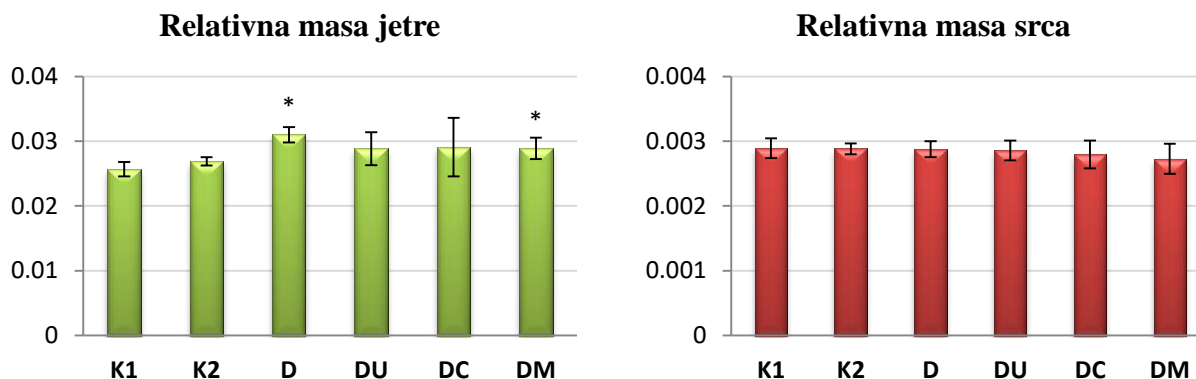
doksorubicina (grupe DU, DC i DM). Tretman je trajao ukupno šest dana nakon čega je sledila pauza od 21 dan i životinje su eutanazirane 28-og dana od početka terapije. U **tabeli 4.9.1** i **grafikonu 4.9.1** je prikazan ukupni prirast u telesnoj masi životinja nakon 28 dana od početka tretmana. Analizom podataka je utvrđeno je da je došlo je do statistički značajnog smanjenja prirasta telesne mase u grupi životinja tretiranih doksorubicinom u odnosu na odgovarajuću negativnu kontrolnu grupu K1 ($p=0,002$) kao i u grupama životinja koje su naizmenično tretirane doksorubicinom i žučnim kiselinama u odnosu na kontrolnu grupu K2: DU ($p=0,04$), DC ($p=0,018$). Prirast u telesnoj masi grupe životinja DM bilo dvostruko manji u odnosu na kontrolnu grupu K2 ($p=0,006$). Između kontrolnih grupa K1 i K2 nije bilo statistički značajnih razlika.

Tabela 4.9.1. Uticaj žučnih kiselina na prirast telesne mase životinja tretiranih doksorubicinom i životinja kotretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama. Rezultat je prikazan kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0.05$ vs. K1; # $p<0.05$ vs. K2.

Grupa	Prosečna telesna masa 0. dan (g)	Prosečna telesna masa 28.dan (g)	Prosečni prirast u telesnoj masi (g)
K1	210,1 \pm 9,2	323,6 \pm 14,0	113,5 \pm 14,5
K2	224,0 \pm 13,3	338,5 \pm 8,3	114,5 \pm 12,7
D	242,0 \pm 13,3	316,0 \pm 10,8	74,0 \pm 12,5*
DU	207,5 \pm 11,9	297,25 \pm 13,4	89,75 \pm 14,1*,#
DC	226,6 \pm 16,5	278,4 \pm 45,9	71,4 \pm 26,5*,#
DM	220,2 \pm 11,8	274,6 \pm 27,1	54,4 \pm 29,1*,#



Grafikon 4.9.1. Uticaj žučnih kiselina na prirast telesne mase životinja tretiranih doksorubicinom i životinja kotretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama. Rezultat je prikazan kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0.05$ vs. K1, # $p<0.05$ vs. K2



Grafikon 4.9.2. Uticaj žučnih kiselina na relativnu masu jetre i srca životinja tretiranih doksorubicinom. * $p < 0.05$ vs. K1.

Osim telesne mase životinja praćene su i promene u masi jetre i srca, kako apsolutne tako i relativne (masa organa / ukupna telesna masa). Nakon 28-dnevnog tretmana primećeno je statistički značajno povećanje mase jetre u grupama D ($p < 0,001$) i DM ($p = 0,007$) u odnosu na grupu K1 (**tabela 4.9.2, grafikon 4.9.2**). Prosečna masa jetri u svim grupama životinja tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama je bila manja u odnosu na grupu D, međutim, ove razlike nisu statistički značajne. Apsolutne i relativne vrednosti mase srca životinja tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama nisu bile statistički značajno snižene u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe i grupu D (**tabela 4.9.2, grafikon 4.9.2**)

Tabela 4.9.2. Uticaj tretmana žučnim kiselinama na masu jetre i srca životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultat je prikazan kao aritmetička sredina ± SD. * $p < 0.05$ vs. K1.

Grupa	Masa jetre		Masa srca	
	apsolutna (g)	relativna (%)	apsolutna (g)	relativna (%)
K1	8,30 ± 0,26	0,025 ± 0,0012	0,94 ± 0,05	0,0029 ± 0,0001
K2	9,46 ± 0,32	0,027 ± 0,0006	1,05 ± 0,12	0,0030 ± 0,00008
D	9,81 ± 0,61	0,031 ± 0,0011*	0,91 ± 0,06	0,0029 ± 0,0001
DU	8,58 ± 0,99	0,028 ± 0,0025	0,85 ± 0,11	0,0029 ± 0,0001
DC	7,94 ± 0,55	0,029 ± 0,0045	0,77 ± 0,11	0,0028 ± 0,0002
DM	7,92 ± 0,69	0,028 ± 0,0016*	0,75 ± 0,10	0,0027 ± 0,0002

4.10. Uticaj žučnih kiselina na vrednosti serumskih biohemijskih parametara kod životinja tretiranih doksorubicinom

Serumski biohemijski markeri oštećenja hepatocita i kardiomiocita: alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), kreatin fosfokinaza (CK-NAC) i srčani izoenzim CK (CK-MB) određeni su u serumima životinja. Između kontrolne grupe životinja tretiranih samo fiziološkim rastvorom (grupa K1) i životinja tretiranih kombinacijom propilen glikola i fiziološkog rastvora (grupa K2) nisu postojale statistički značajne razlike u vrednostima svih ispitivanih serumskih biohemijskih parametara oštećenja hepatocita i kardiomiocita, čime se potvrdila farmakološka indiferentnost propilen glikola kao rastvarača za odabrane žučne kiseline u odnosu na ispitivane markere.

Tretman doksorubicinom je doveo do statistički značajnog smanjenja vrednosti AST kako u grupi D ($p < 0,001$ u odnosu na K1; $p = 0,003$ u odnosu na K2) tako i u svim grupama tretiranim doksorubicinom i žučnim kiselinama: DU ($p = 0,023$ u odnosu na K1; $p = 0,028$ u odnosu na K2), DC ($p < 0,001$ u odnosu na K1; $p = 0,007$ u odnosu na K2) i DM ($p < 0,001$ u odnosu na K1; $p = 0,007$ u odnosu na K2) (**tabela 4.10, grafikon 4.10a**).

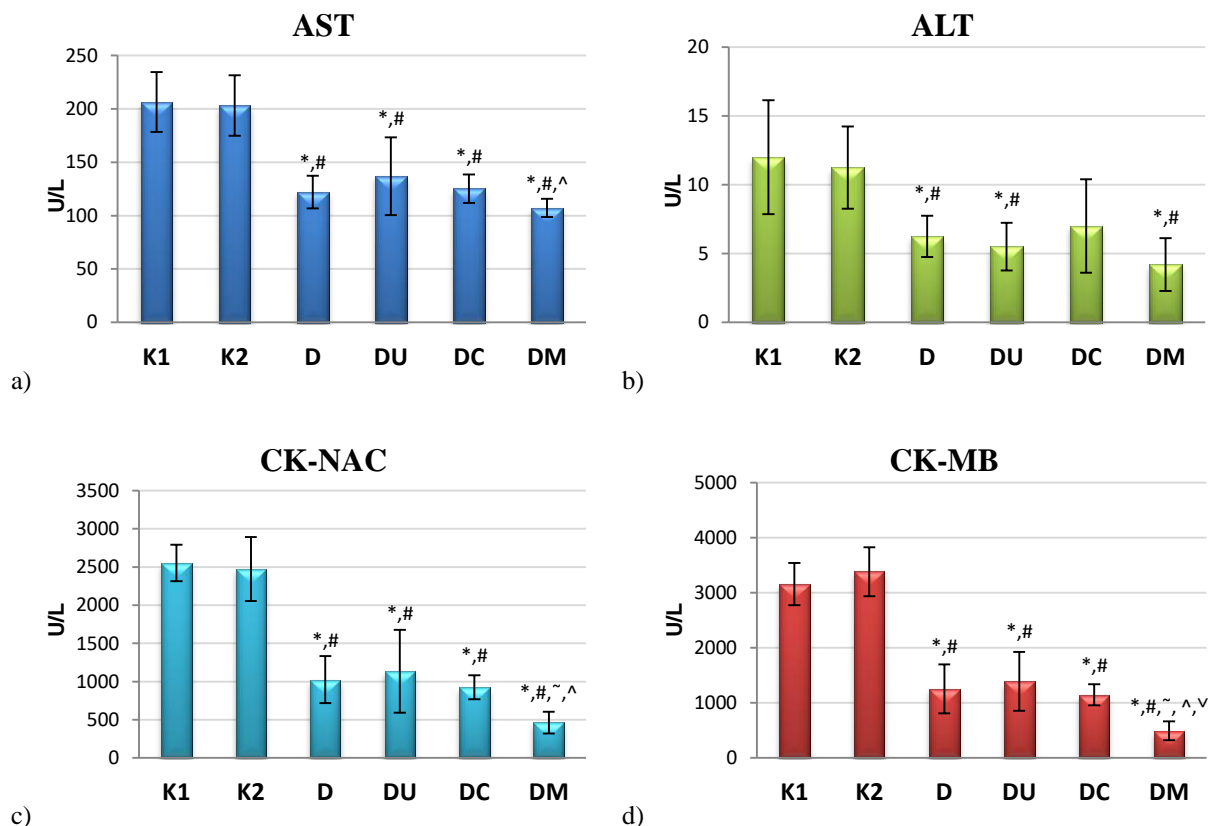
Vrednosti ALT su bile statistički značajno snižene u grupi D u odnosu na obe kontrolne grupe ($p = 0,017$ u odnosu na K1; $p = 0,04$ u odnosu na K2). Vrednosti ALT su takođe bile statistički značajno niže i u grupama životinja koje su tretirane doksorubicinom i žučnim kiselinama pri čemu je statistički značajno sniženje postojalo u grupama DU ($p = 0,011$ u odnosu na K1; $p = 0,02$ u odnosu na K2) i DM ($p = 0,004$ u odnosu na grupu K1; $p = 0,009$ u odnosu na grupu K2) (**tabela 4.10, grafikon 4.10b**).

Vrednosti CK-NAC su bile statistički značajno niže u svim grupama u odnosu na obe negativne kontrolne grupe: u grupi D ($p < 0,001$ u odnosu na K1; $p = 0,001$ u odnosu na K2) i u svim grupama tretiranim doksorubicinom i žučnim kiselinama: grupi DU ($p = 0,008$ u odnosu na K1; $p = 0,008$ u odnosu na K2), grupi DC ($p < 0,001$ u odnosu na grupu K1; $p = 0,002$ u odnosu na K2) i u grupi DM ($p < 0,001$ u odnosu na K1; $p < 0,001$ u odnosu na K2). Takođe vrednosti CK-NAC u grupi DM su bile statistički značajno niže u odnosu na grupu D ($p = 0,02$) i grupu DC ($p = 0,001$) (**tabela 4.10, grafikon 4.10c**).

Vrednosti kardiospecifičnog CK izoenzima, CK-MB, su takođe bile snižene u svim grupama u odnosu na kontrolne: u grupi D ($p < 0,001$ u odnosu na K1; $p = 0,003$ u odnosu na K2), grupi DU ($p = 0,002$ u odnosu na K1; $p = 0,003$ u odnosu na K2), u grupi DC ($p < 0,001$ u odnosu na K1 i $p = 0,01$ u odnosu na K2) i u grupi DM ($p < 0,001$ u odnosu na K1; $p = 0,008$ u odnosu na K2). U grupi DM su vrednosti CK-MB bile statistički značajno niže u odnosu na grupe: D ($p = 0,03$), DU ($p = 0,03$) i DC ($p < 0,001$) (tabela 4.10, grafikon 4.10d).

Tabela 4.10. Uticaj žučnih kiselina na vrednosti serumskih biohemijskih parametara kod životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0.05$ vs. K1; # $p < 0.05$ vs.K2; ~ $p < 0.05$ vs.D; ^ $p < 0.05$ vs.DC; \vee $p < 0.05$ vs.DU.

Grupa	AST (U/L)	ALT (U/L)	CK-NAC (U/L)	CK-MB (U/L)
K1	206,5 \pm 27,9	12,0 \pm 4,1	2551,3 \pm 239,2	3159,5 \pm 383,7
K2	203,2 \pm 28,3	11,2 \pm 2,9	2472,8 \pm 418,6	3380,0 \pm 445,6
D	122,0 \pm 15,3 ^{*,#}	6,2 \pm 1,5 ^{*,#}	1024,8 \pm 542,7 ^{*,#}	1252,3 \pm 444,2 ^{*,#}
DU	137,0 \pm 36,4 ^{*,#}	5,5 \pm 1,7 ^{*,#}	1132,8 \pm 542,7 ^{*,#}	1391,6 \pm 535,1 ^{*,#}
DC	125,2 \pm 13,3 ^{*,#}	7,0 \pm 3,3	924,4 \pm 156,3 ^{*,#}	1144,8 \pm 191,2 ^{*,#}
DM	107,2 \pm 8,4 ^{*,#,^}	4,2 \pm 1,9 ^{*,#}	462,6 \pm 141,8 ^{*,#,~,^}	490,9 \pm 172,5 ^{*,#,~,^,\vee}



Grafikon 4.10. Uticaj žučnih kiselina na vrednosti serumskih biohemijskih parametara kod životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K1; # $p < 0,05$ vs. K2; ~ $p < 0,05$ vs. D; $\vee p < 0,05$ vs. DU, ^ $p < 0,05$ vs. DC.

4.11. Uticaj žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u srčanom tkivu i tkivu jetre životinja tretiranih doksorubicinom

Tretman doksorubicinom je doveo do povećanja koncentracije malondialdehida (MDA) u srčanom tkivu, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolne grupe. Koncentracija MDA nakon tretmana doksorubicinom i CDCA (grupa DC) je bila gotovo na nivou obe kontrolne grupe. Međutim, kotretman doksorubicinom i 12-MKC (grupa DM) je doveo do statistički značajnog povećanja koncentracije MDA u srčanom tkivu u odnosu na grupe K1 ($p=0,014$) i DC ($p=0,019$) (**tabela 4.11**).

Koncentracija MDA u tkivu jetre nakon tretmana doksorubicinom nije bila statistički značajno povećana u odnosu na kontrolne grupe. Kotretman doksorubicinom i žučnim

kiselinama je snizio vrednosti MDA u jetri u odnosu na grupu životinja tretiranih samo doksorubicinom, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno (**tabela 4.11**).

Tabela 4.11. Intenzitet lipidne peroksidacije u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom sa ili bez kotretmana žučnim kiselinama. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K1, $\sim p < 0,05$ vs. D.

Grupa	MDA srce (nmol/mg proteina)	MDA jetra (nmol/mg proteina)
K1	0,456 \pm 0,061	0,004 \pm 0,003
K2	0,455 \pm 0,095	0,005 \pm 0,003
D	0,711 \pm 0,235	0,047 \pm 0,031
DU	0,519 \pm 0,072	0,007 \pm 0,001
DC	0,452 \pm 0,092	0,008 \pm 0,003
DM	0,651 \pm 0,095 ^{*, ~}	0,009 \pm 0,008

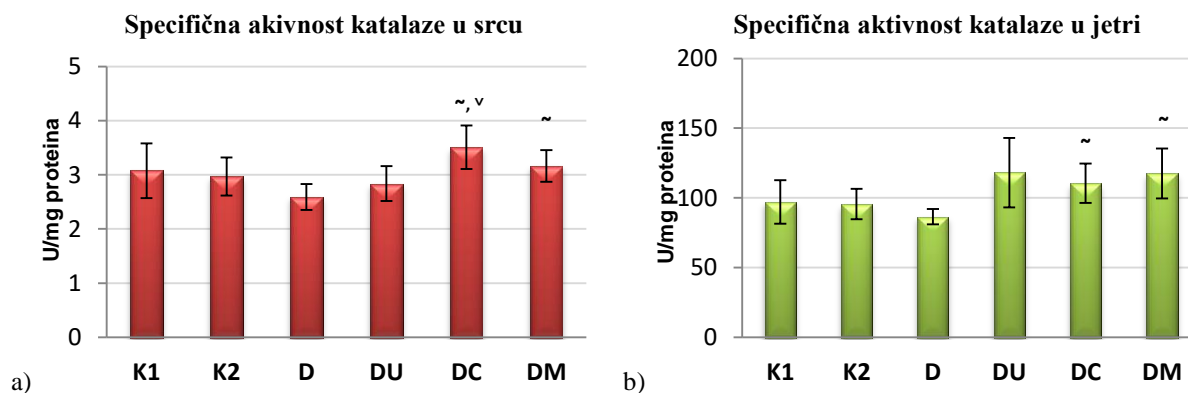
4.12. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom

Specifična aktivnost katalaze (CAT) u srcu životinja tretiranih doksorubicinom (grupa D) je bila snižena u odnosu na vrednosti u kontrolnim grupama, ali statistička značajnost nije zabeležena. U svim grupama životinja tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama je došlo do povećanja specifične aktivnosti ovog antioksidativnog enzima u odnosu na grupu D, a statistička značajnost je zabeležena u grupama DC ($p=0,003$ vs. D i $p=0,026$ vs. DU) i grupi DM ($p=0,014$ vs. D) (**tabela 4.12.1, grafikon 4.12.1a**).

Tretman doksorubicinom je takođe doveo do sniženja specifične aktivnosti katalaze u jetri u odnosu na kontrolne grupe, ali bez statističke značajnosti. U svim grupama životinja tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama je došlo do povećanja aktivnosti katalaze pri čemu statistički značajno povećanje u odnosu na grupu D je zabeleženo u grupama DC ($p=0,017$) i DM ($p=0,014$) (**tabela 4.12.1, grafikon 4.12.1b**).

Tabela 4.12.1. Uticaj žučnih kiselina na specifičnu aktivnost katalaze (CAT) u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. \sim $p < 0,05$ vs. D, \vee $p < 0,05$ vs. DU.

Grupa	CAT srce (U/mg proteina)	CAT jetra (U/mg proteina)
K1	3,077 \pm 0,50	97,113 \pm 15,60
K2	2,970 \pm 0,35	95,584 \pm 10,87
D	2,592 \pm 0,24	86,523 \pm 5,41
DU	2,837 \pm 0,32	118,094 \pm 24,89
DC	3,511 \pm 0,40 \sim , \vee	110,435 \pm 14,13 \sim
DM	3,162 \pm 0,29 \sim	117,524 \pm 17,93 \sim



Grafikon 4.12.1. Uticaj žučnih kiselina na specifičnu aktivnost katalaze u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. \sim $p < 0,05$ vs. D, \vee $p < 0,05$ vs. DU.

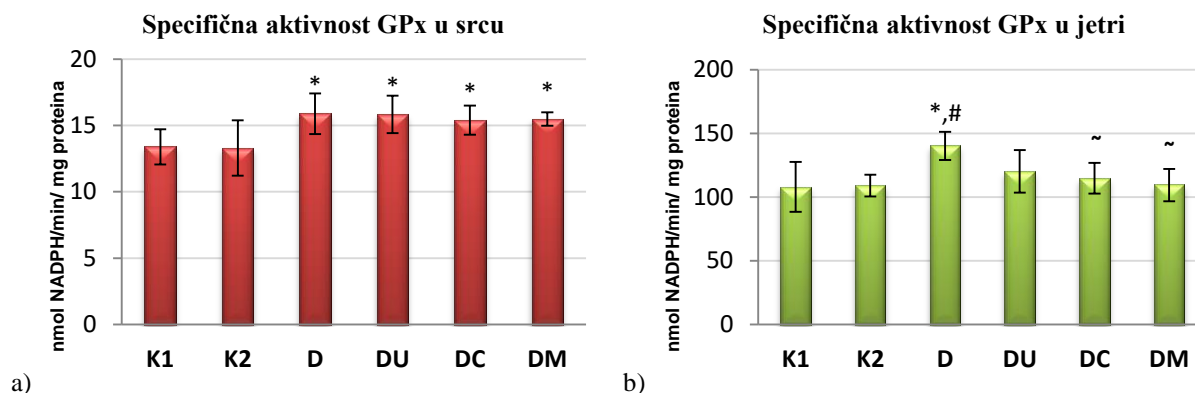
Specifična aktivnost glutacion peroksidaze (GPx) u srcu nakon tretmana doksorubicinom je bila statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu K1 ($p=0,036$). Takođe, u svim grupama životinja tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama aktivnost GPx je bila statistički značajno viša u odnosu na grupu K1 ($p=0,033$ za UDCA, $p=0,022$ za CDCA, $p=0,009$ za 12-MKC), međutim, kotretman sa žučnim kiselinama nije značajno snizio aktivnost ovog enzima u odnosu na grupu D (**tabela 4.12.2, grafikon 4.12.2a**).

Tretman doksorubicinom je rezultovao u statistički značajnom povećanju aktivnosti GPx u jetri u odnosu na obe kontrolne grupe, K1 ($p=0,01$) i K2 ($p=0,004$). Tretman doksorubicinom i žučnim kiselinama je doveo do sniženja aktivnosti GPx u odnosu na grupu D, a statistički

značajno sniženje je zabeleženo u grupama DC ($p=0,013$) i DM ($p=0,006$) (**tabela 4.12.2, grafikon 4.12.2b**).

Tabela 4.12.2. Uticaj žučnih kiselina na specifičnu aktivnost glutacion peroksidaze u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K1, # $p<0,05$ vs. K2, ~ $p<0,05$ vs. D.

Grupa	GPx srce (mmol NADPH/min/mg proteina)	GPx jetra (mmol NADPH/min/mg proteina)
K1	13,391 \pm 1,322	107,972 \pm 19,567
K2	12,295 \pm 2,080	109,073 \pm 8,527
D	15,889 \pm 1,527*	140,262 \pm 11,107*,#
DU	15,837 \pm 1,410*	120,283 \pm 16,690
DC	15,395 \pm 1,089*	114,739 \pm 12,068 ~
DM	15,481 \pm 0,502*	109,549 \pm 12,664 ~



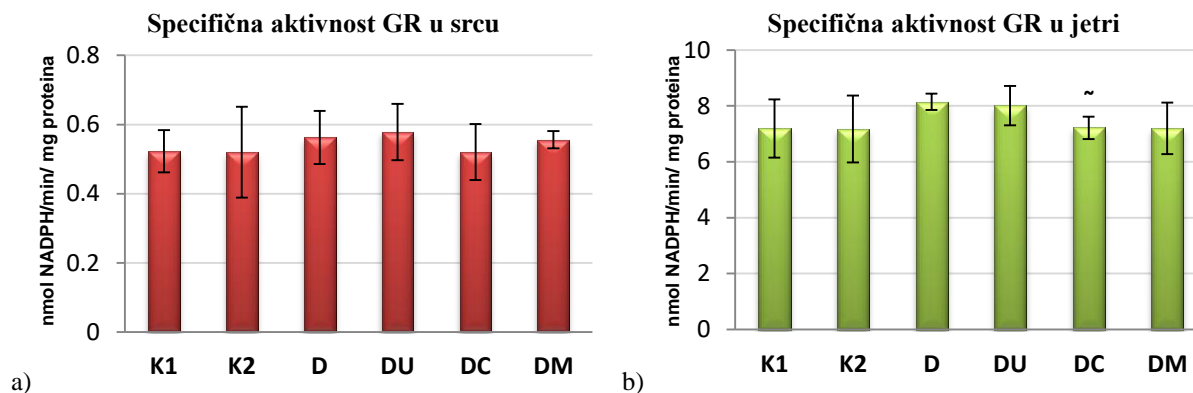
Grafikon 4.12.2. Uticaj žučnih kiselina na specifičnu aktivnost glutacion peroksidaze u srcu (**a**) i jetri (**b**) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K1, # $p<0,05$ vs. K2, ~ $p<0,05$ vs. D.

Specifična aktivnost glutacion reduktaze (GR) u srcu u grupi životinja tretiranih doksorubicinom je bila povećana u odnosu na kontrolne grupe, ali bez statističke značajnosti. Kotretman doksorubicinom i UDCA (DU) kao i doksorubicinom i 12-MKC (DM) je doveo do povećanja aktivnosti ovog enzima, međutim, statistička značajnost nije zabeležena. Vrednost GR u grupi životinja tretiranih doksorubicinom i CDCA (DC) nije bila promenjena u odnosu na kontrolne grupe (**tabela 4.12.3, grafikon 4.12.3a**).

U jetri ispitivanih životinja tretman doksorubicinom kao i kotretman doksorubicinom i UDCA (DU) je rezultovao u povećanju aktivnosti GR u odnosu na kontrolne grupe, međutim ovo povećanje nije bilo statistički značajno. U grupama životinja tretiranih doksorubicinom i 12-MKC (DM) kao i doksorubicinom i CDCA (DC) je aktivnost GR bila bliska aktivnosti GR u kontrolnim grupama, međutim jedino u grupi DC je došlo do statistički značajnog sniženja u odnosu na grupu D ($p=0,05$) (tabela 4.12.3, grafikon 4.12.3b).

Tabela 4.12.3. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost glutacion reduktaze u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. $\sim p<0,05$ vs. D.

Grupa	GR srce (nmol NADPH/min/mg proteina)	GPx jetra (nmol NADPH/min/mg proteina)
K1	0,523 \pm 0,061	7,192 \pm 1,044
K2	0,520 \pm 0,131	7,175 \pm 1,200
D	0,563 \pm 0,076	8,148 \pm 0,295
DU	0,578 \pm 0,078	8,009 \pm 0,705
DC	0,520 \pm 0,081	7,218 \pm 0,401 \sim
DM	0,556 \pm 0,025	7,197 \pm 0,924



Grafikon 4.12.3. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost glutacion reduktaze u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. $\sim p<0,05$ vs. D.

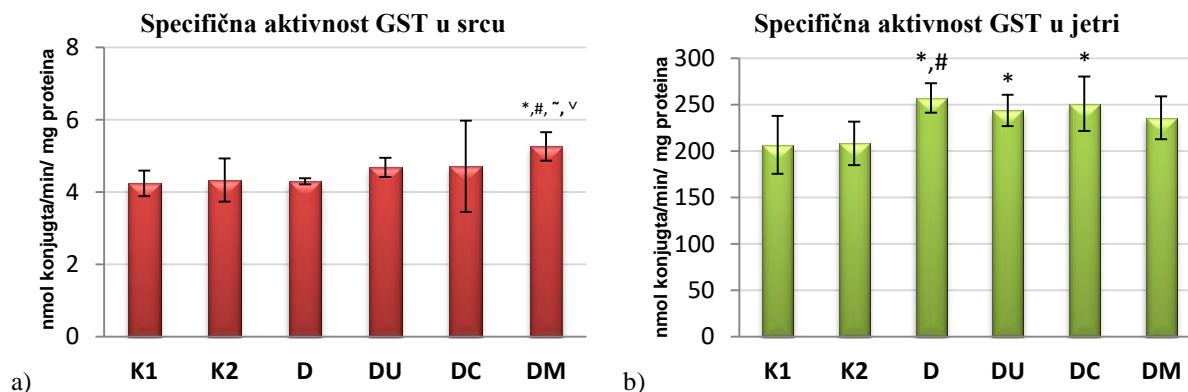
Primena doksorubicina nije dovela do statistički značajnog povećanja specifične aktivnosti glutation-S-transferaze (GST) u srcu u odnosu na kontrolne grupe. Kotretman doksorubicinom i žučnim kiselinama je doveo do povećane aktivnosti ovog enzima u srcu tretiranih životinja pri čemu je statistički značajno povećanje postojalo samo u grupi DM u

odnosu na sve grupe osim grupe DC (p=0,002 vs. K1; p=0,04 vs. K2; p=0,006 vs. D; p=0,03 vs. DU) (tabela 4.12.4, grafikon 4.12.4a).

U jetri ispitivanih životinja je primena doksorubicina kao i primena doksorubicina sa žučnim kiselinama dovela do povećanja specifične aktivnosti GST. Statistički značajno povećanje aktivnost GST u odnosu na kontrolne grupe je zabeleženo u grupama D (p=0,01 vs. K1, p=0,05 vs. K2), DU (p=0,04 vs. K1) i grupi DC (p=0,03 vs. K1) (tabela 4.12.4, grafikon 4.12.4b).

Tabela 4.12.4. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost glutation-S-transferaze u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. *p<0,05 vs. K1, #p<0,05 vs. K2, ~p<0,05 vs. D, √p<0,05 vs. DU.

Grupa	GST srce (nmol konjugata/min/mg proteina)	GST jetra (nmol konjugata/min/mg proteina)
K1	4,244 ± 0,355	206,621 ± 31,323
K2	4,332 ± 0,598	208,180 ± 23,469
D	4,299 ± 0,088	257,009 ± 15,844 ^{*,#}
DU	4,680 ± 0,265	243,688 ± 16,969 [*]
DC	4,715 ± 1,258	250,896 ± 29,339 [*]
DM	5,262 ± 0,393 ^{*,#,~,√}	235,705 ± 23,140



Grafikon 4.12.4. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost glutation-S-transferaze u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. * p<0,05 vs. K1; # p<0,05 vs. K2; ~ p<0,05 vs. D; √ p<0,05 vs. DU.

4.13. Uticaj žučnih kiselina na ekspresiju gena u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom

U analizi genske ekspresije korišćeni su uzorci tkiva srca i jetre životinja nakon izolacije RNA i sinteze cDNA. Životinje su tretirane fiziološkim rastvorom i.p. svakog drugog dana ukupno tri puta (grupa K), doksorubicinom 3 mg/kg i.p. svakog drugog dana ukupno 3 puta (grupa D) ili naizmeničnim tretmanom doksorubicinom i ekvimolarnim koncentracijama žučnih kiselina (25 mg/kg UDCA, 25 mg/kg CDCA odn. 26 mg/kg 12-MKC) pri čemu je primena žučnih kiselina p.o. započeta jedan dan pre primene doksorubicina (grupe DU, DC i DM). Tretman je ukupno trajao šest dana sa pauzom u trajanju od 21 dan. 28-og dana od početka tretmana životinje su eutanazirane. Analiza genske ekspresije je određena preko ekspresije mRNA za ispitivane proteine.

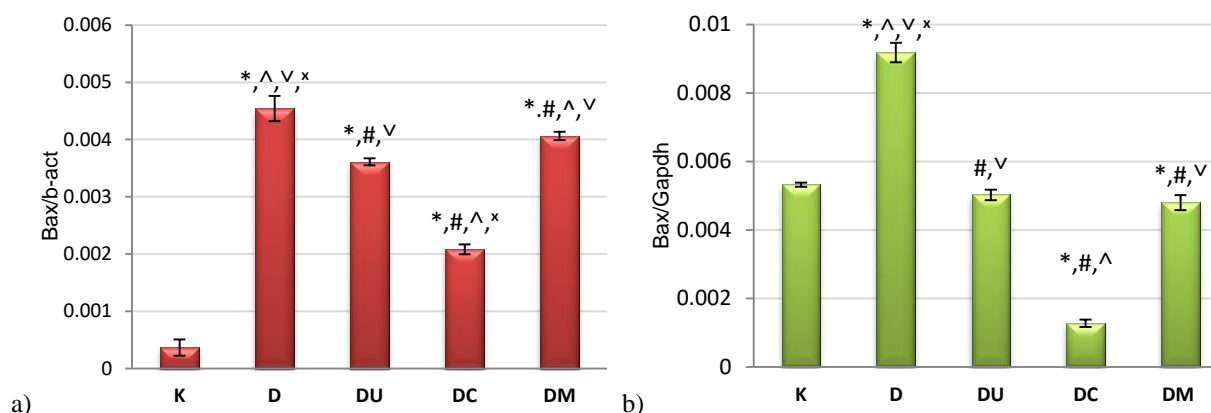
4.13.1. Analiza relativne ekspresije gena regulatora apoptoze

Ekspresija mRNA proapoptotskog Bax proteina u srcu životinja tretiranih doksorubicinom (D) bila je visoko statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu K ($p < 0,001$). Takođe, kotretman doksorubicinom i svim žučnim kiselinama je visoko statistički značajno uvećao ekspresiju Bax u odnosu na grupu K ($p < 0,001$). Međutim, kotretman žučnim kiselinama je značajno umanjio ekspresiju Bax u odnosu na grupu D ($p < 0,001$ vs. DU, $p < 0,001$ vs. DC, $p = 0,009$ vs. DM). Kotretman sa CDCA je visoko statistički značajno smanjio ekspresiju Bax u odnosu na kotretman sa UDCA i 12-MKC ($p < 0,001$) (**tabela 4.13.1.1, grafikon 4.13.1.1a**).

Takođe, u tkivu jetre tretman doksorubicinom je visoko statistički značajno povećao ekspresiju Bax u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe ($p < 0,001$), dok je kotretman sa žučnim kiselinama UDCA, CDCA odn. 12-MKC visoko statistički značajno smanjio ekspresiju Bax u odnosu na grupu životinja tretiranih doksorubicinom ($p < 0,001$). Kotretman sa CDCA i 12-MKC je značajno smanjio ekspresiju Bax u odnosu na kontrolnu grupu K ($p < 0,001$ vs. DC, $p = 0,034$ vs. DM). Kotretman životinja sa CDCA je visoko statistički značajno smanjio ekspresiju Bax u odnosu na kotretman sa UDCA i 12-MKC ($p < 0,001$) (**tabela 4.13.1.1, grafikon 4.13.1.1b**).

Tabela 4.13.1.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Bax* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. D, ^p<0,05 vs. DU, √p<0,05 vs. DC, ×p<0,05 vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Bax</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Bax</i> u jetri
K	0,0003 ± 0,0001	0,0053 ± 5,83E-05
D	0,004 ± 0,0002 ^{*,^,√,×}	0,0092 ± 0,0002 ^{*,^,√,×}
DU	0,003 ± 6,28E-5 ^{*,#,√}	0,0050 ± 0,0001 ^{#,√}
DC	0,002 ± 8,66E-5 ^{*,#,^,×}	0,0013 ± 0,0001 ^{*,#,^}
DM	0,004 ± 7,08E-5 ^{*,#,^,√}	0,0048 ± 0,0002 ^{*,#,√}



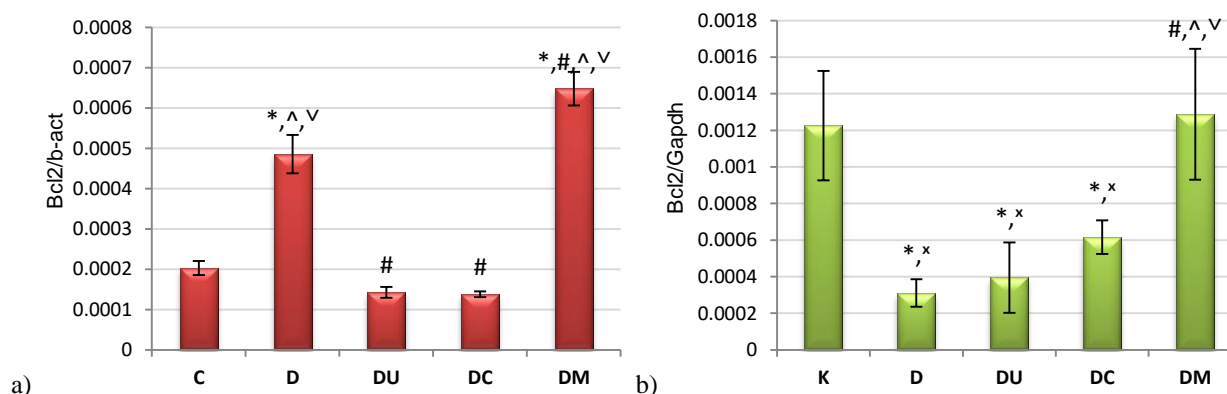
Grafikon 4.13.1.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Bax* mRNA u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. D, ^p<0,05 vs. DU, √p<0,05 vs. DC, ×p<0,05 vs. DM.

Tretman doksorubicinom (D) je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Bcl-2* u tkivu srca u odnosu na kontrolnu grupu K (p<0,001). Kotretman sa UDCA (DU) i CDCA (DC) je visoko statistički značajno smanjio ekspresiju *Bcl-2* u odnosu na grupu D (p<0,001). Kotretman životinja sa 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Bcl-2* u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe (p<0,001) (tabela 4.13.1.2, grafikon 4.13.1.2a).

U tkivu jetre, doksorubicin je doveo do značajnog sniženja *Bcl-2* mRNA u odnosu na grupu K (p=0,005). Ekspresija *Bcl-2* mRNA je bila značajno snižena u odnosu na kontrolnu grupu u grupama kotretiranim sa UDCA (p=0,009) i CDCA (p=0,05), dok je kotretman sa 12-MKC povećao ekspresiju *Bcl-2* u odnosu na kontrolnu grupu (bez statističke značajnosti) i sve eksperimentalne grupe (p=0,003 vs. D, p=0,006 vs. DU, p=0,033 vs. DC) (tabela 4.13.1.2, grafikon 4.13.1.2b).

Tabela 4.13.1.2. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Bcl-2* mRNA u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Bcl-2</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Bcl-2</i> u jetri
K	0,0002 \pm 1,77E-05	0,0012 \pm 0,0002
D	0,0004 \pm 4,75E-05 ^{*,^,\vee}	0,0003 \pm 7,52E-05 ^{*,x}
DU	0,0001 \pm 1,34E-05 [#]	0,0003 \pm 0,0001 ^{*,x}
DC	0,0001 \pm 7,29E-05 [#]	0,0006 \pm 9,20E-05 ^{*,x}
DM	0,0006 \pm 4,17E-05 ^{*,#,\wedge,\vee}	0,0013 \pm 0,0003 ^{*,#,\wedge,\vee}



Grafikon 4.13.1.2. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Bcl-2* mRNA u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

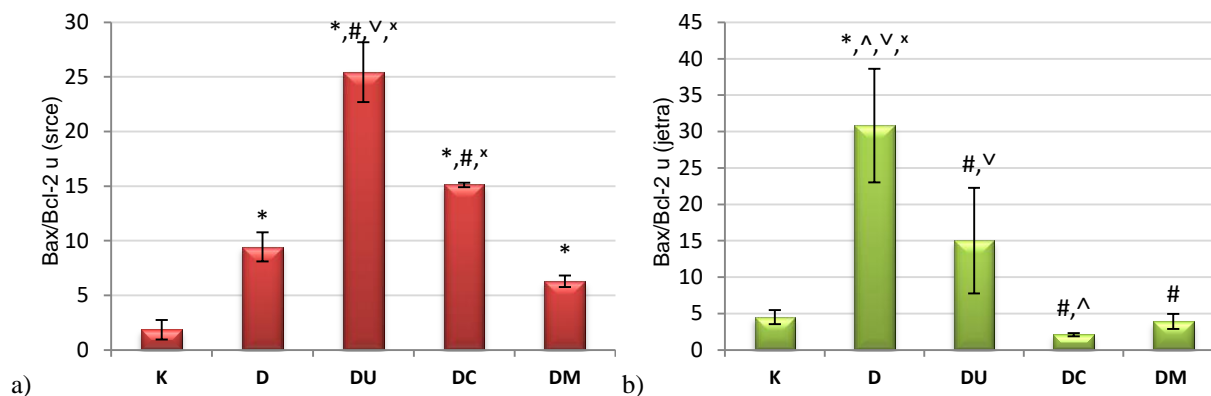
Određivanjem odnosa *Bax/Bcl2* utvrđeno je da je tretman doksorubicinom i kotretman sa svim izabranim žučnim kiselinama značajno povećavaju indukciju apoptoze kardiomiocita u odnosu na kontrolnu grupu K ($p = 0,001$ vs. D, $p < 0,001$ vs. DU, $p < 0,001$ vs. DC i $p = 0,024$ vs. DM). Potencijal indukovanja apoptoze kardiomiocita u 12-MKC kotretiranoj grupi je bio najmanje izražen u odnosu na druge eksperimentalne grupe, niži i u odnosu na grupu životinja tretiranih samo doksorubicinom, međutim statistički značajno smanjenje ovog odnosa je postojalo samo u odnosu na grupe DU ($p < 0,001$) i DC ($p < 0,001$). Kotretman sa 12-MKC je rezultovao u značajnom potencijalu indukcije apoptoze kardiomiocita u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,024$) (tabela 4.13.1.3, grafikon 4.13.1.3a).

Tretman doksorubicinom je imao najveći potencijal indukovanja hepatocelularne apoptoze u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) i grupe životinja kotretirane sa žučnim

kiselinama ($p=0,016$ vs DU, $p<0,001$ vs. DC i $p<0,001$ vs.DM). Najmanji potencijal indukcije apoptoze hepatocita, na osnovu odnosa *Bax/Bcl2* je ispoljio kotretman sa CDCA. Vrednost odnosa *Bax/Bcl2* u ovoj grupi je bio više od dva puta niži, ali statistička značajnost nije postojala. Kotretman 12-MKC je takođe smanjio vrednost *Bax/Bcl2* odnosa, međutim statistička značajnost nije zabeležena (tabela 4.13.1.3, grafikon 4.13.1.3b).

Tabela 4.13.1.3. Odnos ekspresije *Bax* i *Bcl-2* u tkivu srca i jetre nakon tretmana životinja doksorubicinom ili kombinovanim tretmanom doksorubicinom i žučnim kiselinama. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. D, $\wedge p<0,05$ vs. DU, $\vee p<0,05$ vs. DC, * $p<0,05$ vs. DM.

Grupa	<i>Bax/Bcl-2</i> u srcu	<i>Bax/Bcl-2</i> u jetri
K	1,85 \pm 0,89	4,50 \pm 0,97
D	9,44 \pm 1,33 *	30,81 \pm 7,81 *, \wedge , \vee ,x
DU	25,45 \pm 2,74 *,#, \vee ,x	15,00 \pm 7,24 #, \vee
DC	15,11 \pm 0,20 *,# \vee ,x	2,09 \pm 0,23 #, \wedge
DM	6,29 \pm 0,52 *	3,91 \pm 1,02 #



Grafikon 4.13.1.3. Odnos ekspresije *Bax* i *Bcl-2* u tkivu srca i jetre nakon tretmana životinja doksorubicinom ili kombinovanim tretmanom doksorubicinom i žučnim kiselinama. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. D, $\wedge p<0,05$ vs. DU, $\vee p<0,05$ vs. DC, * $p<0,05$ vs. DM.

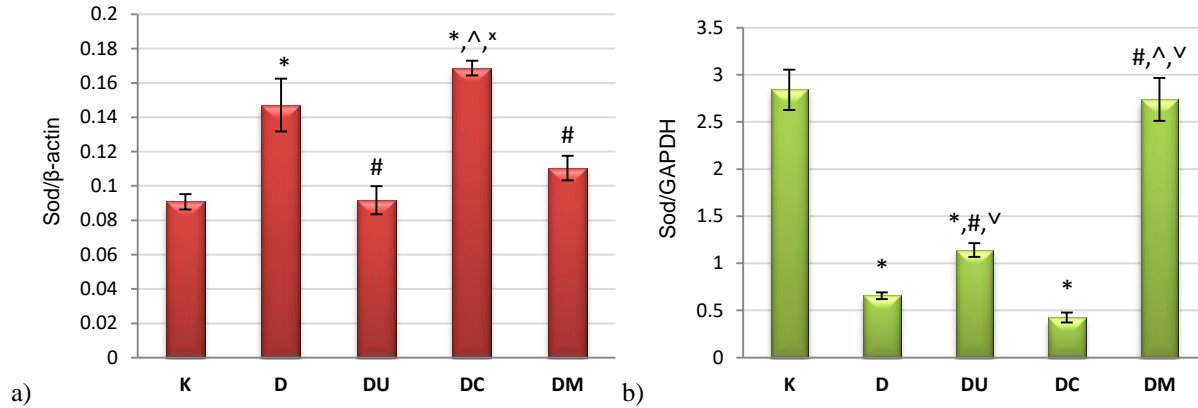
4.13.2. Analiza ekspresije gena sistema antioksidativne zaštite

Relativni nivo ekspresije mRNA za enzim superoksid dismutazu (*Sod*) u srcu u grupi životinja tretiranih doksorubicinom (D) je bila statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu (K) ($p < 0,001$). Iako je kotretman sa svim odabranim žučnim kiselinama povećao ekspresiju *Sod* u odnosu na kontrolnu grupu K, statistički značajno povećanje ekspresije je zabeleženo u grupi DC ($p < 0,001$). Kotretman sa doksorubicinom i UDCA (DU) i doksorubicinom i 12-MKC (DM) je rezultovao u statistički značajnom smanjenju ekspresije mRNA za *Sod* u odnosu na grupu D ($p < 0,001$ vs. DU, $p = 0,003$ vs. DM). Kotretman sa CDCA (DC) doveo do visoko statistički značajnog povećanja ekspresije *Sod* u odnosu na grupe K ($p < 0,001$), DU ($p < 0,001$) i DM ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.1, grafikon 4.13.2.1a).

Relativna ekspresija mRNA za *Sod* je bila visoko statistički značajno smanjena u jetri životinja tretiranih doksorubicinom u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Kotretman sa UDCA (DU) je značajno smanjio ekspresiju *Sod* u odnosu na grupu K ($p < 0,001$) i povećao ekspresiju *Sod* mRNA u odnosu na grupu D ($p = 0,015$) i DC ($p = 0,001$). Kotretman sa CDCA (DC) je rezultovao u visoko statistički značajnom sniženju ekspresije za *Sod* u jetri u odnosu na sve ispitivane grupe, osim grupe D, dok je ekspresija ovog gena nakon kotretmana sa 12-MKC (DM) bila na nivou kontrolne grupe i visoko statistički značajna u odnosu na grupe D ($p < 0,001$), DU ($p < 0,001$) i DC ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.1, grafikon 4.13.2.1b).

Tabela 4.13.2.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Sod* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Sod</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Sod</i> u jetri
K	0,091 \pm 0,004	2,840 \pm 0,215
D	0,147 \pm 0,015*	0,655 \pm 0,036*
DU	0,092 \pm 0,008#	1,142 \pm 0,072*#, \vee
DC	0,169 \pm 0,004* [^] , \times	0,424 \pm 0,053*
DM	0,110 \pm 0,007#	2,737 \pm 0,227# [^] , \vee



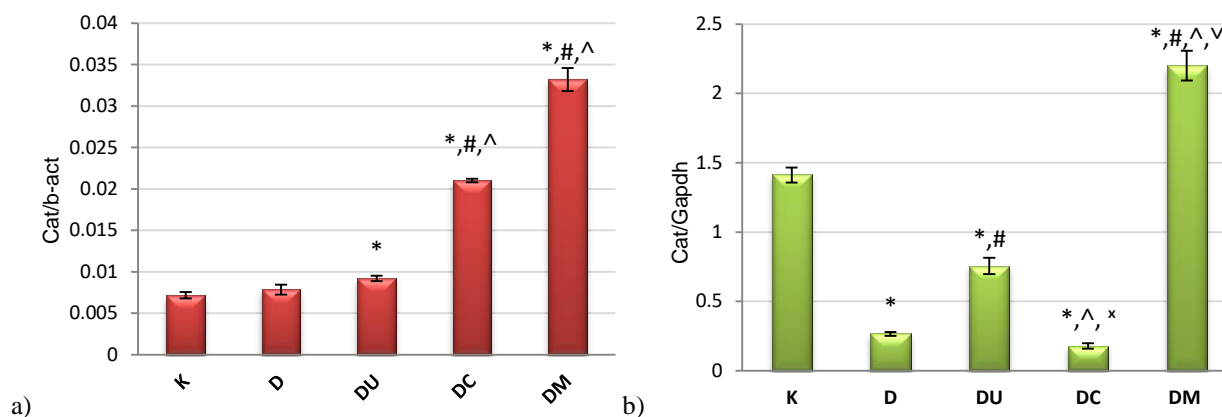
Grafikon 4.13.2.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije Sod mRNA u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, v $p < 0,05$ vs. DC, x $p < 0,05$ vs. DM.

Tretman doksorubicinom (D) je doveo do insignifikantnog porasta ekspresije gena za katalazu (*Cat*) u odnosu na kontrolnu grupu (K). Kotretman doksorubicinom i žučnim kiselinama je doveo do statistički značajnog povećanja ekspresije mRNA za *Cat* u odnosu na grupe K ($p = 0,039$ vs. DU, $p < 0,001$ vs. DC, $p < 0,001$ vs. DM) i D ($p < 0,001$ vs. DC, $p < 0,001$ vs. DM). Ekspresija *Cat* u srcu se razlikovala i između grupa životinja tretiranih doksorubicinom i različitim žučnim kiselinama, tako da je ekspresija u grupi DC bila statistički značajno veća u odnosu na grupu DU ($p < 0,001$), dok je ekspresija u grupi DM bila visoko statistički značajno veća u odnosu na ostale grupe životinja tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.2, grafikon 4.13.2.2a).

Ekspresija *Cat* u tkivu jetre nakon tretmana doksorubicinom je bila visoko statistički značajno snižena u odnosu na kontrolnu grupu K ($p < 0,001$). Kotretman doksorubicinom i UDCA (DU) je takođe značajno smanjio ekspresiju *Cat* u odnosu na grupu K ($p < 0,001$) ali povećao ekspresiju *Cat* u odnosu na grupu D ($p < 0,001$). Kotretman sa CDCA (DC) je visoko statistički značajno smanjio ekspresiju mRNA za *Cat* u odnosu na ispitivane grupe K, DU i DC ($p < 0,001$) dok je kotretman sa 12-MKC (DM) rezultovao u visoko statistički značajnom povećanju ekspresije *Cat* u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.2, grafikon 4.13.2.2b)

Tabela 4.13.2.2. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Cat* mRNA u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Cat</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Cat</i> u jetri
K	0,0072 \pm 0,0004	1,412 \pm 0,054
D	0,0078 \pm 0,0006	0,264 \pm 0,014*
DU	0,0092 \pm 0,0003*	0,756 \pm 0,058*,#
DC	0,0210 \pm 0,0002*,#,^	0,179 \pm 0,020*,,^,x
DM	0,0332 \pm 0,0014*,,#,^	2,200 \pm 0,107*,,#,^,\vee



Grafikon 4.13.2.2. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Cat* u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

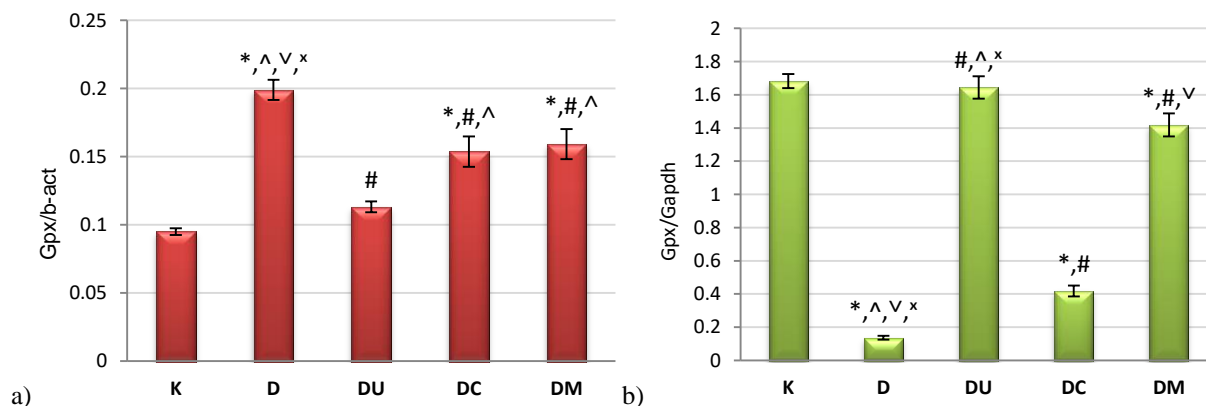
Ekspresija mRNA za enzim glutation peroksidazu (*Gpx*) u srcu životinja tretiranih doksorubicinom (D) je bila visoko statistički značajno veća u odnosu na sve grupe ($p < 0,001$). U grupama životinja tretiranih doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama, ekspresija *Gpx* je bila visoko statistički značajno niža u odnosu na grupu D ($p < 0,001$). Kotretman sa CDCA i 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Gpx* u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) ali i u odnosu na grupu životinja tretiranih doksorubicinom i 12-MKC (DM) ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.3, grafikon 4.13.2.3a).

Tretman doksorubicinom je visoko statistički značajno smanjio ekspresiju *Gpx* mRNA u tkivu jetre kako u odnosu na kontrolnu grupu životinja tako i na sve grupe životinja kotretirane

doksorubicinom i žučnim kiselinama (DU, DC i DM) ($p < 0,001$). Ekspresija *Gpx* u grupi životinja kotretiranim sa UDCA (DU) bila u bliska vrednosti ekspresije *Gpx* kontrolne grupe i značajno viša u odnosu na grupe DC ($p < 0,001$) i DM ($p = 0,002$). Kotretman sa žučnim kiselinama CDCA i 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Gpx* u odnosu na grupu životinja tretiranih samo doksorubicinom ($p < 0,001$), dok je u grupi DM ekspresija za *Gpx* bila značajno veća u odnosu na grupu DC ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.3, grafikon 4.13.2.3b).

Tabela 4.13.2.3. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije mRNA za *Gpx* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Gpx</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Gpx</i> u jetri
K	0,095 \pm 0,003	1,682 \pm 0,042
D	0,199 \pm 0,007 ^{*,^,\vee,\times}	0,137 \pm 0,011 ^{*,^,\vee,\times}
DU	0,113 \pm 0,004 [#]	1,644 \pm 0,068 ^{#,^,\times}
DC	0,154 \pm 0,011 ^{*,#,\wedge}	0,418 \pm 0,032 ^{*,#}
DM	0,159 \pm 0,011 ^{*,#,\wedge}	1,418 \pm 0,070 ^{*,#,\vee}



Grafikon 4.13.2.3. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Gpx* u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

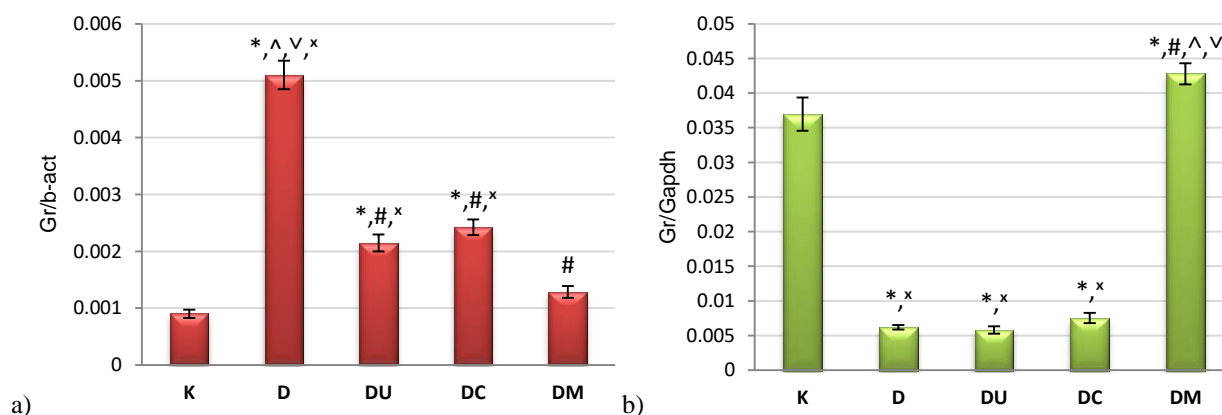
Relativni nivo ekspresije mRNA za enzim glutation reduktazu (Gr) u srčanom tkivu u grupi životinja tretiranih doksorubicinom (D) je bilo visoko statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe (K, DU, DC, DM) ($p < 0,001$). U grupama životinja

tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama CDCA i UDCA je došlo do visoko statistički značajnog povećanja ekspresije *Gr* u odnosu na kontrolnu grupu i 12-MKC kotretiranu grupu ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.4, grafikon 4.13.2.4a).

Nasuprot ekspresiji u srcu, ekspresija mRNA za *Gr* u jetri životinja tretiranih doksorubicinom kao i u grupama životinja kotretiranih doksorubicinom i UDCA (DU) i doksorubicinom i CDCA (DC) je bila visoko statistički značajno snižena u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Kotretman sa 12-MKC je značajno povećao ekspresiju *Gr* u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,003$), i visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Gr* u odnosu na sve eksperimentalne grupe, D, DU i DC ($p < 0,001$) (tabela 4.13.2.4, grafikon 4.13.2.4b).

Tabela 4.13.2.4. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije mRNA za *Gr* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Gr</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Gr</i> u jetri
K	0,0009 \pm 7,35E-05	0,0370 \pm 0,0024
D	0,0051 \pm 0,0002 * ^{^, \vee, x}	0,0062 \pm 0,0003 # ^{, x}
DU	0,0021 \pm 0,0001 * ^{, #, x}	0,0058 \pm 0,0005 # ^{, x}
DC	0,0024 \pm 0,0001 * ^{, #, x}	0,0075 \pm 0,0007 # ^{, x}
DM	0,0013 \pm 0,0001 #	0,0428 \pm 0,0015 * ^{, #, ^, \vee}



Grafikon 4.13.2.4. Uticaj žučnih kiselina na relativnu ekspresiju gena za *Gr* u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

4.13.3 Analiza ekspresije gena za Grp-78 protein

U srcu ispitivanih životinja, tretman doksorubicinom (D) i kotretman sa UDCA (DU), CDCA (DC) i 12-MKC (DM) je visoko statistički značajno povećao ekspresiju mRNA za Grp-78 protein u odnosu na kontrolnu grupu K ($p < 0,001$). U odnosu na grupu D, ekspresija *Grp-78* mRNA je bila značajno niža u grupi DU ($p < 0,001$), a viša u grupama DC ($p < 0,001$) i DM ($p < 0,001$). Kotretman sa CDCA je rezultovao u visoko statistički značajnom povećanju ekspresije mRNA za ovaj protein u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe ($p < 0,001$), dok je kotretman sa 12-MKC statistički značajno povećao ekspresiju *Grp-78* u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) kao i grupe D ($p = 0,006$) i DU ($p < 0,001$) (tabela 4.13.3, grafikon 4.13.3a).

Suprotno, u jetri ispitivanih životinja su kako tretman doksorubicinom tako i kotretman sa UDCA i CDCA visoko statistički značajno smanjili ekspresiju *Grp-78* u odnosu na kontrolnu grupu K ($p < 0,001$). Kotretman sa 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju ovog gena u odnosu na kontrolnu i sve ispitivane grupe ($p < 0,001$), dok ekspresija *Grp-78* u UDCA- i CDCA-kotretiranim grupama međusobno nije bila značajno promenjena kao ni u odnosu na grupu D (tabela 4.13.3, grafikon 4.13.3b).

Tabela 4.13.3. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Grp-78* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Grp-78</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Grp-78</i> u jetri
K	0,0020 \pm 0,0001	0,1033 \pm 0,010
D	0,0124 \pm 0,0006*	0,0392 \pm 0,003*
DU	0,0049 \pm 0,0003*,#	0,0489 \pm 0,003*
DC	0,0324 \pm 0,0008*,#,^, \times	0,0394 \pm 0,002*
DM	0,0145 \pm 0,0005*,#,^	0,2595 \pm 0,012*,#,^, \vee

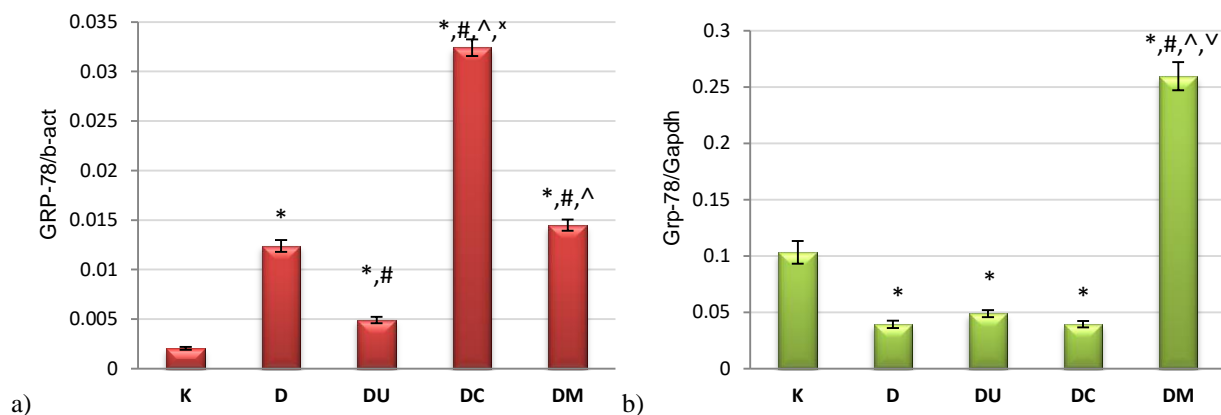


Tabela 4.13.3. Uticaj žučnih kiselina relativni nivo ekspresije mRNA za Grp-78 u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, v $p < 0,05$ vs. DC, x $p < 0,05$ vs. DM.

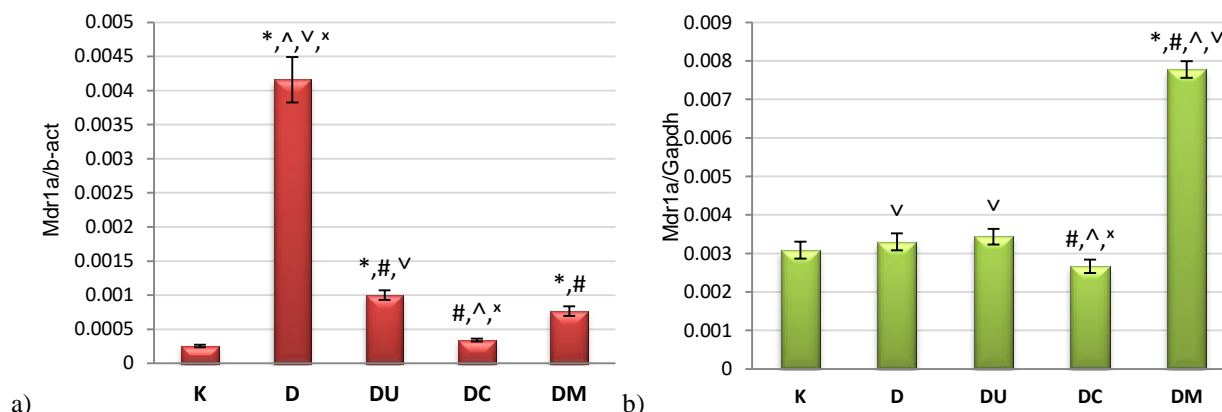
4.13.4. Analiza ekspresije gena za transmembranske efluks transportne proteine

U grupi životinja tretiranih doksorubicinom (D), došlo je do visoko signifikantnog porasta ekspresije mRNA za *Mdr1a* protein u srcu u odnosu na kontrolnu grupu (K) ($p < 0,001$) i sve grupe životinja kotretiranih žučnim kiselinama: DU ($p < 0,001$), DC ($p < 0,001$) i DM ($p < 0,001$). Ekspresija *Mdr1a* u tkivu srca je bila značajno povišena i u grupama DU ($p = 0,001$) i DM ($p = 0,016$) u odnosu na kontrolnu grupu. Kotretman sa CDCA je rezultovao u značajnom sniženju ekspresije *Mdr1a* u srcu u odnosu na kotretman sa UDCA ($p = 0,003$) i 12-MKC ($p = 0,045$) (tabela 4.13.4.1, grafikon 4.13.4.1a).

U jetri ispitivanih životinja, tretman doksorubicinom kao ni kotretman sa UDCA nisu značajno povećali ekspresiju *Mdr1a* u odnosu na kontrolnu grupu. Kotretman sa CDCA je rezultovao u smanjenju ekspresije *Mdr1a* mRNA (bez statistički značajnog smanjenja u odnosu na kontrolnu grupu) ali statistički značajno u odnosu na grupe D ($p = 0,023$), DU ($p = 0,007$) i DM ($p < 0,001$). Kotretman životinja sa 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju gena za ovaj transportni protein u srcu u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe životinja ($p < 0,001$) (tabela 4.13.4.1, grafikon 4.13.4.1b).

Tabela 4.13.4.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije mRNA za *Mdr1a* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Mdr1a</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Mdr1a</i> u jetri
K	0,00025 \pm 1,8E-05	0,0031 \pm 0,0002
D	0,00416 \pm 0,0003 ^{*,^,\vee,x}	0,0033 \pm 0,0002 ^{\vee}
DU	0,00100 \pm 1,03E-05 ^{*,#,\vee}	0,0034 \pm 0,0002 ^{\vee}
DC	0,00034 \pm 2,2E-05 ^{*,^,x}	0,0027 \pm 0,0001 ^{*,^,x}
DM	0,00077 \pm 7,06E-05 ^{*,#}	0,0078 \pm 0,0002 ^{*,#,\vee}



Grafikon 4.13.4.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije mRNA za *Mdr1a* transportni efluks protein u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

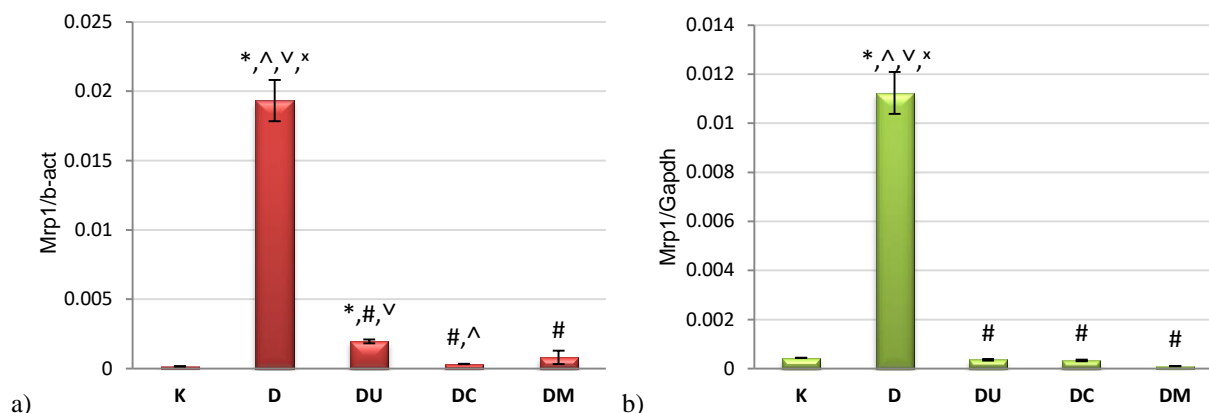
Relativna ekspresija mRNA za transmembranski *Mrp1* transportni protein je bila visoko statistički značajno povećana u srcu životinja tretiranih doksorubicinom u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) i sve grupe životinja kotretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama: DU ($p < 0,001$), DC ($p < 0,001$) i DM ($p < 0,001$). U srčanom tkivu, kotretman sa UDCA je značajno povećao ekspresiju *Mrp1* u odnosu na grupe K ($p = 0,017$) i DC ($p = 0,032$) (tabela 4.13.4.2, grafikon 4.13.4.2a).

U tkivu jetre tretman doksorubicinom je takođe visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Mrp1* mRNA u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe ($p < 0,001$), dok u grupama životinja kotretiranih doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama nije bilo

značajne razlike u ekspresiji *Mrp1* kako u odnosu na kontrolnu grupu tako i između grupa DU, DC i DM (tabela 4.13.4.2, grafikon 4.13.4.2b).

Tabela 4.13.4.2. Uticaj žučnih kiselina relativni nivo ekspresije *Mrp1* mRNA u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Mrp1</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Mrp1</i> u jetri
K	0,0001 \pm 8,3E-06	0,0004 \pm 7,6E-06
D	0,0193 \pm 0,0014 ^{*,^,\vee,\times}	0,0112 \pm 0,0008 ^{*,^,\vee,\times}
DU	0,0020 \pm 0,0001 ^{*,#,\vee}	0,0003 \pm 2,6E-05 [#]
DC	0,0003 \pm 1,0E-05 ^{#,^}	0,0003 \pm 3,6E-05 [#]
DM	0,0008 \pm 0,0004 [#]	9,5E-05 \pm 8,3E-06 [#]



Grafikon 4.13.4.2. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije mRNA za *Mrp1* transportni protein u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

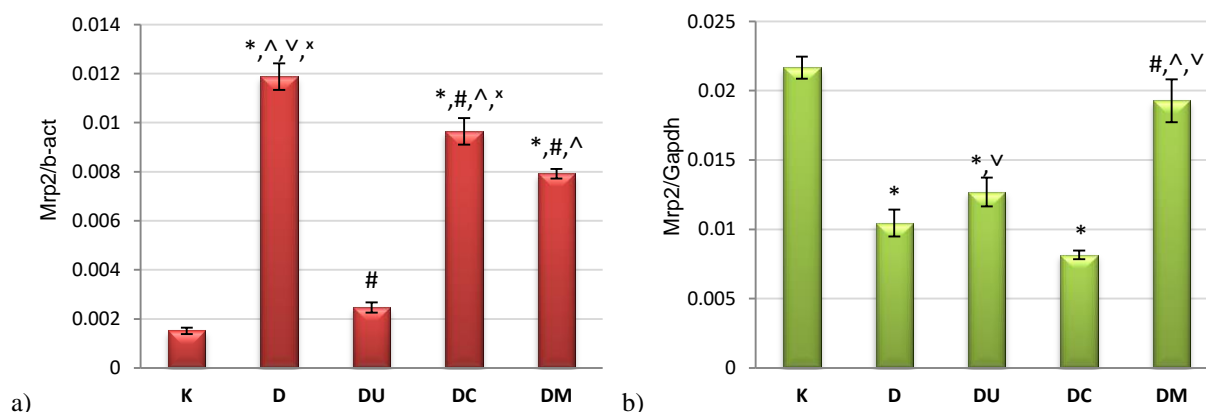
Relativna ekspresija gena za transmembranski protein *Mrp2* je bila visoko statistički značajno povećana u srcu životinja tretiranih doksorubicinom u odnosu na kontrolnu grupu i sve rupe životinja tretirane kombinovanim tretmanom doksorubicina i žučnih kiselina, UDCA (DU), CDCA (DC) i 12-MKC (DM) ($p < 0,001$). Kotretman sa žučnim kiselinama je rezultovao u visoko statistički značajnom smanjenju ekspresije *Mrp2* u odnosu na grupu D ($p < 0,001$), a najznačajnije sniženje je detektovano u grupi životinja tretiranih sa UDCA. Kotretman sa CDCA je rezultovao

u značajnom porastu ekspresije *Mrp2* u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) i grupe DU ($p < 0,001$) i DM ($p = 0,001$), dok je kotretman sa 12-MKC visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Mrp2* u odnosu na kontrolnu grupu i grupu DU ($p < 0,001$) (tabela 4.13.4.3, grafikon 4.13.4.3a).

U jetri ispitivanih životinja tretman doksorubicinom kao i kotretman sa svim žučnim kiselinama osim sa 12-MKC su visoko statistički značajno smanjili ekspresiju *Mrp2* mRNA ($p < 0,001$). Kotretman sa UDCA je značajno povećao ekspresiju *Mrp2* u odnosu na CDCA ($p = 0,002$), dok je kotretman sa 12-MKC visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Mrp2* u odnosu na grupe D, DU i DC ($p < 0,001$) (tabela 4.13.4.3, grafikon 4.13.4.3b).

Tabela 4.13.4.3. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Mrp2* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Mrp2</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Mrp2</i> u jetri
K	0,0015 \pm 0,0001	0,0217 \pm 0,0007
D	0,0119 \pm 0,0005 ^{*,^,\vee,\times}	0,0105 \pm 0,0009 [*]
DU	0,0025 \pm 0,0002 [#]	0,0127 \pm 0,0010 ^{*,\vee}
DC	0,0096 \pm 0,0005 ^{*,#,\wedge,\times}	0,0082 \pm 0,0003 [*]
DM	0,0079 \pm 0,0001 ^{*,#,\wedge}	0,0193 \pm 0,0015 ^{*,#,\wedge,\vee}



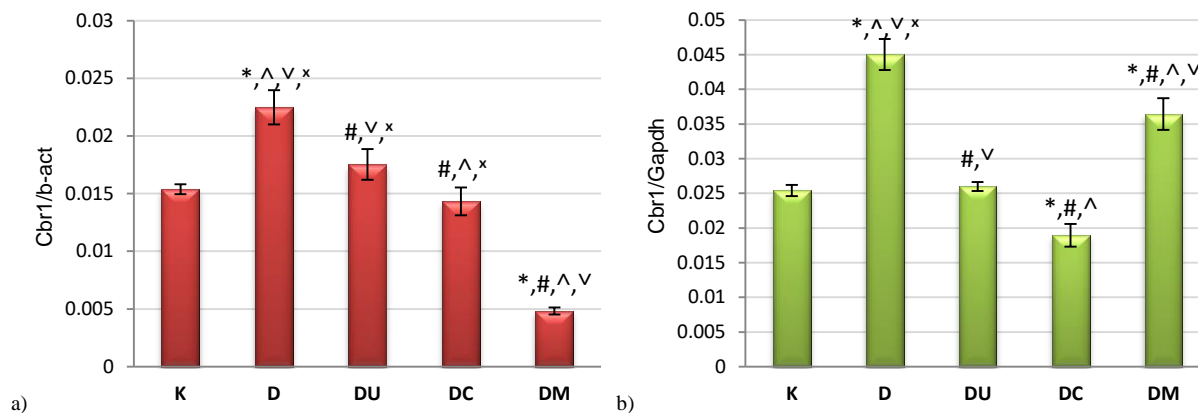
Grafikon 4.13.4.3. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije mRNA za *Mrp2* transportni protein u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, $\times p < 0,05$ vs. DM.

4.13.5. Analiza ekspresije gena koji kodiraju sintezu enzima uključenih u metabolizam doksorubicina

U grupi životinja tretiranih doksorubicinom (D), ekspresija mRNA za karbonil reduktazu-1 (*Cbr-1*) je bila visoko statistički značajno povećana i u srcu i u jetri u odnosu na kontrolnu grupu (K), i sve grupe životinja kotretirane sa doksorubicinom i žučnim kiselinama ($p < 0,001$). Kotretman sa CDCA je značajno smanjio ekspresiju *Cbr-1* u jetri u odnosu na grupe D ($p < 0,001$) i DU ($p = 0,028$), dok je kotretman sa 12-MKC visoko statistički značajno smanjio ekspresiju *Cbr-1* u odnosu na kontrolnu i sve ispitivane grupe ($p < 0,001$). Kotretman sa žučnim kiselinama je rezultovao u visoko statistički značajnom smanjenju ekspresije hepatičkog *Cbr-1* u odnosu na grupu D ($p < 0,001$). Kotretman sa CDCA značajno smanjio ekspresiju *Cbr-1* u srcu u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,006$) i grupu životinja tretirane sa UDCA ($p = 0,003$), dok je kotretman sa 12-MKC visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Cbr-1* u odnosu na UDCA- i CDCA-kotretirane grupe životinja ($p < 0,001$) (tabela 4.13.5.1, grafikon 4.13.5.1).

Tabela 4.13.5.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Cbr-1* mRNA u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC, * $p < 0,05$ vs. DM.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Cbr-1</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Cbr-1</i> u jetri
K	0,0154 \pm 0,0004	0,0254 \pm 0,0008
D	0,0225 \pm 0,0014 ^{*,^,\vee,x}	0,0450 \pm 0,0022 ^{*,^,\vee,x}
DU	0,0175 \pm 0,0013 ^{#, \vee,x}	0,0260 \pm 0,0006 ^{#, \vee}
DC	0,0143 \pm 0,0012 ^{#,^,x}	0,0190 \pm 0,0016 ^{*,#,^}
DM	0,0048 \pm 0,0003 ^{*,#,^,\vee}	0,0364 \pm 0,0022 ^{*,#,^,\vee}



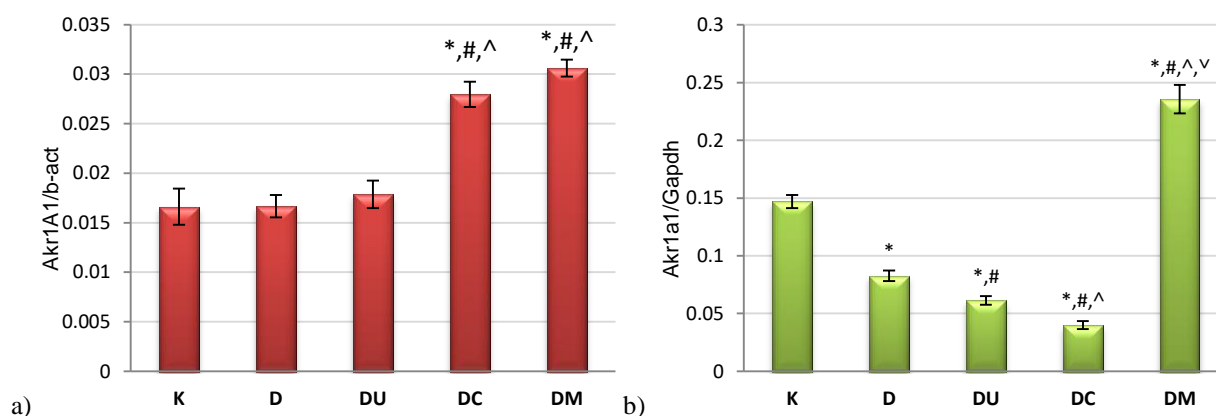
Grafikon 4.13.5.1. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije mRNA za karbonil reduktazu-1 (*Cbr-1*) u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doxorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, v $p < 0,05$ vs. DC, x $p < 0,05$ vs. DM.

Tretman životinja doxorubicinom i kotretman sa UDCA nisu značajno promenili ekspresiju *Akr1A1* mRNA u srcu u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Kotretman sa CDCA i 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Akr1A1* u odnosu na kontrolnu grupu (K), grupu životinja tretiranu doxorubicinom i na UDCA-kotretiranu grupu ($p < 0,001$) (**tabela 4.13.5.2, grafikon 4.13.5.2a**).

Suprotno molekularnim događajima u srčanom tkivu, u tkivu jetre je tretman životinja doxorubicinom visoko statistički značajno smanjio ekspresiju *Akr1A1* u odnosu na kontrolnu grupu K ($p < 0,001$). Kotretman sa UDCA (DU) odn. CDCA (DC) je dodatno visoko statistički značajno smanjio ekspresiju *Akr1A1* u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) i značajno smanjio ekspresiju ovog gena u odnosu na grupu D ($p = 0,02$ vs. DU, $p < 0,001$ vs. DC). Tretman životinja sa doxorubicinom i 12-MKC je rezultovao u visoko statistički značajnom porastu ekspresije *Akr1A1* mRNA u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe ($p < 0,001$) (**tabela 4.13.5.2, grafikon 4.13.5.2b**).

Tabela 4.13.5.2. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Akr1A1* u srcu i jetri životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. D, ^p<0,05 vs. DU, ∨p<0,05 vs. DC.

Grupa	Relativna ekspresija <i>Akr1a1</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Akr1a1</i> u jetri
K	0,016 ± 0,001	0.147 ± 0.006
D	0,016 ± 0,001	0.083 ± 0.005*
DU	0,017 ± 0,001	0.061 ± 0.004*,#
DC	0,027 ± 0,001 ^{*,#} ,^	0.040 ± 0.003 ^{*,#} ,^
DM	0,03 ± 0,0008 ^{*,#} ,^	0.236 ± 0.012 ^{*,#} ,^,∨



Grafikon 4.13.5.2. Uticaj žučnih kiselina na relativni nivo ekspresije *Akr1A1* mRNA u srcu (a) i jetri (b) životinja tretiranih doksorubicinom. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. *p<0,05 vs. K, #p<0,05 vs. D, ^p<0,05 vs. DU, ∨p<0,05 vs. DC.

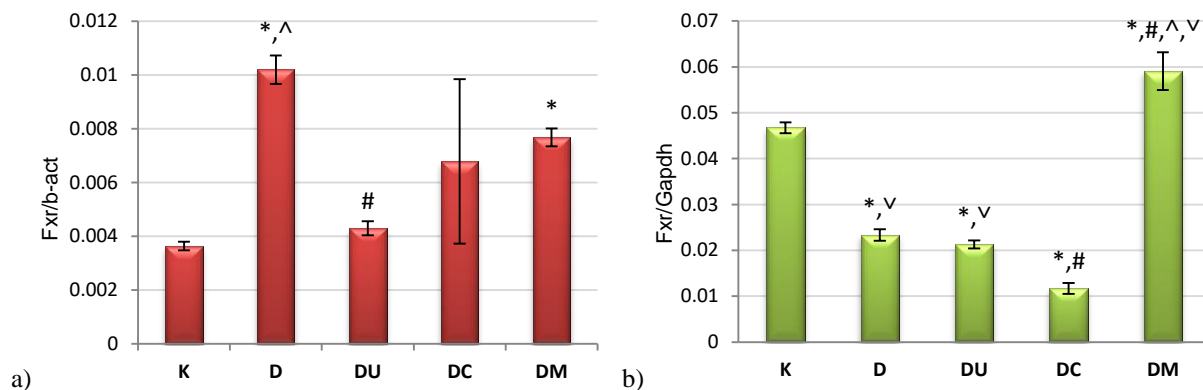
4.13.6. Analiza relativne ekspresije mRNA nuklearnog FXR u tkivu srca i jetre životinja tretiranih doksorubicinom sa/bez kotretmana žučnim kiselinama

Ekspresija *Fxr* je bila visoko statistički značajno povećana u miokardu životinja tretiranih doksorubicinom (D) u odnosu na kontrolnu grupu (K) ($p=0,001$). U grupama životinja kotretiranih žučnim kiselinama ekspresija *Fxr* je bila niža u odnosu na grupu D, a statistički značajno sniženje u odnosu na D grupu je postojalo samo u UDCA-kotretiranoj grupi ($p=0,003$). Kotretman životinja sa 12-MKC je značajno povećao ekspresiju *Fxr* u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,34$) (tabela 4.13.6.1, grafikon 4.13.6.1a).

U tkivu jetre je došlo do visoko statistički značajnog sniženja ekspresije *Fxr* u grupama životinja tretiranih doksorubicinom ($p < 0,001$), kao i u UDCA- ($p < 0,001$) i CDCA- ($p < 0,001$) kotretiranim grupama u odnosu na kontrolnu grupu. Ekspresija *Fxr* u CDCA-kotretiranoj grupi bila je najniža, značajno niža u odnosu na grupe D ($p < 0,001$), DU ($p = 0,002$) i DM ($p < 0,001$). Kotretman sa 12-MKC je visoko statistički značajno povećao ekspresiju *Fxr* u tkivu jetre u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe ($p < 0,001$) (tabela 4.13.6.1, grafikon 4.13.6.1b).

Tabela 4.13.6.1. Prikaz relativne ekspresije *Fxr* mRNA u tkivu srca i jetre nakon tretmana životinja doksorubicinom ili kombinovanim tretmanom doksorubicinom i žučnim kiselinama. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC.

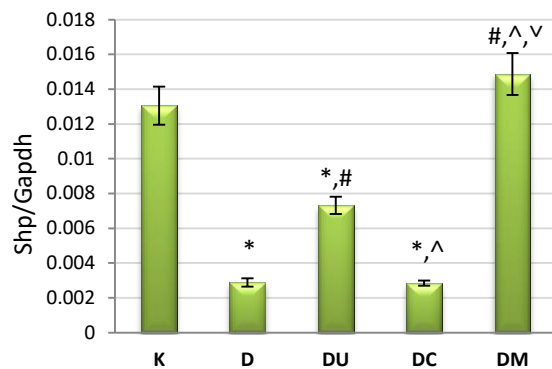
Grupa	Relativna ekspresija <i>Fxr</i> u srcu	Relativna ekspresija <i>Fxr</i> u jetri
K	0,003 \pm 0,0001	0,047 \pm 0,0011
D	0,010 \pm 0,0005 ^{*,^}	0,023 \pm 0,0012 ^{*,\vee}
DU	0,004 \pm 0,0002 [#]	0,021 \pm 0,0008 ^{*,\vee}
DC	0,006 \pm 0,0030	0,011 \pm 0,0011 ^{*,#}
DM	0,007 \pm 0,0003 [*]	0,059 \pm 0,0041 ^{*,#,^,\vee}



Grafikon 4.13.6.1. Relativna ekspresija *Fxr* mRNA u tkivu srca (a) i jetre (b) nakon tretmana životinja doksorubicinom ili kombinovanim tretmanom doksorubicinom i žučnim kiselinama. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, $\vee p < 0,05$ vs. DC.

Iz prikazanih rezultata se može videti da su tretman doksorubicinom, kao i kotretman sa UDCA i CDCA visoko statistički značajno smanjili ekspresiju *Shp* u odnosu na kontrolnu grupu

($p < 0,001$), dok je kotretman sa 12-MKC povećao ekspresiju *Shp* u odnosu na kontrolnu grupu (bez statističke značajnosti) i visoko statistički značajno u odnosu na sve eksperimentalne grupe životinja ($p < 0,001$) (tabela 4.13.6.2, grafikon 4.13.6.2).



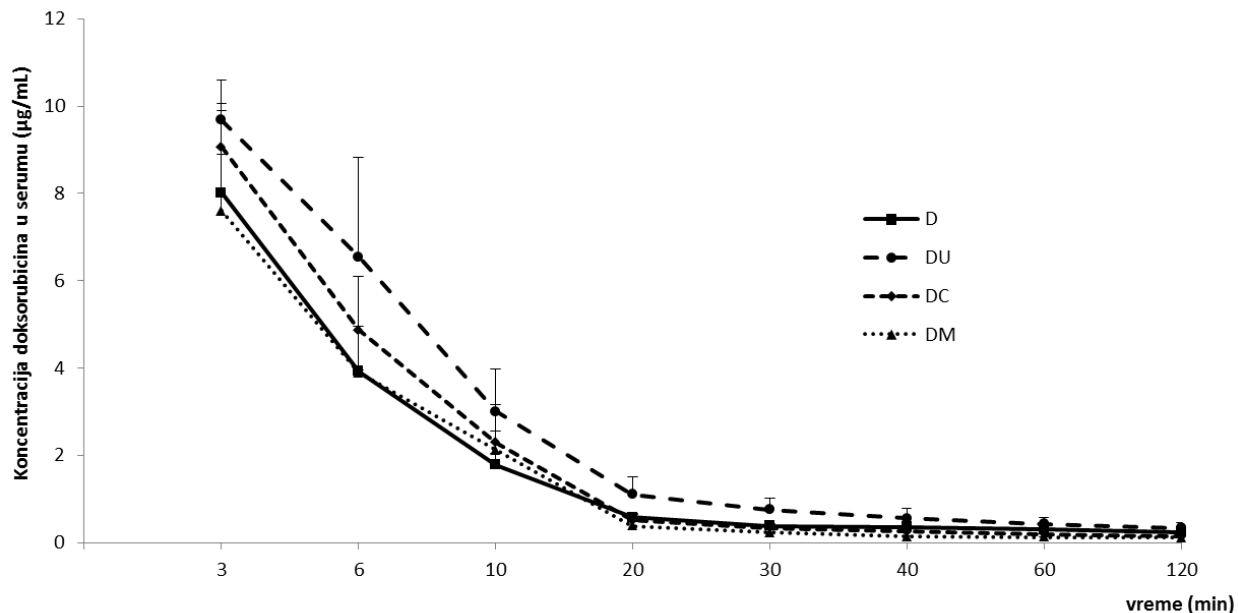
Grupa	Relativna ekspresija <i>Shp</i> u jetri
K	0,0130 ± 0,0010
D	0,0029 ± 0,0002*
DU	0,0073 ± 0,0004*,#
DC	0,0028 ± 0,0001*,^
DM	0,0149 ± 0,0012#,,^,∇

Grafikon 4.13.6.2, tabela 4.13.6.2. Relativna ekspresija *Shp* mRNA u tkivu jetre nakon tretmana životinja doxorubicinom ili kombinovanim tretmanom doxorubicinom i žučnim kiselinama. Rezultati dobijeni iz triplikata su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. D, ^ $p < 0,05$ vs. DU, ∇ $p < 0,05$ vs. DC.

4.14. Uticaj žučnih kiselina na farmakokinetičke osobine doksorubicina

4.14.1. Uticaj tretmana žučnim kiselinama na koncentracije doksorubicina u serumu i farmakokinetičke parametre

Profil koncentracija doksorubicina u vremenu u serumu životinja sa odn. bez pretretmana izabranim žučnim kiselinama prikazan je na **grafikonu 4.14.1.1** i **tabeli 4.14.1.1**.



Grafikon 4.14.1. Profil serumskih koncentracija doksorubicina u vremenu nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25 mg/kg), CDCA (25 mg/kg) i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine + SD. D- kontrolna grupa; DU- doksorubicin + UDCA; DC- doksorubicin + CDCA; DM- doksorubicin + MKC. Statistički značajne razlike u vremenskim tačkama su prikazane u **tabeli 4.14.1**.

Iz prikazanih rezultata se može videti da srednje vrednosti koncentracije doksorubicina u serumu kod svih grupa životinja rapidno opadaju u toku prvih 20 minuta nakon aplikacije, a zatim se polako smanjuju u toku trajanja studije (120 minuta). Farmakokinetički profil doksorubicina u serumu pokazuje značajne razlike između kontrolne grupe i grupa životinja pretiranih sa UDCA (DU), CDCA (DC) i MKC (DM).

Tabela 4.14.1.1. Profil serumskih koncentracija doksorubicina u vremenu nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25 mg/kg), CDCA (25 mg/kg) i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine + SD. D-kontrolna grupa; DU– doksorubicin + UDCA; DC–doksorubicin + CDCA; DM– doksorubicin + MKC. * p<0.05 vs. D; # p<0.05 vs. DU; ^ p<0.05 vs. DC

Grupa	DOX µg/mL (srednja vrednost ± SD)							
	3 min	6 min	10 min	20 min	30 min	40 min	60 min	120 min
D	8,01±0,88	3,92±0,03	1,78±0,26	0,58±0,08	0,38±0,05	0,36±0,08	0,30±0,09	0,24±0,09
DU	9,68±0,90*	6,55±2,27	3,00±0,96	1,10±0,41*	0,76±0,26*	0,56±0,22	0,43±0,13	0,33±0,11
DC	9,07±0,99	4,87±1,22	2,29±0,27*	0,51±0,13 [#]	0,34±0,07 [#]	0,25±0,04 [#]	0,19±0,03 [#]	0,14±0,04 [#]
DM	7,60±2.30	3,89±1.07	2,11±1,04	0,38±0,10 [#]	0,24±0,06* [#]	0,14±0,01* ^{#,^}	0,13±0,007 ^{#,^}	0,11±0,007 [#]

Primena UDCA je uticala na farmakokinetiku doksorubicina i dovela do povećanja koncentracije u serumu u svim ispitivanim vremenskim tačkama tokom studije u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koja je dobila samo doksorubicin (D). U grupi DU je detektovano statistički značajno povećanje serumskih koncentracija doksorubicina u tri vremenske tačke: 3 min ($9,67 \pm 0,90$ vs. $8,01 \pm 0,88$ $\mu\text{g/mL}$, $p=0,044$); 20 min ($1,10 \pm 0,41$ vs. $0,58 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$, $p=0,027$) i 30 min ($0,76 \pm 0,25$ vs. $0,38 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$, $p=0,014$) u poređenju sa grupom D (**grafikon 4.14.1, tabela 4.14.1.1**). Pretretman sa UDCA je takođe rezultovao u povećanju vrednosti površine ispod krive koncentracije doksorubicina u vremenu (AUC_{0-t}) za 24,1% ($p=0,03$) i povećanju maksimalne koncentracije (C_{max}) ($p=0,044$), ali i u smanjenju volumena distribucije (V_d) za 50,6% ($p=0,009$) kao i klirensa doksorubicina (Cl) ($p=0,023$) (**tabela 4.14.1.2**).

Pretretman životinja sa CDCA (DC) je doveo do povećanja koncentracije doksorubicina u serumu u toku prvih 10 min nakon administracije pri čemu je povećanje u desetom minutu bilo na granici statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu ($2,29 \pm 0,27$ vs. $1,77 \pm 0,26$ $\mu\text{g/mL}$, $p=0,05$) (**grafikon 4.14.1, tabela 4.14.1.1**). U daljem toku studije serumске koncentracije doksorubicina u grupi DC su bile niže u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke signifikantnosti. Pretretman sa CDCA je statistički značajno smanjio V_d ($p=0,006$) u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, pretretman ovom žučnom kiselinom je značajno smanjio vreme zadržavanja leka u organizmu (MRT) ($p=0,042$) (**tabela 4.14.1.2**).

Nasuprot efektima UDCA u CDCA, pretretman životinja sa 12-MKC (DM) je doveo do smanjenja serumskih koncentracija doksorubicina u odnosu na kontrolu u svakoj vremenskoj tački uzorkovanja osim u desetom minutu. Statistički značajno snižene koncentracije doksorubicina u ovoj grupi su detektovane u tridesetom ($0,23 \pm 0,06$ vs. $0,38 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$, $p=0,038$) i četrdesetom minutu ($0,14 \pm 0,01$ vs. $0,36 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$, $p=0,01$) (**grafikon 4.14.1, tabela 4.14.1.1**). U odnosu na kontrolnu grupu, vrednosti farmakokinetičkih parametara u grupi DM nisu bili statistički značajno promenjeni (**tabela 4.14.1.2**).

Različite žučne kiseline su ispoljile različit efekat na koncentracije doksorubicina u serumu. Statistički značajne razlike između grupa DU i DC su zabeležene u sledećim vremenskim tačkama: 20 min ($p=0,016$), 30 min ($p=0,009$), 40 min ($p=0,019$), 60 min ($p=0,003$) i 120 min ($p=0,006$). Između grupa DU i DM razlike su zabeležene u minutima 20 ($p=0,007$), 30

($p=0,003$), 40 ($p=0,017$), 60 ($p=0,006$) i 120 ($p=0,016$), dok su razlike između grupa DC i DM zabeležene u minutima 40 ($p=0,005$) i 60 ($p=0,01$) (**grafikon 4.14.1, tabela 4.14.1.1**).

Tabela 4.14.1.2. Rezultati nekompartmanske analize farmakokinetičkih parametara doksorubicina kod pacova nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25mg/kg), CDCA (25mg/kg), i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine \pm SD. * $p<0,05$ vs. D; # $p<0,05$ vs. DU; ^ $p<0,05$ vs. DC.

Parametar/Jedinica	Grupa			
	D	DU	DC	DM
λ_z (1/min)	0,005 \pm 0,003	0,007 \pm 0,003	0,008 \pm 0,002	0,003 \pm 0,001 [^]
$t_{1/2}$ (min)	147,25 \pm 56,96	118,13 \pm 52,89	91,78 \pm 23,25	263,55 \pm 142,93
C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	16,48 \pm 3,51	17,39 \pm 7,1	17,37 \pm 2,61	14,93 \pm 5,45
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	8,01 \pm 0,88	9,68 \pm 0,90*	9,07 \pm 0,99	7,60 \pm 2,30
AUC_{0-t} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	109,56 \pm 15,42	144,36 \pm 17,59*	110,75 \pm 10,25 [#]	90,68 \pm 23,81 [#]
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	166,05 \pm 49,03	195,08 \pm 37,55	129,76 \pm 14,57 [#]	133,89 \pm 43,43
MRT (min)	125,95 \pm 63,88	93,61 \pm 49,88	50,44 \pm 19,3*	177,01 \pm 113,54
Vd (L)	3,67 \pm 0,71	1,87 \pm 0,63*	2,32 \pm 0,22*	6,08 \pm 2,00 [#]
Cl (mL/min)	18,63 \pm 5,33	11,28 \pm 1,54*	18,18 \pm 3,50 [#]	17,21 \pm 4,49 [#]

Kada se uporede efekti različitih žučnih kiselina na farmakokinetiku doksorubicina kod pacova, može se konstatovati da postoje značajne razlike između grupa životinja pretretiranih različitim žučnim kiselinama (**tabela 4.14.1.2**). UDCA i CDCA su smanjile poluvreme eliminacije doksorubicina dok je 12-MKC povećala vrednost ovog parametra, međutim statistička značajnost između grupa nije postojala. Pretretman sa UDCA je rezultovao u značajnom povećanju vrednosti površine ispod krive koncentracije doksorubicina u vremenu u odnosu na grupe životinja pretretirane sa CDCA ($p=0,006$) i 12-MKC ($p=0,01$). U CDCA pretretiranoj grupi životinja vrednosti površine ispod krive koncentracije doksorubicina ekstrapoliranu na beskonacnost ($AUC_{0-\infty}$) su bile značajno snižene u odnosu na UDCA-pretretiranu grupu ($p=0,007$). Vreme zadržavanja doksorubicina u organizmu sniženo u grupama životinja pretretiranih sa CDCA i 12-MKC u odnosu na UDCA pretretiranu grupu, međutim ststistički značajne razlike nisu postojale. U 12-MKC pretretiranoj grupi životinja volumen distribucije je bio najviši, pri čemu je ststistički značajno povećanje vrednosti ovog parametra

zabeleženo u odnosu na UDCA-pretretiranu grupu ($p=0,004$). U odnosu na UDCA-pretretiranu grupu, klirens doksorubicina je bio značajno viši u grupama životinja pretretiranih sa CDCA ($p=0,004$) i 12-MKC ($p=0,031$).

4.14.2. Uticaj tretmana žučnim kiselinama na koncentracije doksorubicina u žuči

U **tabeli 4.14.2.1.** prikazane su vrednosti ukupne zapremine izlučene žuči u toku ispitivanog perioda (120 min). Između grupa nije postojala statistički značajna razlika u zapremini izlučene žuči odnosno pretretman žučnim kiselinama nije ispoljio holagog efekat. Samim tim nije došlo do potencijalnog dilucionog efekta na koncentraciju doksorubicina izlučenog bilijarnim putem. Takođe, nisu postojale razlike u zapremini žuči u odgovarajućim vremenskim intervalima između kontrolne grupe i grupa životinja pretretiranih žučnim kiselinama (**tabela 4.14.2.2**). Jedina razlika je postojala između UDCA- i 12-MKC-pretretiranih grupa u intervalima 60-79 min ($p=0,01$) i 80-99 min ($p<0,001$) u kojima je količina izlučene žuči bila veća u 12-MKC- i odnosu na UDCA-pretretiranu grupu životinja.

Tabela 4.14.2.1. Prosečne vrednosti ukupne zapremine izlučene žuči nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25 mg/kg), CDCA (25 mg/kg), i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine + SD. D- kontrolna grupa; DU–doksorubicin + UDCA; DC–doksorubicin + CDCA; DM– doksorubicin + MKC.

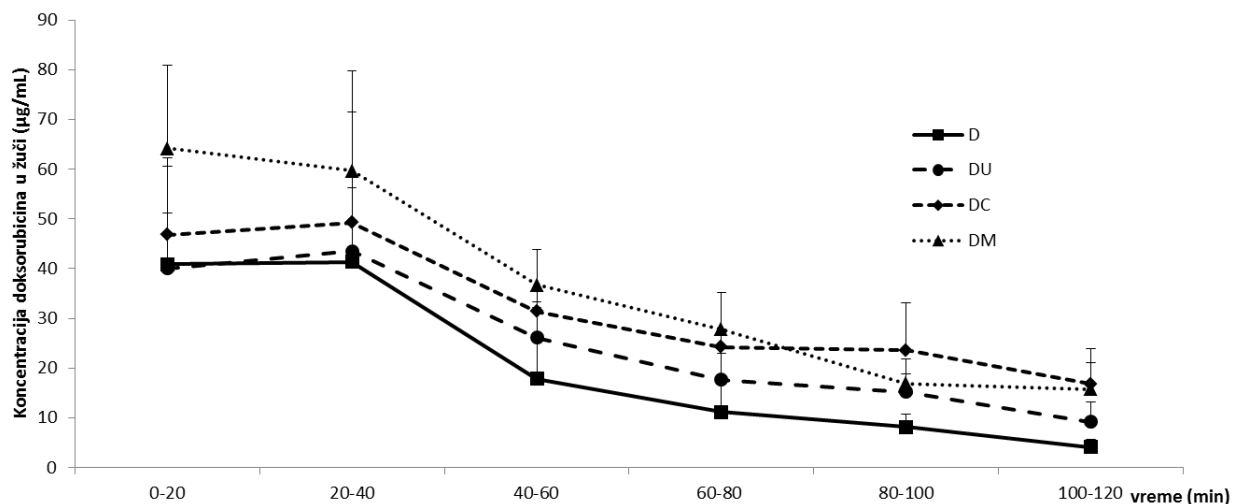
Grupa	D	DU	DC	DM
Zapremina žuči (mL)	0,98 ± 0,34	1,07 ± 0,51	1,00 ± 0,33	1,18 ± 0,11

Tabela 4.14.2.2. Prosečne vrednosti zapremine izlučene žuči u vremenskim intervalima nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25 mg/kg), CDCA (25 mg/kg), i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine + SD. D- kontrolna grupa; DU–doksorubicin + UDCA; DC–doksorubicin + CDCA; DM– doksorubicin + MKC. #p<0,05 vs DU.

Grupa/ vreme	Zapremina žuči u intervalima uzorkovanja (mL)					
	0-19 min	20-39 min	40-59 min	60-79 min	80-99 min	100-120 min
D	0,21 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,13 ± 0,07
DU	0,17 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,13 ± 0,006	0,14 ± 0,03
DC	0,19 ± 0,09	0,19 ± 0,06	0,18 ± 0,03	0,15 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,16 ± 0,02
DM	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,19 ± 0,006	0,17 ± 0,006 [#]	0,17 ± 0,001 [#]	0,18 ± 0,04

Na **grafikonu 4.14.2** i **tabeli 4.14.2.3** su prikazani rezultati uticaja pretretmana žučnim kiselinama, UDCA, CDCA i 12-MKC na koncentracije doksorubicina u žuči. U poređenju sa kontrolnom grupom, sve tri žučne kiseline indukovale su bilijarnu sekreciju doksorubicina. Najprominentniji efekat potenciranja bilijarne ekskrecije doksorubicina je postignut pretretmanom sa 12-MKC, a nešto manje i pomoću CDCA. U grupama životinja koje su tretirane sa CDCA i 12-MKC ova razlika u sekreciji u odnosu na kontrolnu grupu je bila najizraženija u poslednja tri intervala uzorkovanja žuči (60-80 min; 80-100 min i 100-120 min), dok u obe grupe promene bilijarne sekrecije doksorubicina u toku prvog časa nisu bile statistički značajne.

U toku posmatranih vremenskih intervala 12-MKC je povećala koncentraciju doksorubicina u žuči u poređenju sa kontrolnom grupom na sledeći način: 27,86±7,29 vs. 11,21±5,73 µg/mL, p=0,036 (60-79 min); 16,9±1,93 vs. 8,20±2,57 µg/mL, p=0,009 (80-99 min); i 15,78±5,27 vs. 4,14±1,57 µg/mL, p=0,022 (100-119 min). Takođe, srednje vrednosti koncentracija doksorubicina u žuči CDCA pretretiranih životinja bile su više u poređenju sa kontrolnom grupom, a statistička značajnost je postojala u tri poslednja vremenska intervala: 24,25±3,57 vs. 11,21±5,73 µg/mL, p=0,029 (60-79 min); 23,60±9,46 vs. 8,20±2,57 µg/mL, p=0,05 (80-99 min); i 16,84±7,04 vs. 4,14±1,57 µg/mL, p=0,038 (100-119 min). Iako je pretretman sa UDCA povećao sekreciju doksorubicina preko bilijarnog sistema, promene u koncentracijama nisu bile statistički značajno više u poređenju sa kontrolnom grupom.



Grafikon 4.14.2. Profil koncentracija doksorubicina u vremenu u žuči nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25 mg/kg), CDCA (25 mg/kg), i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine + SD. D-kontrolna grupa; DU–doksorubicin + UDCA; DC–doksorubicin + CDCA; DM– doksorubicin + MKC.

Tabela 4.14.2.3. Prikaz koncentracija doksorubicina u žuči životinja sa ili bez pretretmana odabranim žučnim kiselinama. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine + SD. * $p < 0.05$ vs. D; [#] $p < 0.05$ vs. DU.

Grupa	DOX µg/mL					
	0-19 min	20-39 min	40-59 min	60-79 min	80-99 min	100-120 min
D	40,89±19,71	41,33±30,10	17,88±14,30	11,22±5,73	8,21±2,58	4,15±1,57
DU	40,03±11,17	43,51±14,80	26,09±10,10	17,66±5,31	15,23±6,70	9,20±3,93
DC	46,77±15,49	49,29±6,98	31,35±2,00	24,25±3,58*	23,60±9,47*	16,84±7,04*
DM	64,17±16,74 [#]	59,73±20,06	36,71±7,20	27,86±7,30*	16,92±1,94*	15,79±5,28*

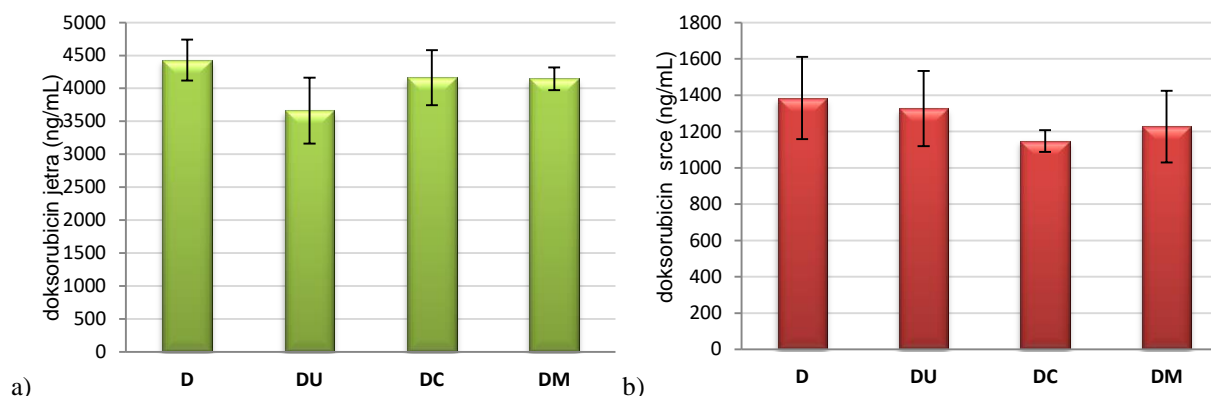
Komparacijom efekata primene različitih žučnih kiselina, jedina statistička značajnost je zabeležena u intervalu 0-19 min između grupa DU i DM pri čemu je 12-MKC značajno povećala koncentraciju doksorubicina u žuči u odnosu na UDCA ($p=0,047$).

4.14.3. *In vivo* uticaj žučnih kiselina na kumulaciju doksorubicina u tkivu jetre i miokarda

Srednje koncentracije doksorubicina u tkivu jetre eksperimentalnih životinja su prikazani u tabeli 4.14.3 i grafikonu 4.14.3a.

Tabela 4.14.3. Rezultati kumulacije doksorubicina u jetri i srcu pacova nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25mg/kg), CDCA (25mg/kg), i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine \pm SD. D- kontrolna grupa; DU–doksorubicin + UDCA; DC–doksorubicin + CDCA; DM– doksorubicin + MKC.

Grupa	DOX ng/mL			
	D	DU	DC	DM
Jetra	4428,87 \pm 311,37	3661,93 \pm 502,45	4162,54 \pm 416,67	4146,50 \pm 172,62
Srce	1384,14 \pm 226,71	1326,28 \pm 207,08	1147,84 \pm 59,91	1226,99 \pm 198,03



Grafikon 4.14.3. Prikaz kumulacije doksorubicina u homogenatu jetre (a) odnosno srca (b) pacova nakon bolus i.v. administracije doksorubicina (10 mg/kg) pacovima bez ili sa p.o. pretretmanom žučnim kiselinama UDCA (25mg/kg), CDCA (25mg/kg), i MKC (26 mg/kg), u toku tri uzastopna dana pre administracije doksorubicina. Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine \pm SD.

U poređenju sa kontrolnom grupom, pretretman životinja odabranim žučnim kiselinama je rezultovao u smanjenju kumulacije doksorubicina u jetri. Koncentracija doksorubicina kumuliranog u homogenatu jetre UDCA pretretirane grupe je bila 17,3% manja u odnosu na kontrolnu grupu (3661,92 \pm 502,45 ng/mL vs. 4428,86 \pm 311,37 ng/mL). Kumulacija

dokсорubicina u jetri životinja tretiranih sa CDCA i MKC je bila 6,01% (4162,53±416,6 ng/mL) odnosno 6,37% (4146,50±172,62 ng/mL) manja u odnosu na kontrolnu grupu.

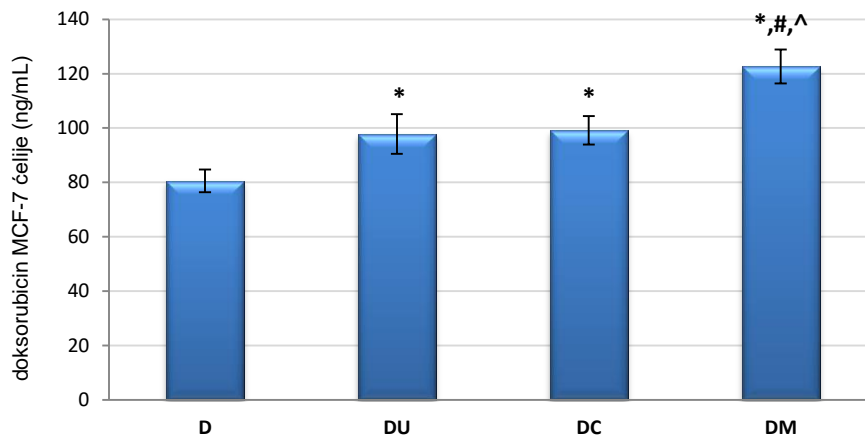
Pretretman sa UDCA, CDCA i 12-MKC takođe je rezultovao u smanjenoj kumulaciji dokсорubicina u srcu u poređenju sa kontrolnom grupom (1384,14±226,71 ng/mL), a zabeleženo smanjenje koncentracija leka u srcu se kretalo od 4,17% (1326,28±207,08 ng/mL) za UDCA, 11,35% (1226,98±198,03 ng/mL) za 12-MKC i 17,07% (1147,84±59,91 ng/mL) za CDCA. Međutim, smanjenje kumulacije dokсорubicina i jetri i srcu životinja pretretiranih žučnim kiselinama nije bilo statistički značajno.

4.14.4. *In vitro* uticaj žučnih kiselina na kumulaciju dokсорubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke

Kao što je prikazano u **tabeli 4.14.4** i na **grafikonu 4.14.4**, koncentracija dokсорubicina u MCF-7 ćelijama je bila visoko statistički značajno povećana u grupama ćelija ko-tretiranih sa dokсорubicinom i odgovarajućom žučnim kiselinom u odnosu na grupu ćelija kojima žučna kiselina nije dodata.

Tabela 4.14.4. Intracelularne koncentracija dokсорubicina u ćelijama MCF-7 linije humanog adenokarcinoma dojke inkubiranih tokom 3 h sa 0,25 μ M dokсорubicina, bez i sa preinkubacijom žučnim kiselinama 30 min pre dodavanja dokсорubicina. Rezultati su prikazani u obliku aritmetička sredina \pm SD iz dva nezavisna eksperimenta. D–kontrolna grupa, DU–dokсорubicin + UDCA, DC–dokсорubicin + CDCA i DM–dokсорubicin + MKC. * $p < 0.001$ vs. D; # $p < 0.001$ vs. DU; ^ $p < 0.001$ vs. DC.

Grupa	DOX ng/mL			
	D	DU	DC	DM
	80,57±4,18	97,84±7,27*	99,16±5,25*	122,62±6,25* ^{#,^}



Grafikon 4.14.4. Prikaz intracelularnih koncentracija doxorubicina u MCF-7 ćelijama inkubiranih tokom 3 h sa 0,25 μ M doxorubicina, bez i sa preinkubacijom žučnim kiselinama 30 min pre dodavanja doxorubicina. Rezultati su prikazani u obliku aritmetička sredina \pm SD iz dva nezavisna eksperimenta. * $p < 0.001$ vs. D; # $p < 0.001$ vs. DU; ^ $p < 0.001$ vs. DC

Inkubacija ćelija sa odabranim žučnim kiselinama 30 minuta pre dodavanja doxorubicina u flaskone sa MCF-7 ćelijskom linijom je povećalo intracelularne koncentracije doxorubicina nakon 3 časa u sledećem redosledu: 52,19% u 12-MKC grupi ($122,62 \pm 6,25$ ng/mL, $p < 0,001$), 23,06% u CDCA grupi ($99,15 \pm 5,25$ ng/mL, $p < 0,001$) i 21,43% u UDCA grupi ($97,84 \pm 7,27$ ng/mL, $p = 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu ($80,57 \pm 4,18$ ng/mL). 12-MKC je visoko statistički značajno povećala prodor i kumulaciju doxorubicina u ćelije humanog adenokarcinoma dojke u poređenju sa obe prirodne žučne kiseline, UDCA ($p < 0,001$) i CDCA ($p < 0,001$).

5. DISKUSIJA

Uprkos postignutom značajnom napretku u savremenoj onkologiji i biomedicini, u razumevanju molekularnih mehanizama inicijacije i progresije maligniteta, kao i translacije stečenog znanja u unapređenje antitumorskih strategija, neželjeni efekti novih terapijskih agenasa ostaju najveća prepreka u njihovoj implementaciji. Potencijal doksorubicina da sa velikim uspehom uspori progresiju maligniteta posredstvom više različitih mehanizama je rezultovao činjenicom da se doksorubicin koristi duže od pola veka u sastavu različitih hemoterapijskih protokola, za lečenje solidnih i hematoloških maligniteta. Takođe, napredak u lečenju onkoloških pacijenata rezultovao je u smanjenju stope mortaliteta i produžavanju perioda bez osnovne onkološke bolesti (*oncological event-free survival*), međutim, sekundarni, latentni efekti hemoterapije su postali značajan problem koji narušava dužinu i kvalitet života uspešno lečenih onkoloških pacijenata.

Budući da je razvoj novih lekova veoma dug i skup proces sa neizvesnim ishodom, poboljšanje farmakodinamskih i farmakokinetičkih svojstava već postojećih antitumorskih agenasa, uz smanjenje toksičnih efekata, predstavlja racionalan istraživački pristup u savremenoj medicini. U tom cilju, intervencije sa razvojem novih farmaceutskih formulacija, konjugata lekova i nanonosaa kao sistema ciljanog transporta, primenom biokompatibilnih materijala, rezultovale su u izvesnom stepenu unapređenja selektivnosti i terapijske efikasnosti kao i redukciji sistemske toksičnosti antitumorskih lekova. Kao endogeno sintetisani molekuli, žučne kiseline predstavljaju dobro tolerabilne, biokompatibilne molekule, a zbog visokog potencijala građenja konjugata predstavljaju dobre kandidate za ispitivanje razvoja novih antitumorskih terapijskih strategija. Amfifilna svojstva i specifična struktura ovih biomolekula doprinosi značajnom potencijalu u moduliranju transporta lekova kroz biološke membrane i omogućava formiranje konjugata čime se utiče na farmakokinetička svojstva lekova. Otkriće da žučne kiseline, kao ligandi nuklearnih i membranskih receptora, ispoljavaju aktivnost signalnih molekula dodatno opravdava racionalnost i ukazuje na potrebu intenzivnijeg ispitivanja potencijala ovih biomolekula ne samo kao pasivnih nosaa lekova i promotera transporta kroz biomembrane, nego kao potencijalnih farmakodinamskih agenasa sa uticajem na ćelijski metabolizam, proliferaciju i regulaciju preživljavanja i smrti ćelije.

Ovo istraživanje je zasnovano na upravo navedenim idejama da žučne kiseline mogu modifikovati citotoksična svojstva doksorubicina *in vitro*, na MCF-7 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke. Kao molekuli kandidati korišćene su tri žučne kiseline, dva prirodna C7 hidroksi epimera, CDCA i UDCA i semisintetski derivat 12-MKC. U odnosu na CDCA, 12-MKC se razlikuje po prisustvu dodatne okso grupe na C12 položaju.

Ispitivane žučne kiseline su pokazale dozno-zavisni citotoksični efekt pri čemu je citotoksični potencijal, određen na osnovu IC_{50} vrednosti bio u redosledu CDCA>12-MKC>UDCA. Navedeni rezultati citotoksičnosti su u skladu sa literarnim podacima koji pokazuju da je citotoksičnost žučnih kiselina determinisana CMC vrednostima. Na CMC vrednost utiču brojni faktori uključujući broj i stereoorijentaciju hidroksilnih i drugih supstituenata na steroidnom nukleusu pri čemu je kontinuitet hidrofobne β površine jedna od ključnih determinanti za asocijaciju u micela. Položaj C7 hidroksilne grupe kod UDCA i C12 okso grupe u 12-MKC ispoljavaju značajan efekt na CMC vrednost, a samim tim i citotoksični potencijal (142). Žučne kiseline mogu da stupaju u interakciju sa ćelijskom membranom i ispolje citotoksični efekt zahvaljujući deterdžentskim svojstvima, a takođe je pokazano da toksičnost žučnih kiselina zavisi od njihove hidrofobnosti. Hidrofobne žučne kiseline mogu da difunduju kroz ćelijsku membranu i stupe u interakciju sa DNA ili/i drugim makromolekulima, dovodeći do oštećenja DNA i pokretanja signala ćelijske smrti (272). U skladu sa navedenim tvrdnjama, manje hidrofobne žučne kiseline UDCA i 12-MKC su ispoljile manje citotoksične efekte u poređenju sa hidrofobnom CDCA.

Za ispitivanje efekata žučnih kiselina na modulaciju citotoksičnih svojstva doksorubicina upotrebljena je koncentracija doksorubicina koja je u pilot ogledu inhibisala rast 35% ćelija i koncentracije žučnih kiselina koje su inhibirale rast 20% ćelija. Žučne kiseline su dodate u medijum sa ćelijskom kulturom 30 minuta pre dodavanja doksorubicina, prema postavljenoj hipotezi da će žučne kiseline primenjene na ovaj način i u niskim koncentracijama dovesti do modifikacije molekularnih mehanizama i celularnih odgovora na dejstvo doksorubicina. Kotretman MCF-7 ćelijske linije doksorubicinom i CDCA je rezultovao u visoko statistički značajnom povećanju citotoksičnosti i sinergističkom citotoksičnom efektu. Za razliku od CDCA, UDCA i 12-MKC su ispoljile aditivni citotoksični efekt sa doksorubicinom. Jedan od mogućih mehanizama ovakvog citotoksičnog efekta ispitivanih kotretmana je žučnim

kiselinama-posredovano potenciranje doksorubicinom-indukovane apoptoze MCF-7 ćelija. Potvrda da je apoptoza potencirana kotretmanom dobijena je, na osnovu rezultata odnosa mRNA *BAX* i *BCL-2* kao pokazatelja odnosa ekspresije pro- i antiapoptotskih medijatora, čime je utvrđeno da kotretman ćelija sa doksorubicinom i svim odabranim žučnim kiselinama utiče na mitohondrijama-posredovane događaje koji uvode ćeliju u programiranu ćelijsku smrt. Ovaj efekt je bio najizraženiji u grupi ćelija kotretiranih sa CDCA, a najmanje izražen u grupi ćelija kotretiranih sa UDCA što je u skladu sa opisanom ulogom hidrofobne CDCA u indukciji apoptoze kao i stereospecifične i enantiospecifične zavisnosti (cito)toksičnih efekata žučnih kiselina (86, 97). Dakle, žučne kiseline su povećale citotoksična svojstva doksorubicina prema MCF-7 ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke, na osnovu čega se može pretpostaviti da bi primena novih formulacija citostatika sa žučnim kiselinama smanjila dozu leka bez smanjenja antitumorske aktivnosti, ali sa smanjenjem dozno-zavisnih toksičnih efekata na zdrava tkiva. U tom smislu se izdvojila CDCA koja je sinergističkim efektom sa doksorubicinom indukovala apoptozu malignih ćelija i gotovo dvostruko povećala citotoksičnost u odnosu na ćelije tretirane samo doksorubicinom. Apoptotska kaskada može biti inicirana različitim putevima, pre svega unutrašnjim i spoljašnjim, koji konvergiraju ka aktivaciji egzekutora kaspaza-3 i -7. Alasmael i sar. su u nedavno sprovedenoj studiji potvrdili da inkubacija estrogen receptor pozitivne MCF-7 ćelijske linije i estrogen receptor negativne ćelijske linije MDA-MB-231 sa CDCA tokom 24h rezultuje u značajnoj aktivaciji egzekutora kaspaza-3/7 i degradacije njihovog supstrata NAD^+ ADP-riboziltransferaze (*Poly (ADP-ribose) Polymerase*, PARP) (273). Aktivacija apoptoze u navedene dve ćelijske linije je bila rezultat aktivacije kaspaze-9 tj. unutrašnjeg, mitohondrijalnog puta, dok ni u jednoj ćelijskoj liniji CDCA (kao ni GW4064) nisu aktivirali kaspazu-8, čak ni u prisustvu Fas liganda kao pozitivne kontrole. Takođe, u studiji na BSC-TC2 ćelijskoj liniji adenokarcinoma kolona pokazano je da CDCA i DCA specifično indukuju apoptozu unutrašnjim mitohondrijalnim putem i aktivacijom kaspaze-9, dok ne dolazi do aktivacije receptora ćelijske smrti i kaspaze-8 u ovoj ćelijskoj liniji (272). Ovakav, receptor-nezavisan apoptotski odgovor je detektovan i kod drugih ćelija karcinoma kolona, Caco-2 i SW620, koje eksprimiraju CD95/Fas receptor (274).

Familija Bcl-2 proteina ima ključnu ulogu u mitohondrijalnom apoptotskom putu, pri čemu su gubitak potencijala mitohondrijalne membrane i otvaranje MPT ključni događaji u ovom putu ćelijske smrti. Hidrofobne žučne kiseline preko generisanja ROS indukuju otvaranje

MPT (275). Pri tome, mitohondrije predstavljaju kako mesto stvaranja tako i subcelularnu metu hiperprodukcije ROS (86). Na modelu eksperimentalne holestaze je pokazano da pod dejstvom hidrofobnih žučnih kiselina dolazi do lipidne peroksidacije membrane mitohondrija. Ovo rezultuje u oštećenju ćelijske respiracije i funkcionalnog kapaciteta ETS. Naime, na modelu izolovanih mitohondrija hepatocita pokazano je da žučne kiseline smanjuju aktivnost nekoliko enzimskih kompleksa, komponenti ETS, pre svega kompleksa I, II i IV (276). Hidrofobne žučne kiseline takođe smanjuju potencijal unutrašnje mitohondrijalne membrane nakon energizacije sukcinata. Ovi molekuli inhibišu fazu III i stimulišu fazu IV mitohondrijalne respiracije. Inhibicija faze III verovatno nastaje kao posledica inhibicije sistema fosforilacije, dok stimulatorno dejstvo na nivou faze IV pod dejstvom hidrofobnih žučnih kiselina je povezano sa povećanom permeabilnošću mitohondrija za protone. Povećana propustljivost za protone može da nastane kao posledica dejstva žučnih kiselina kao protonofora ili usled poremećaja strukturne organizacije membranskih komponenti (277).

Mitohondrijalno generisanje ROS predstavlja jedan od ranih događaja u ispoljavanju toksičnih efekata hidrofobnih žučnih kiselina. Hiperprodukcija ROS je praćena deplecijom antioksidativnih enzima i smanjenjem koncentracije supstrata uključenih u transport elektrona, kao što su ubihinon-9 i -10. Otvaranje MPT prati rapidno povećanje permeabilnosti mitohondrijalne membrane za molekule male molekulske mase usled otvaranja kanala koji čine adenin nukleotidni translokator unutrašnje mitohondrijalne membrane, voltažno-zavisni anjonski kanal spoljašnje membrane mitohondrija i mitohondrijalni ciklofilin D (278). Indukciju MPT prati bubrenje mitohondrija, gubitak potencijala mitohondrijalne membrane, smanjenje oksidativne fosforilacije, ruptura spoljašnje membrane mitohondrija i oslobađanje citohroma c. Hidrofobne žučne kiseline takođe povećavaju koncentraciju citoplazmatskog kalcijuma što predstavlja značajan faktor u otvaranju MPT (279). Takođe, značajan izvor produkcije ROS pod dejstvom hidrofobnih žučnih kiselina je aktivacija membranskih enzima kao što su NAD(P)H oksidaze ili fosfolipaza A2, što se javlja kao posledica uticaja žučnih kiselina na kompoziciju i strukturu ćelijske membrane (280).

Naši rezultati povećane ekspresije mRNA za *SOD* i *GR* kao i smanjena ekspresija mRNA za *CAT*, u CDCA i 12-MKC kotretiranim grupama MCF-7 ćelija ukazuju na poremećaj redoks

homeostaze i povećanu produkciju ROS, što može predstavljati jedan od mehanizama potenciranja apoptoze u navedenim eksperimentalnim grupama.

U toku odgovora na oksidativni stres dolazi do transkripcije različitih gena antioksidativne zaštite zahvaljujući regulaciji putem cis-aktivnih sekvenci poznatih kao ARE (*Antioxidant Response Elements*). Najznačajniji ARE je NRF2, transkripcioni faktor koji je sekvestriran u citoplazmi u vidu kompleksa sa Keap-1 (*Kelch-like ECH Associated Protein*) – Cul3 i degradiran pomoću sistema ubikvitin-proteazom. Oksidansima- ili elektrofilima-indukovane modifikacije dve reaktivne cisteinske rezidue, Cys237 i Cys288, u okviru strukture Keap1, inhibišu ubikvitinaciju NRF2, omogućavajući njegovu nuklearnu translokaciju i regulaciju gena u okviru antioksidativne zaštite (281). U našem istraživanju, sprovedeni tretman MCF-7 ćelija doksorubicinom je značajno smanjio ekspresiju *NRF2* na transkripcionom nivou u odnosu na kontrolnu grupu, dok je kotretman žučnim kiselinama blago povećao transkripciju *NRF2*, koja je i dalje bila značajno niža u odnosu na kontrolu. Povećanje ekspresije *NRF2* pomoću tauro-UDCA, praćeno smanjenjem oksidativnog stresa i stresa endoplazmatskog retikuluma, je opisano kao adaptivni citoprotektivni odgovor na rifampicinom-indukovano oštećenje HepG2 ćelijske linije (282). Povećana ekspresija *NRF2* može predstavljati hepatoprotektivni mehanizam tauro-UDCA kod prilikom primene antituberkulotika rifampicina i drugih hepatotoksičnih lekova. Slično, primena Nrf2-aktivirajućeg agensa sulforafana je dovedena u vezu sa prevencijom doksorubicinske kardiotoksičnosti na modelu pacova (283). Suprotno povoljnim i protektivnim efektima *NRF2* u zdravim tkivima, aktivacija *NRF2* u tumorskim ćelijama može indukovati ekspresiju gena uključenih u razvoj rezistencije na doksorubicin uključujući antioksidativni sistem zaštite i efluks transportne proteine (284). Supresija *NRF2* u MCF-7 ćelijskoj liniji postignuta nakon tretmana doksorubicinom i žučnim kiselinama u našoj studiji predstavlja, dakle, pozitivan molekularni događaj sa krajnjim efektom supresije „detoksikacionih mehanizama“ malignih ćelija i povećanja senzitivnosti na dejstvo citostatika, što je u skladu sa dobijenim rezultatima citotoksičnosti i proapoptotskog statusa. Slično, efekti supresije *NRF2* pomoću etionamida u ćelijama humane akutne monocitne leukemije su rezultovali povećanom senzitivnošću malignih ćelija na dejstvo doksorubicina, etopozida i arsen trioksida (285).

MCF-7 ćelijska linija je deficitarna u ekspresiji kaspaze-3 pri čemu se egzekucija apoptoze vrši posredstvom kaspaze-7, što može limitirati apoptotski potencijal (286). Poznato je da doksorubicin indukuje apoptozu na kaspaza-3-posredovan način (287). Budući da ispitivane žučne kiseline indukuju apoptozu unutrašnjim, mitohondrijalnim, ali ne i spoljašnjim receptorima-posredovanim putem, ispitana je uloga stresa endoplazmatskog retikuluma (ER) kao inicijatora alternativnog apoptotskog puta. ER kao membranozni lavirint razgranatih međusobno povezanih tubula i sakusa koji se prostiru od perinuklearnog prostora kroz citoplazmu, ima veoma značajnu ulogu u nekoliko homeostaznih funkcija u ćeliji uključujući sintezu, savijanje i posttranslaciono modifikovanje proteina, biosintezu lipida i sterola, sintezu lipidnih dvosloja, metabolizam ugljenih hidrata, homeostazu kalcijuma kao i metabolizam ksenobiotika (288). Proteinsko savijanje predstavlja specijalno kontrolisan segment sinteze i post-translacionih modifikacija proteina i uključuje brojne mehanizme kontrole kvaliteta koji omogućavaju da je novosintetisani protein savijen u adekvatnu konfiguraciju u skladu sa funkcijom i krajnjom destinacijom u ćeliji. Osim adekvatnog redoks miljea, ovaj proces zahteva učešće proteina pratilaca (*protein chaperones*), glikozilacionih enzima i adekvatan nivo kalcijuma (289).

Adekvatno savijanje nascentnog polipeptidnog lanca se postiže zahvaljujući aktivnosti foldaza i niza kalcijum-zavisnih molekularnih pratioca u lumenu ER uključujući GRP78 (*Glucose-Regulated Protein 78*), GRP94, kalneksin, kalretikulin i drugih koji održavaju polipeptidni lanac u solubilnoj formi i termodinamski-optimalnoj konformaciji. Različiti intracelularni faktori i faktori mikrosredine uključujući disbalans redoks homeostaze, depleciju kalcijuma, acidozu, hipertermiju, hroničnu hiperglikemiju i hiperlipidemiju kao i prisustvo toksina utiču na navedene kontrolne mehanizme što rezultuje u kumulaciji nesavijenih, nepravilno savijenih, insolubilnih ili na bilo koji drugi način oštećenih proteina u lumenu ove organele, čume se aktivira UPR (*Unfolded Protein Response*) tj. stanje stresa ER. Osnovni cilj signalnih puteva u okviru UPR je zaštita integriteta ćelije i ponovno uspostavljanje adekvatnog procesovanja proteina, pri čemu se ireverzibilno oštećeni proteini uklanjaju iz ćelije na dva načina: ubikvitinacijom u citosolu i razgradnjom pomoću proteazoma (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*, ERAD), ili agregacijom sa ćelijskim debrisom i recikliranjem pomoću autofagije (290).

Kumulacija nesavijenih ili neadekvatno savijenih proteina u lumenu se detektuje pomoću transmembranskih receptora ER, pri čemu dolazi do aktivacije GRP78 i tri transmembranska proteina: PERK (*Protein Kinase Activated by Double-Stranded RNA (PKR)-Like Endoplasmic Reticulum Kinase*), ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) i IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*). Ovi proteini imaju luminalni domen sa ulogom senzora promene sredine u lumenu ER i citoplazmatske domene koji stupaju u interakciju sa transkripcionom ili/i translacionom mašinerijom. Kumulacija proteina u lumenu dovodi do disocijacije GRP78 od navedenih molekularnih senzora i vezivanja za hidrofobne domene oštećenih proteina u cilju njihove reparacije, pri čemu disocijacija GRP78 dovodi do aktivacije PERK, ATF6 i IRE1. Povećana ekspresija GRP78 iznad određenog bazalnog nivoa predstavlja indikator i marker prisustva stresa ER (291) Aktivacija odgovarajuće grane UPR determiniše krajnji ishod, adaptivni ili maladaptivni odgovor. Ukoliko UPR ne omogući ponovno uspostavljanje homeostaze, ili adaptacije, aktiviraju se proapoptotski mehanizmi sa ciljem uklanjanja oštećene ćelije, aktivacijom ER-rezidentne kaspaze-12 (292). Ova dihotomna uloga UPR obezbeđuje integritet organizma.

U našem istraživanju, sprovedeni tretman MCF-7 ćelijske linije doksorubicinom i odabranim žučnim kiselinama, UDCA, CDCA i 12-MKC, je rezultovao u značajnom povećanju ekspresije *GRP-78* u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom. Redosled kojim su žučne kiseline u kombinaciji sa doksorubicinom povećale ekspresiju markera *GRP-78*, $CDCA > 12-MKC > UDCA$ je u skladu sa redosledom odnosa *BAX/BCL-2* kao indikatorom aktivacije unutrašnjeg apoptotskog puta. Tokom proteklih godina sve veći broj dokaza ukazuje na povezanost mitohondrija i ER, kao i da aktivacija UPR može da indukuje mitohondrijalnu disfunkciju i apoptozu ćelije poremećajem intracelularne homeostaze kalcijuma i drugim mehanizmima (293). Bioinformatičkom analizom je utvrđeno da je su ER (21%) i mitohondrije (21%) najznačajnije ćelijske organele koje sadrže proteine koji stupaju u interakciju sa žučnim kiselinama (294). Od 44 identifikovana proteina koji stupaju u interakciju sa žučnim kiselinama u okviru ER, genskom ontologijom i analizom funkcionalne mreže proteinskih asocijacija je otkriveno da je 20 proteina uključeno u UPR, a sedam proteina ima funkciju vezivanja molekularnih pratioca. Poznato je da tauro-UDCA funkcioniše kao hemijski pratilac koji poboljšava kapacitet procesovanja proteina i redukuje stres endoplazmatskog retikuluma, što je praćeno poboljšanjem regulacije glikemije i insulinske senzitivnosti, gojaznosti, hipertenzije,

kardiomiocitne kontraktilne disfunkcije, poremećaja jetre, inflamatorne bolesti creva, neurodegenerativnih bolesti, poremećaja retine (112). Nasuprot UDCA, hidrofobne žučne kiseline imaju potencijal indukovanja stresa ER koji može da rezultuje u ROS-indukovanoj mitohondrijalnoj disfunkciji i aktivaciji apoptoze i autofagije (295, 296). Aktivacija stresa ER hidrofobnim žučnim kiselinama CDCA, DCA i LCA u HepG2 ćelijama, povećava ekspresiju CHOP (*C/EBP homologous protein*) poznatog i kao GADD153 (*Growth Arrest- and DNA Damage-Inducible Gene 153*), ključnog medijatora apoptoze u putu posredovanim stresom ER (101). Žučne kiseline takođe povećavaju koncentraciju kalcijuma u citoplazmi hepatocita i drugih ćelija, što ukazuje na značaj kalcijumom-posredovane apoptoze pomoću ovih molekula (297). Veći deo kalcijuma oslobođenog u citosol potiče upravo iz ER, što smanjuje kapacitet procesovanja proteina u limenu i indukuje UPR. Takođe, povećanje koncentracije citoplazmatskog kalcijuma indukuje produkciju ROS u mitohondrijama (298).

Povećana ekspresija proteina GRP78 može da bude uzrok pojave hemorezistencije malignih ćelija, međutim, tačan mehanizam njegovog doprinosa razvoju rezistencije još uvek nije dovoljno poznat (299). Lokalizacija GRP78 nije ograničena striktno na ER, jer se ovaj protein može naći i u citoplazmi, nukleusu, ćelijskoj membrani. Ova heterogena intracelularna lokalizacija GRP78, kao i njegoa udruženost sa različitim signalnim putevima koji regulišu ćelijsku proliferaciju i smrt, metastaziranje i invazivnost ga čine interesantnom metom antitumorskih strategija (300). Inhibicija GRP78 je značajno smanjila vijabilnost MCF-7 i MDA-MB231 ćelija izloženih dejstvu tamoksifena, dok povećana ekspresija posredovana insercijom GRP78-ekspimirajućeg plazmida rezultuje u razvoju rezistencije ovih ćelija na tamoksifen (301). Supresija GRP78 poboljšava citotoksičnu aktivnost etopozida na NCI-H446 ćelijskoj liniji mikrocelularnog karcinoma pluća (302). Povećana ekspresija GRP78 je redukovala apoptotski odgovor u ćelijama glioma nakon tretmana cisplatinom i etopozidom, dok je inhibicija GRP78 u ovim ćelijama povećala osetljivost na dejstvo navedenih citostatika (303). Takođe, citotoksična aktivnost doksorubicina i etopozida u CHO ćelijskoj liniji (ćelije ovarijuma kineskog hrčka), je inhibisana nakon povećanja ekspresije GRP78 (304). Navedena studija je demonstrirala da povećana ekspresija GRP78 inhibira aktivaciju kaspaze-7 pomoću etopozida *in vivo* i *in vitro*, kao i da subpopulacija GRP78 formira inhibitorni kompleks sa kaspazom-7 u perinuklearnom prostoru i u prostoru uz ER, inhibirajući njenu funkciju. Iako je ranije ukazano na značaj kaspaze-7 u MCF-7 ćelijskoj liniji, navedeni inhibitorni efekti povećane ekspresije GRP78 na

ovu efektorsku kaspazu nisu bili prisutni u našoj studiji, budući da je povećan proapoptotski potencijal nakon tretmana doksorubicinom i žučnim kiselinama rezultovao i u povećanim citotoksičnim efektima. Kim i sar. su pokazali da doksorubicin, nasuprot etopozidu, značajno inhibira apoptozu MCF-7 ćelijske linije nakon indukcije stresa endoplazmatskog retikuluma pomoću tapsigargina. Navedeni efekt doksorubicina je bio u asocijaciji sa smanjenom ekspresijom CEBP i njegovog transkripcionog faktora ATF4 (305). Takođe, Wang i sar. su pokazali da supresija GRP78 pomoću siRNA ili primenom 4-PBA, inhibitora stresa ER, povećava osetljivost na indukciju apoptoze u MCF-7 ćelijskoj liniji (306). Međutim, isti autori su pokazali da doksorubicin inhibira povećanu ekspresiju GRP78 indukovanu agensom DT-010 sa kojim doksorubicin ispoljava sinergistički citotoksični efekt, slično našim rezultatima kombinovane primene doksorubicina sa žučnim kiselinama. Budući da maligne ćelije karakteriše inherentna heterogenost, različiti tipovi malignih ćelija imaju različite signalne i odbrambene mehanizme koji se nalaze u osnovi razvoja rezistencije na specifičan antitumorski lek. Stoga je i uticaj GRP78 na razvoj rezistencije u različitim tipovima malignih ćelija različit. Na primer, aktivacija NF- κ B je jedan od primarnih uzroka razvoja rezistencije u EMT6 ćelijskoj liniji tumora dojke miša na TOP-II inhibišući agens tenipozid, dok u istim ćelijama indukcija GRP78 mRNA pomoću kastanospermina nije indukovala rezistenciju na tenipozid (307). Bez obzira na navedeno, povećana ekspresija *GRP78* mRNA ne mora da dovede do povećane ekspresije GRP78 proteina i, kao ni kastanospermin, žučne kiseline u našoj studiji su potencijalno mogle ispoljiti efekte koji će anulirati protektivnu funkciju GRP78. Skorašnja studija je pokazala da je primena anti-HIV agensa nelfinavira indukovala ekspresiju markera UPR uključujući GRP78 u doksorubicin-senzitivnoj MCF-7 i doksorubicin-rezistentnoj MCF-7/Dox ćelijskoj liniji (308). Međutim, multipli pretretman ovih ćelija nelfinavirom je značajno smanjio IC₅₀ doksorubicina u obe ćelijske linije. Multipli tretman nelfinavirom je takođe inhibisao ekspresiju Pgp u rezistentnoj ćelijskoj liniji i smanjio efluks doksorubicina, a takođe i inhibisao AKT puteve spasavanja ćelije i mitogene efekte IGF-1. Nasuprot multiplim tretmanima, pojedinačni tretmani ovim antiretrovirusnim lekom su povećali ekspresiju Pgp, AKT signalne puteve i autofagiju. Ova studija potvrđuje da su mehanizmi razvoja rezistencije u jednom ćelijskom tipu različiti prema različitim antineoplastcima i da jedan agens može da modulira ovu pojavu istovremenim delovanjem na više različitih mehanizama.

Iako su proteini Bcl-2 porodice inicijalno karakterizovani kao regulatori apoptoze, oni takođe kontrolišu proces autofagije. Formiranjem kompleksa sa Beclin-1, proteinom sa centralnom ulogom u autofagiji, Bcl-2/Beclin-1 kompleks ima ulogu reostata u signalizaciji ćelijskog preživljavanja ili smrti. Njegova uloga u usmeravanju ćelije ka određenom pravcu može biti različita u zavisnosti od konteksta uključujući ćelijski milje, tip poremećaja i stepen oštećenja (309). CDCA ima potencijal indukovanja autofagije što je demonstrirano povećanim intenzitetom p62-GFP fluorescencije u MCF-7, ali ne i MDA-MB-231 ćelijama, a navedeni efekat u MCF-7 ćelijama je suprimiran dodatkom 3-metiladenina, inhibitora autofagije (273). Ovi podaci ukazuju da u MCF-7 ćelijskoj liniji aktivacija autofagije može biti odgovor komplementaran apoptozi, usled deficijencije kaspaze-3.

Budući da je aktivacija nuklearnog receptora žučnih kiselina, FXR, pomoću CDCA i sintetskog agoniste GW4064 povezana sa aktivacijom apoptoze MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijskih linija karcinoma dojke (310), u ovoj studiji smo želeli da ispitamo da li kotretman MCF-7 ćelijske linije doksorubicinom i žučnim kiselinama utiče na ekspresiju *FXR* i da li postoji povezanost ekspresije ovog receptora sa postignutim citotoksičnim efektima. Tretman doksorubicinom je povećao ekspresiju *FXR* u odnosu na kontrolnu grupu, dok je kotretman sa UDCA u CDCA smanjio ekspresiju *FXR* mRNA u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo doksorubicinom. Jedino je kotretman sa 12-MKC neznatno povećao ekspresiju *FXR* u odnosu na doksorubicin. Kotretman sa CDCA, najpotentnijim endogenim agonistom ovog receptora je, paradoksalno, smanjio ekspresiju *FXR* mRNA u MCF-7 ćelijama u odnosu na kontrolnu i sve ispitivane grupe. Takođe, ekspresija *SHP*, intracelularne mete FXR koja je eksprimirana u MCF-7 ćelijskoj liniji se nije menjala u skladu sa promenama ekspresije *FXR*. Navedeni rezultati genske ekspresije se mogu objasniti uticajem epigenetskih faktora koji su indukovali ili inhibirali ekspresiju ispitivanih gena na paradoksalan način.

Histon acetiltransferaza p300 katališe acetilaciju lizinskih rezidua ne samo unutar histona u okviru nukleozoma, već i nehistskih proteina uključujući nuklearne receptore, bazalne transkripcione faktore i kofaktore, čime povećava nivo genske transkripcije i predstavlja značajan regulator ekspresije *FXR* i *SHP* gena (311). Nivo FXR acetilacije je recipročno regulisan pomoću p300 acetilaze i SIRT1 deacetilaze. Acetilacija lizina-217 u okviru spojničnog domena FXR pomoću p300 smanjuje heterodimerizaciju sa RXR čime se smanjuje afinitet

vezivanja za DNA i redukuje transaktivaciona aktivnost (312). Budući da je acetilacija uopšteno povezana sa aktivacijom genske ekspresije, inhibitorni efekt FXR acetilacije je paradoksalan fenomen. Doksorubicin indukuje ekspresiju p300 pomoću autoacetilacije i stabilizacije i smanjuje proteazomalnu degradaciju p300 (313). Navedena indukcija p300 dovodi do aktivacije STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) kao medijatora odbrane protiv oksidativnog stresa. Aktivacija p300 u toku tretmana doksorubicinom i žučnim kiselinama, kao posledica povišenog oksidativnog stresa može biti jedan od potencijalnih mehanizama smanjenja ekspresije FXR u MCF-7 ćelijskoj liniji. Takođe, aktivacija drugih epigenetskih mehanizama regulacije ekspresije FXR i SHP mogu biti objašnjenje dobijenih rezultata (2). Krattinger i sar. su u rezultatima nedavno objavljene studije ukazali da miR-192 negativno reguliše ekspresiju FXR i kao i ciljnih gena ovog transkripcionog faktora (314). *In silico* studijom je prediktovano postojanje dva putativna miR-192-3p-vezujuća mesta u okviru 3' UTR regiona FXR, što je i potvrđeno *in vitro*. Povišene serumske koncentracije miR-192 u serumu su detektovane u toku različitih bolesti jetre uključujući lekovima-indukovano oštećenje jetre, nealkoholni steatohepatitis, holangiokarcinom i hepatocelularni karcinom povezan sa hepatitisom B i pretpostavlja se da miR-192 može da predstavlja dijagnostički i prognostički biomarker u ovim oboljenjima. Takođe, tkivno-specifična inflamacija indukuje ekspresiju miR192 (315). Ekspresija miR-192 je u inverznoj korelaciji sa metastatskim potencijalom ćelija karcinoma kolona (316). *In vivo* studije ukazuju da miR-192 reguliše ekspresiju BCL2, ZEB2 (*Zinc-Finger E-Box-Binding Homeobox 2*) i vaskularnog endothelnog faktora rasta A, značajnih antiapoptotskih faktora i regulatora angiogeneze. Tumor supresor p53 takođe ima ulogu transkripcionog faktora u okviru promotera miR-192 i mutacijom-izazvan gubitak funkcije p53 posledično smanjuje ekspresiju miR-192 što predstavlja jedan od najznačajnijih događaja u karcinogenezi kolona (317). Ovi rezultati ukazuju na postojanje FXR-p53 signalne mreže u kojoj je miR-192 jedan od epigenetskih regulatornih mehanizama. Osim miR-192, miR-421 kao onkogeni miR u bilijarnom sistemu reguliše ekspresiju FXR (318). Dakle, na osnovu rezultata navedenih studija može se pretpostaviti da je tretman žučnim kiselinama doveo do povećane ekspresije miRNA koje se vezuju za 3' UTR mRNA koja kodira sintezu FXR.

Metabolička osovina koja povezuje p53 i žučne kiseline predstavlja novu identifikovanu funkciju ovog proteina čuvara genoma. p53 je identifikovan kao regulator homeostaze žučnih kiselina budući da miševi sa mutiranim (*knock-out*) *p53* (*p53^{-/-}*) imaju povišen nivo žučnih

kiselina u odnosu na *wild-type* životinje, pri čemu SHP predstavlja ključni medijator p53-posredovane regulacije homeostaze žučnih kiselina. Štaviše, tretman životinja doksorubicinom kao induktorom p53 je rezultovao u smanjenju količine žučnih kiselina u serumu i jetri. Ovaj efekt se postiže zahvaljujući sposobnosti p53 da direktno aktivira ekspresiju *SHP* preko p53RE (*p53-Response Elements*) u *SHP*. Vezivanje p53 za distalni region *SHP* pokreće uspostavljanje aktivnog hromatina u proksimalnim regionima promotera *SHP*, i povećava ekspresiju ovog gena (319). Međutim, aktivacija FXR njegove direktne mete SHP dovodi do represije p53, kao glavnog aktivatora miR-34a, smanjujući transaktivacionu aktivnost p53 na nivou miR-34a promotera (320). Ovi rezultati ukazuju da p53 i SHP regulišu međusobnu ekspresiju preko multiplih autoregulatornih mehanizama. Jedan od potencijalnih mehanizama se ostvaruje preko MLL3 (*Histone H3-Lysine-4 Methyltransferase Mixed-Lineage Leukemia 3*) komponente ASCOM (MLL2/MLL3) kompleksa koaktivatora multiplih transkripcionih faktora uključujući FXR i p53 (321). Smatra se da MLL3 funkcioniše kao koaktivator u toku transaktivacije p53-ciljnih gena uključujući *SHP* i da doprinosi stvaranju aktivnog hromatina u *SHP* lokusu. Aktivacija p53 pomoću doksorubicina indukuje p21 i SHP i rezultuje u smanjenju ekspresije CYP7A1 i CYP8B1 čime se smanjuje veličina pula žučnih kiselina, međutim inaktivacijom MLL ovaj odgovor izostaje (319, 322). MLL se regrutuje sa FXR i p53 pomoću različitih proteina adaptora kao što su ASC-2 (*Nuclear Receptor Coactivator 6*) ili p53BP1 (*Tumor Suppressor p53-Binding Protein 1*) i nezavisno koaktivira u FXR- ili p53-zavisnoj transaktivaciji *SHP*. Protein-arginin N-metiltransferaza 5 (PRMT5) pripada porodici PRMT koja katalizuje transfer metil grupe sa S-adenozil metionina na azot gvanidino grupe arginina. PRMT5 takođe vrši metilaciju histona i nehistonskih proteina i deluje kao transkripcioni represor metilacijom histona H3 i H4. PRMT5 takođe ima ključnu ulogu u BRG1 (*Brahma-Related Gene-1*) - zavisnom remodelovanju hromatina i aktivacije gena, i reguliše funkciju p53 u odgovoru na oštećenje DNA (323). Žučne kiseline značajno indukuju PRMT5-posredovanu metilaciju SHP na arginin-57 položaju potencirajući SHP-posredovanu represiju CYP7A1, HNF-4 i LRH-1 (324). Tretman semisintetskim derivatom žučnih kiselina, OCA, indukuje interakciju FXR/RXR i PRMT1 i povećava ekspresiju SHP (325). Ispitivanje mehanizama epigenetske regulacije FXR, SHP i njihovih ciljnih gena je u fokusu intenzivnog istraživanja, a razumevanje kompleksnosti ovih interakcija predstavlja značajan izazov za buduće studije.

Rezultati epidemioloških studija su povezali povećanu incidenciju karcinoma dojke kod gojaznih žena sa savremenom ishranom bogatom mastima i povećanom koncentracijom cirkulišućih žučnih kiselina u organizmu (326, 327). U prilog tome govore i rezultati studije koja je utvrdila visok nivo DCA kod postmenopauzalnih žena sa novodijagnostikovanim karcinomom dojke, kao i činjenice da su žučne kiseline CA, CDCA i DCA prisutne u visokim, mikromolarnim koncentracijama u fluidu uzorkovanom kod fibrocističnih promena dojke kod žena u postmenopauzi, koje su do 20 puta više u poređenju sa koncentracijama u krvnoj plazmi (328, 329). Imunohistohemijskom analizom je pokazano da je FXR eksprimiran u normalnim duktalnim epitelnim ćelijama dojke, ali i u uzorcima tkiva duktalnog infiltrativnog karcinoma (310). Takođe je u istoj studiji potvrđeno da aktivacija FXR pomoću CDCA i GW4064 može da indukuje apoptozu u MCF-7 i MDA-MB-468 ćelijskim linijama, bez obzira na status estrogenskog receptora (310). Povezanost aktivacije FXR i apoptoze je potvrđena upotrebom siRNA i FXR-DN. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima druge studije koja je pokazala da DCA u niskim koncentracijama (10 μ M) promoviše preživljavanje i migraciju MDA-MB-231 ćelija karcinoma dojke. Međutim u istoj studiji je pokazano da više koncentracije DCA (100-150 μ M) koje odgovaraju EC₅₀ dozi za aktivaciju FXR, aktiviraju apoptozu u ovim ćelijama (330). Pored indukcije apoptoze, aktivacija FXR u MCF-7 ćelijama je dovela do smanjenja ekspresije aromataze kao i transportera MDR3, MRP1, SLC7A5 (310). Inhibicija MRP1 ima povoljna svojstva u smislu prevencije razvoja hemorezistencije, dok u normalnom tkivu dojke inhibicija ovog transportnog proteina može da inhibira laktaciju. Takođe inhibicija SLC7A5, transportera uključenog u preuzimanje neutralnih aminokiselina, koji takođe ima značajnu ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija, može da doprinese antiproliferativnim efektima FXR. Aromataza (CYP19) je ključni enzim u lokalnoj produkciji estrogena u tumorskom tkivu dojke. Inhibitori katalitičke aktivnosti aromataze su efektivniji u odnosu na tamoksifen kao adjuvantna terapija karcinoma dojke, međutim ovi agensi mogu da redukuju mineralizaciju kosti. Inhibicija aromataze aktivacijom FXR, preko FXR-SHP-LRH1 kaskade koja je prisutna i funkcionalno aktivna u tkivu karcinoma dojke može da predstavlja ciljanu terapiju karcinoma dojke, naročito ukoliko cilja alternativni promotor II koji je funkcionalan u tkivu dojke ali ne i u koštanom tkivu. Na ovaj način, kumulacija žučnih kiselina kod pacijentkinja sa karcinomom dojke i aktivacija FXR ima protektivni karakter. U tumorskim linijama Lajdigovih ćelija, aktivacija FXR pomoću CDCA takođe inhibiše ekspresiju aromataze zahvaljujući potencijalu FXR kao transkripcionog

faktora da se kompeticijom sa steroidogenim faktorom 1 veže za zajedničku sekvencu regiona PII promotera aromataze inhibišući njegovu aktivnost. Zahvaljujući inhibiciji aromataze, smanjenju ekspresije ciklina D1 i E, tretman sa CDCA je doveo do supresije proliferacije R2C malignih Lajdigovih ćelija pacova, dok je antiproliferativni efekt anuliran u ćelijama sa utišanom transkripcijom FXR (331).

Journe i sar. su demonstrirali FXR-zavisnu transaktivaciju estrogenog receptora dejstvom farnezola u MCF-7 ćelijskoj liniji, bez prisustva estrogena, što je rezultovalo povećanim mitogenim efektima (332). Takođe isti autori su pokazali da CDCA aktivira proliferaciju MCF-7 ćelijske linije u medijumu bez seruma, dok u estrogenima-suplementiranom medijumu CDCA nije ispoljila navedeni efekt kao ni u estrogen-receptor negativnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji (333). Utišavanje FXR pomoću specifične siRNA je delimično suprimiralo proliferativni odgovor MCF-7 ćelija na CDCA, dok je primena antiestrogena u potpunosti suprimirala mitogeno dejstvo CDCA na ovoj ćelijskoj liniji. Navedeni rezultati ukazuju na prisustvo međusobne komunikacije između FXR i estrogenog receptora, kao i da žučne kiseline mogu da aktiviraju estrogeni receptor u MCF-7 ćelijskoj liniji. Takođe, smanjena ekspresija FXR u estrogen receptor-negativnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji je u skladu sa rezultatima drugih studija koji pokazuju da je ekspresija FXR smanjena u manje diferentovanim malignim ćelijama s obzirom da je ekspresija *FXR* mRNA smanjena u ćelijama adenoma kolona u odnosu na normalan epitel, još više smanjena u karcinomu kolona i gotovo nedetektabilna u ćelijama nediferentovanog karcinoma kolona SW480 i SW620 ćelijama poreklom iz metastaza (334). Hronična administracija estrogena povećava ekspresiju SHP u tkivu jetre miševa što ukazuje na transaktivacionu povezanost estrogenog receptora i FXR. Studija na HepG2 ćelijama je demonstrirala postojanje preklapanja u okviru FXR- i estrogeni receptor- α -vezujućeg mesta u regionu promotera SHP, pri čemu simultano vezivanje i estrogenog receptora i FXR u ovom regionu nije moguće (335). Zaista, estradiolom-indukovano povećanje ekspresije SHP kod miševa nije bilo prisutno u grupi životinja koje su ishranom unosile FXR agonistu, holnu kiselinu. Nemogućnost estrogenog receptora da indukuje ekspresiju SHP kod životinja kod kojih je prethodno aktiviran FXR receptor je u skladu sa identifikovanim preklapanjem sekvenci (335).

U studiji Alasmael i sar. je pokazano da aktivacija FXR pomoću CDCA kao i sintetskog FXR liganda GW4064 u MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama, rezultuje u apoptozi ćelija unutrašnjim apoptotskim putem (273). Inhibicija FXR signalne mreže transfekcijom FXR-DN (*Dominant Negative*) eksprimirajućeg plazmida je dovela do redukcije CDCA- i GW4064-posredovane ćelijske smrti u obe ćelijske linije, usled inhibicije apoptoze i autofagije. Navedeni rezultati prema kojima aktivacija FXR u ćelijama adenokarcinoma dojke rezultuje u ćelijskoj smrti, identifikuje FXR kao potencijalnu terapijsku metu i agoniste ovog receptora kao potencijalne terapijske agense. Međutim, brojne studije ukazuju da aktivacija FXR utiče na migracioni/invazivni fenotip malignih ćelija, iako su rezultati često nekonzistentni. Fukase i sar. su objavili pozitivne efekte FXR aktivacije na migraciju Hep3B ćelija hepatoma, a Stauch i sar. su primetili slične efekte na intestinalnim epitelnim ćelijama (336, 337). Nasuprot tome, pokazano je da supresija FXR pomoću mikro RNA (miR)-421 promoviše proliferaciju i migraciju HepG2 i Hep3B ćelijskih linija hepatoma, kao i da aktivacija FXR suprimira migraciju glatkih vaskularnih mišićnih ćelija (338, 339). Međutim, aktivacija FXR pomoću CDCA ili GW4046 nije uticala na stvaranje proinvazivnog fenotipa MCF-7 i MDA-MB-231 ćelija sugerišući da je interakcija između aktivacije FXR i ćelijske migracije/invazije kompleksna i ćelijski specifična (273).

Giordano i sar. su zabeležili dozno zavisnu inhibiciju MCF-7 ćelijske linije nakon inkubacije sa CDCA, kao i kod tamoksifen rezistentnih MCF-7 ćelija, dok ovaj efekat nije ispoljen na MCF-10A ćelijskoj liniji normalnih epitelnih ćelija dojke (340). U ovoj studiji je pokazano da aktivacija FXR pomoću CDCA i sintetskog agoniste GW4064 smanjuje ekspresiju HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) u estrogen receptor pozitivnim MCF-7 ćelijama rezistentnim na tamoksifen. Studije mutageneze, imunoprecipitacije hromatina i eseja promene elektroforezne mobilnosti (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) su pokazale da se ovaj proces vrši pomoću inhibicije vezivanja NF- κ B za svoj responsivni element u regionu HER2 promotera, što rezultuje u značajnoj redukciji proliferacije tamoksifen-rezistentnih ćelija. Takođe, IC₅₀ vrednost za CDCA kod tamoksifen rezistentne ćelijske linije je bila niža u odnosu na MCF-7 ćelijsku liniju što ukazuje da su tamoksifen-rezistentne ćelije senzitivnije na dejstvo CDCA. Osim toga, kotretman sa CDCA i tamoksifenom je značajno inhibisao proliferaciju tamoksifen-rezistentnih ćelija, u odnosu na grupu tretiranu samo tamoksifenom, dok na MCF-7 ćelijama ovaj aditivni efekat nije primećen. Rezultati ove studije ukazuju da FXR ligand-zavisna

aktivacija putem inhibicije HER2/MAPK signalnih puteva može prevazići rezistenciju na antiestrogene, predstavljajući nov terapijski modalitet kod pacijenata sa karcinomom dojke sa razvojem rezistencije na antiestrogene (340). Ovom studijom je pokazano da se smanjena ekspresija mRNA za HER2 nalazi u osnovu sposobnosti CDCA-aktiviranog FXR da inhibira proliferaciju tamoksifen-rezistentne ćelijske linije. Dakle, aktivacija FXR može da ima tumor-supresivne ali i tumor-promovišuće efekte, a navedena diferencijalna regulacija se odlikuje ćelijskom specifičnošću i inherentnim razlikama među tkivima, uključujući balans ili zastupljenost različitih koaktivatora i korepresora.

Kao genotoksični agens, doksorubicin aktivira interakciju tumor supresora p53 sa DNA. Naše ispitivanje ekspresije *p53* gena u MCF-7 ćelijskoj liniji je pokazalo neočekivane rezultate, veoma slične rezultatima aktivacije *FXR*. Aktivacija *p53* gena je bila povećana u grupi ćelija tretiranih doksorubicinom, dok je kotretman sa UDCA i CDCA značajno smanjio ekspresiju ovog transkripcionog faktora, faktora genotoksičnog stresa. Jedino je kotretman sa 12-MKC povećao ekspresiju *p53* u odnosu na kontrolnu i sve eksperimentalne grupe. O međusobnoj povezanosti regulacije ekspresije *p53*, *FXR* i *SHP* na transaktivacionom i epigenetskom nivou je već bilo reči, a navedeni mehanizmi su potencijalno objašnjenje sličnosti dobijenih rezultata ekspresije *FXR* i *p53*.

Na osnovu ključne uloge p53 u fazi egzekucije pojedinih formi apoptoze izazvane genotoksičnim stresom, pretpostavlja se da upravo ovaj tumor supresor ima značajnu ulogu u citotoksičnoj aktivnosti antraciklina kao genotoksičnih agenasa. Brojne pretkliničke studije su potvrdile ovaj koncept, međutim heterogenost tumora u odnosu na p53 status i pojava mutacija u *p53* genu su faktori sa izuzetno značajnim terapijskim implikacijama jer determinišu terapijski odgovor (341, 342). Doksorubicin-zavisna aktivacija p53 doprinosi aktivaciji p21 (WAF1/CIP1), inhibitora ciklin-zavisnih kinaza uključenih u regulaciju G1-S tranzicije, odnosno zaustavljanje ćelijskog ciklusa na prelazu G1/S ili G2/M faze (343). Smatra se da je ovaj mehanizam odgovoran p53-zavisno zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G1 fazi, međutim pokazano je da ekspresija WAF1 može da smanji citotoksični efekat doksorubicina usled reparacije DNK u G1 fazi. Predloženi mehanizmi pomoću kojih p21 inhibira apoptozu malignih ćelija obuhvataju direktno vezivanje za i inhibiciju prokaspaze-3, inhibiciju ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*), inhibiciju ciklin-zavisnih kinaza neophodnih za apoptozu kao i regulaciju genske

ekspresije usled direktne interakcije sa nekoliko transkripcionih faktora i kofaktora. Naime, pokazano je da ciljana inhibicija p21 putem siRNA dovodi do intenziviranja apoptoze u dve ćelijske linije karcinoma kolona tretirane sa 0,3 μ M doksorubicina, što potvrđuje njegovu ulogu inhibitora apoptoze nakon genotoksičnog oštećenja DNA (344). Konstitutivno povišena ekspresija WAF1/CIP1 proteina je udružena sa pojavom hemorezistencije malignih ćelija (345). Osim toga, mogućnost da ćelije sa mutiranim p53 uđu u S fazu ciklusa može da ima željene efekte budući da se ekspresija alfa izoforme TOP-II povećava u toku replikacije DNK. Povećana ekspresija p53 se ne povezuje isključivo sa aktivacijom apoptotske kaskade, nego i sa ukupnim brojem prekida DNK lanca indukovanih doksorubicinom. Studije na ćelijama sa normalnim i mutiranim p53 su pokazale sličan nivo ekspresije i aktivnosti TOP-II u oba ćelijska tipa, međutim, intenzivnije oštećenje DNK je zabeleženo u ćelijama sa normalnim p53 statusom (346). Pretpostavlja se da interakcija p53 sa TOP-II inhibira ligaciju lanaca DNK dovodeći do kumulacije ireverzibilnih prekida. Međutim, u antraciklin-indukovanoj apoptozi postoje i brojni signalni putevi koji ne zahtevaju funkcionalan p53 i nisu povezani sa aktivnošću TOP-II. Na primer, klinički relevantne koncentracije antraciklina mogu da iniciraju cikličnu kaskadu hidrolize sfingomijelina i stvaranje ceramida koji zatim aktivira puteve ćelijske smrti koji ne uključuju p53-zavisnu JNK i c-JUN/AP-1 serin-treonin AKT inaktivaciju i smanjenje aktivnosti AKT/protein kinaza B puta za preživljavanje (347). Aktivacija p53 takođe smanjuje ekspresiju transkripcionog faktora E2F, što rezultuje u arestu ćelijskog ciklusa usled nemogućnosti vezivanja E2F za promotorne regione gena od značaja za ćelijski rast, kao što su dihidrofolat reduktaza, timidin kinaza, timidin sintetaza i DNA polimeraza alfa (348).

Prilikom izlaganja ćelija i tkiva dejstvu antineoplastika moguća je pojava povećane ekspresije gena koji utiču na zaštitu zdravih ćelija i tkiva od dejstva ksenobiotika, ali takođe i u alterisanim ćelijama pri čemu se javlja hemorezistencija. Ovi protektivni mehanizmi (*Mechanisms of Chemoresistance*, MOC) obuhvataju redukciju preuzimanja (MOC-1a) i povećan efluks leka/toksina (MOC-1b), redukciju metaboličke aktivacije proleka ili povećanje metaboličke inaktivacije (MOC-2), alteracije molekularnih meta (MOC-3), poboljšanu reparaciju DNA (MOC-4) i modifikaciju balansa proapoptotskih mehanizama (MOC-5a) nasuprot mehanizmima preživljavanja (MOC-5b) (349).

Poznato je da žučne kiseline mogu da utiču na ekspresiju gena što je posredovano zaštitnim mehanizmima kao što su oksidacioni enzimi faze I biotransformacije (CYP3A4), konjugacioni enzimi faze II (SULT2A1 i UGT2B4) i transporteri faze III (BSEP, MDR3) (1). U skladu sa tim, u okviru ove studije smo želeli da utvrdimo da li žučne kiseline modifikuju na transkripcionom nivou ekspresiju efluks transportnih proteina za doksorubicin, *MDR1*, *MRP1* i *MRP2* za koje su ujedno žučne kiseline i supstrati, kao i da utvrdimo da li menjanju ekspresiju gena za enzime *AKR1A1* i *CBR1* odgovornih za dvoelektronsku redukciju odn. hidroksilaciju doksorubicina u doksorubicinol, u MCF-7 ćelijskoj liniji.

Tretman MCF-7 ćelija doksorubicinom je rezultovao u povećanju ekspresije *MDR1* mRNA, dok je kotretman ćelija doksorubicinom i svim ispitivanim žučnim kiselinama značajno redukovao ekspresiju mRNA ovog transportera u odnosu na pozitivnu kontrolnu grupu. Kotretman sa UDCA je doveo do značajnog smanjenja *MDR1* u odnosu na kontrolnu grupu. Navedeni rezultati ukazuju da su odabrane žučne kiseline smanjenjem ekspresije mRNA za Pgp smanjile efluks doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji posredstvom ovog transportera, potencijalno povećavajući koncentraciju doksorubicina u ćelijama što je u skladu sa dobijenim rezultatima citotoksičnosti i proapoptotskog potencijala. Nakon inkubacije ćelija sa doksorubicinom ekspresija *MRP1* transportera je bila neznatno snižena u odnosu na netretiranu grupu ćelija, dok je tretman kotretman doksorubicinom i žučnim kiselinama ispoljio različite efekte: UDCA je smanjila ekspresiju *MRP1* u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolnu grupu dok su CDCA i 12-MKC značajno povećale *MRP1* u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom i kotretiranih doksorubicinom i UDCA. Takođe, ekspresija *MRP2* je bila gotovo nepromenjena nakon tretmana ćelija doksorubicinom i doksorubicinom sa UDCA dok je kotretman sa CDCA i 12-MKC značajno povećao ekspresiju *MRP2* u odnosu na ostale grupe. Budući da se pomoću *MRP1* transportera vrši transport konjugata sa glutationom, a pomoću *MRP2* transportnog proteina vrši i kotransport žučnih kiselina sa redukovanim glutationom (350), rezultati povećane ekspresije mRNA ovih transportnih proteina u CDCA i 12-MKC kotretiranim grupama su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima smanjene aktivnosti glutation-zavisnih enzima antioksidativne zaštite GPx kao i detoksikacionog enzima GST u MCF-7 ćelijskoj liniji.

U skladu sa našim rezultatima, Komori i sar. su pokazali da UDCA smanjuje doksorubicinom-indukovanu ekspresiju Pgp u HepG2 ćelijama (351). Naime u ovoj studiji je utvrđeno da UDCA kao agens sa antioksidativnom ulogom redukuje doksorubicinom-indukovano povećanje produkcije ROS i povećanje ekspresije Pgp. Navedeni efekti su rezultovali u smanjenom preuzimanju Pgp supstrata rodamina 123 (Rho123) u HepG2 ćelijama pretretiranim doksorubicinom, dok sama UDCA nije ispoljila efekte na preuzimanje Rho123 u ćelijama hepatoma. Na osnovu dobijenih rezultata, i prihvatljivog bezbednosnog profila UDCA u kliničkoj primeni predložena je da klinička administracija UDCA kod pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom, pre ili istovremeno sa administracijom doksorubicina, može da prevenira Pgp-posredovan efluks leka. Takođe je predložena primena UDCA u cilju sprečavanja indukcije Pgp kod pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom kod kojih se doksorubicin primenjuje u tretmanu transarterijalnog tromboembolizma. U navedenoj studiji je CDCA takođe smanjila doksorubicinom-indukovanu povećanu ekspresiju Pgp, dok sekundarne žučne kiseline DCA i LCA nisu uticale na nivo Pgp-a i preuzimanje Rho123. Nasuprot ovim rezultatima UDCA je povećala ekspresiju MDR1 mRNA u Caco-2 ćelijama, ali ne i u LS-174T ćelijskoj liniji adenokarcinoma kolona (352). Kneuer i sar. su pokazali da CDCA povećava ekspresiju MDR1 u *Madin Darby* renalnim epitelnim ćelijama psa (353). Međutim u studiji Komori i sar. UDCA i CDCA nisu uticale na bazalni nivo ekspresije MDR1, već su prevenirale doksorubicinom- tj. ROS-indukovanu ekspresiju Pgp. Yang i sar. su u studiji na RBE4 ćelijskoj liniji endotela moždanih krvnih sudova pokazali da 12-MKC povećava kumulaciju Rho123 i predložili model po kojem 12-MKC inhibira Pgp specifičnim formiranjem vodoničnih veza sa ovim proteinom (354). Takođe je pokazano da CA, DCA tauro-CA ne utiču na funkciju multirezistentnih ćelija i ćelija kanalikularne membrane jetre pacova, dok tauro-CDCA, gliko-CDCA i UDCA inhibišu efluks posredstvom Pgp u oba sistema, što je u skladu sa našim rezultatima (355). UDCA ispoljava antiholestatske efekte stimulacijom insercije MRP2 transportnog proteina u membranu na apikalnom polu hepatocita kao i povećanjem ekspresije BSEP transportera. Navedeni posttranslacioni antiholestatski efekti nastaju kao rezultat kooperativnog cPKC/PKA-zavisnog mehanizma i fosforilacije transportnih proteina (356). Takođe, CDCA, aktivacijom FXR povećava ekspresiju MRP2 na apikalnom polu hepatocita povećavajući sekreciju žuči u cilju redukcije hepatocelularnog oštećenja izazvanog prekomernim nakupljanjem žučnih kiselina (6). Rezultati navedenih studija ukazuju da različite žučne kiseline ispoljavaju različite efekte na

ekspresiju efluks transportnih proteina, ali i da je modulacija ekspresije transportera tkivno-specifična.

Budući da je transkripcija ispitanih transportnih proteina pod kontrolom više različitih nuklearnih receptora, pre svega PXR, CAR i FXR, postoji mogućnost da su CDCA i 12-MKC interakcijom sa ovim transkripcionim faktorima povećale ekspresiju *MRP1* i *MRP2* u okviru mehanizama MOC-1b. U prilog navedenoj tvrdnji stoji činjenica da hidrofilna UDCA nije ligand za navedene receptore i da iz tog razloga nije menjala ekspresiju *MRP1* i *MRP2*, što ukazuje da UDCA može imati potencijalno protektivna svojstva u prevenciji indukcije rezistencija malignih ćelija na antineoplastičke agense posredstvom MOC-1b mehanizmima.

Ekspresija mRNA za *AKR1A1* u MCF-7 ćelijskoj liniji je bila povišena u svim grupama ćelija kotretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama u odnosu na kontrolnu grupu i grupu ćelija tretiranih doksorubicinom. Ekspresija *CBR1* je bila nepromenjena nakon tretmana doksorubicinom i kotretmana sa doksorubicinom i UDCA, dok su kotretman sa CDCA i 12-MKC značajno povećali ekspresiju *CBR1*.

Karbonil reduktaze su NADPH-zavisni proteini koji redukuju ketone i aldehide u sekundarne i primarne alkohole u okviru faze I metabolizma lekova. Ovim reakcijama se povećava hidrofilnost leka, a samim tim omogućavaju reakcije faze II ili ekskrecija. U zavisnosti od primarne strukture i konzerviranosti sekvenci karbonil reduktaze su klasifikovane kao AKR (*Aldo-Keto Reductases*) ili SDR (*Short-Chain Dehidrogenase/Reductase*). AKR superfamilija obuhvata 15 proteina koji se nalaze uglavnom u citosolu i pripadaju AKR1, AKR6 i AKR7 familijama. AKR1 familija je najveća i u okviru ove familije su identifikovani AKR1A1 i AKR1C1 kao enzimi koji vrše konverziju doksorubicina u doksorubicinol (357). Pored AKR1A1, CBR1 vrši hidroksilaciju doksorubicina u kardiomiocitima, jetri ali i u MCF-7 ćelijskoj liniji (189). Heibain i sar. su demonstrirali da se doksorubicinol kumulira u lizozomima za razliku od doksorubicina koji se lokalizuje u nukleusu malignih ćelija (358). Hidroksilacija doksorubicina u doksorubicinol smanjuje afinitet vezivanja za proteazom i značajno smanjuje afinitet vezivanja za DNA. Takođe, doksorubicinol nema sposobnost inhibicije TOP-II čime se značajno smanjuje citotoksičnost i antitumorska aktivnost. Povećana ekspresija karbonil reduktaza se vezuje za pojavu rezistencije u malignim ćelijama (MOC-2) pri čemu je za doksorubicin-rezistentnu MCF-7/Dox ćelijsku liniju pokazana povećana transkripcija *AKR1C2*,

AKRIC3 i *AKR1B10*. Primena inhibitora AKR, β -holanske kiseline, je dovela do restoracije nuklearne lokalizacije doksorubicina u rezistentnim ćelijama (358). Antraciklinski alkoholi, doksorubicinol i idarubicinol, ipak zadržavaju sposobnost indukovanja oštećenja DNA i to dvostruko više u odnosu na osnovne molekule (189). Pored ove osobine, povećana polarnost ovih molekula uz produženo zadržavanje u ćeliji uz povećano oslobađanje kalcijuma je odgovorno za pojavu neželjenih dejstava, naročito pojavu odložene kardiomiopatije. Miševi sa utišanim CBR1 genom imaju značajno smanjenu koncentraciju doksorubicinola u cirkulaciji nakon tretmana doksorubicinom, i redukovane celularne alteracije povezane sa kardiotsičnim efektima na histološkom nivou. Suprotni, nakon tretmana doksorubicinom transgeni miševi sa povećanom ekspresijom CBR1 u miokardu imaju značajno manju stopu preživljavanja usled oštećenja kardiomiocita (359). Takođe, farmakološka ili genska inhibicija CBR1 je poboljšala efikasnost doksorubicina kod imunodeficientnih miševa sa agenezom timusa (*nude mice*) kojima su implantirane MDA-MB-157 ćelije i smanjila kardiotsične efekte na ovom *in vivo* animalnom modelu karcinoma dojke. Nasuprot tome, povećana ekspresija CBR1 u MCF-7 i MDA-MB-157 ćelijskim linijama je rezultovala u razvoju rezistencije na doksorubicin (360). Na ovaj način je demonstrirano da inhibicija CBR1 predstavlja atraktivnu farmakološku metu sa ciljem prevencije razvoja rezistencije malignih ćelija na antracikline i sprečavanjem kardiotsičnih neželjenih dejstava.

U našem prvom *in vivo* ogledu je ispitan uticaj žučnih kiselina na odložene toksodinamske efekte doksorubicina u živom sistemu, sa fokusom na hepatotoksične i kardiotsične efekte. Životinje su tretirane naizmeničnom primenom žučne kiseline UDCA, CDCA ili 12-MKC, *per os* i doksorubicinom intraperitonealno. Nakon tretmana u trajanju od šest dana i pauze u tajanju od tri sedmice životinje su eutanazirane (**slika 3.4.1**). Tretman žučnim kiselinama, koje su primenjene u ekvimolarnim koncentracijama, je započet jedan dan pre administracije doksorubicina. Odabrana doza UDCA od 25 mg/kg je poslužila kao referentna doza budući da se ova doza često primenjuje u *in vivo* oledima u kojima ispoljava antioksidativne efekte i u odnosu na nju su određene doze drugih primenjenih žučnih kiselina. Kumulativna doza doksorubicina od 9 mg/kg je ekvivalentna dozi od 630 mg doksorubicina kod čoveka telesne mase 70 kg, kod čije primene se očekuje pojava kardiomiopatije (361).

Upotrebu doksorubicina kao jednog od najčešće korišćenih antitumorskih agenasa ograničava pojava toksičnih neželjenih dejstava, naročito kardiotoksičnosti i hepatotoksičnosti. Enzimski-katalisanom jednoelektronskom redukcijom hinona doksorubicina u semihinonski radikal kao i neenzimskim formiranjem kompleksa doksorubicina sa jonima gvožđa, dolazi do hiperprodukcije ROS, što se smatra jednim od osnovnih mehanizama toksičnih efekata doksorubicina. Takođe, primena doksorubicina uzrokuje disfunkcionalnost mitohondrijalne respiratorne funkcije što uz amplifikaciju produkcije ROS uvodi normalne ćelije u programiranu ćelijsku smrt. Doksorubicin utiče na respiratorne procese kardiomiocita na više načina. *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da dolazi do inhibicije NADH i sukcinat oksidaze, ali i da dolazi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta u mitohondrijama (201). Doksorubicin se pomoću kompleksa I ETS konvertuje u toku redoks ciklusa u semihinonski radikal (362). Za razliku od maligno alterisanih ćelija, kojima se energetske potrebe uglavnom zadovoljavaju procesima anaerobne glikolize, u oksidativnom miljeu kardiomiocita i hepatocita nesporeni elektron semihinona se predaje molekularnom kiseoniku pri čemu nastaje superoksid anjon radikal. Superoksid može biti razgrađen pod dejstvom SOD na molekularni kiseonik i vodonik peroksid. Nastali vodonik peroksid može biti neutralisan pod dejstvom enzima CAT ili pomoću selen-zavisne GPx. Dakle, antioksidativna zaštita enzimskim sistemima u ćeliji zavisi od količine i aktivnosti enzima kao i od prisustva redukovanog glutationa. Kardiomiociti eksprimiraju vrlo male količine antioksidativnih enzima kao što su CAT i GPX, uprkos značajnom intenzitetu mitohondrijalne respiracije kao jednog od faktora produkcije endogenih ROS. Takođe, tretman doksorubicinom smanjuje proteinski nivo i aktivnost CAT, GPx i Cu,Zn-SOD u kardiomiocitima (230, 231). Deplecija aktivnosti ovih antioksidativnih enzimskih sistema čini kardiomiocite vulnerabilnim na pojavu oštećenja mitohondrija i indukciju apoptoze. Povećanje ekspresije Mn-SOD deluje protektivno na nivou mitohondrija, što je praćeno smanjenjem serumskih markera antraciklinima-indukovane ćelijske smrti kardiomiocita (231).

Naši rezultati pokazuju da su nakon pauze u tretmanu u trajanju od tri sedmice, promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u miokardu i jetri bile prisutne, što ukazuje da je tretman doksorubicinom indukovao oksidativni stres u *in vivo* sistemu. Koncentracija MDA kao indikatora peroksidacije lipidnih membrana je bila povišena u homogenatima srca i jetre u grupama životinja tretiranih doksorubicinom što je u skladu sa prooksidantnom aktivnošću doksorubicina. Intenzitet lipidne peroksidacije u jetri životinja kotretiranih doksorubicinom i

žučnim kiselinama je bio snižen do vrednosti bliskim kontrolnim što ukazuje su žučne kiseline u jetri indukovale aktivnost antioksidativnog sistema, dok je u miokardu ovih grupa životinja nivo MDA bio povišen u UDCA i 12-MKC kotretiranim grupama. Aktivnost antioksidativnih enzima je bila tkivno-specifično promenjena u eksperimentalnim grupama što ukazuje da su žučne kiseline ispoljile određen stepen antioksidativne aktivnosti stimulacijom modulacijom aktivnosti i transkripcije antioksidativnih gena.

Gvožđe takođe povećava toksičnost antraciklina učestvovanjem u reakcijama konverzije relativno bezbednih superoksid i peroksidnih radikala u visoko reaktivni, toksični hidroksilni radikal ili komplekse gvožđe peroksida koji uzrokuju oksidativno oštećenje DNA, proteina i lipidnih membrana (363). Veoma je značajno što redoks ciklus hinona omogućava antraciklinima da povećaju ćelijske količine gvožđa, mobilizacijom iz feritina (364). Tokom tretmana doksorubicinom dolazi do ciljane kumulacije gvožđa u mitohondrijama što amplifikuje produkciju ROS (365). Jedan od najboljih pokazatelja značaja gvožđa u doksorubicinom-indukovanoj apoptozi je uspešnost primene helatora gvožđa deksrazoksana kao kardioprotektora. Takođe, sam doksorubicin ima visok potencijal kumulacije u mitohondrijama ćelije u znatno višim koncentracijama u odnosu plazmu, indukujući mitohondrijalnu disfunkciju (254). Katjonski doksorubicin ima visok afinitet prema kardiolipinu, integralnom anjonskom fosfolipidu unutrašnje membrane mitohondrija koji ima značajnu ulogu u alosternoj regulaciji i aktivnosti mitohondrijalnih enzima i transportnih proteina (366). Gradeći ireverzibilni kompleks sa kardiolipinom, doksorubicin može biti redukovano pomoću kompleksa ETS i na taj način generisati produkciju ROS. Osim toga, vezivanje za kardiolipin oštećuje funkcionalnost kardiolipin-zavisnih proteina i menja fluidnost i funkcionalnost kompleksa ETS, inicirajući kaskadu događaja koji rezultuju u hiperprodukciji ROS (367). ROS zatim indukuju lipidnu peroksidaciju, oštećenje kardiolipina, mitohondrijalnih membrana i mtDNA u kojoj dolazi do pojave mutacija, rearanžmana i greški u toku transkripcije proteinskih komponenti respiratornog lanca. Ovi procesi rezultuju u amplifikaciji oksidativnog stresa, smanjenja potencijala mitohondrijalne membrane, otvaranje MPT sa oslobađanjem citohroma C i inicijacijom apoptoze. Takođe, poremećaj sinteze ATP-a odnosno narušavanje energetske homeostaze je jedna od značajnih osobina doksorubicinske kardiotoksičnosti. Intracelularni pul ATP-a u miokardu je veoma mali, oko 5 mmol/kg srčanog tkiva. Kada postoje povećani energetske zahtevi ATP može biti regenerisan iz rezervnih oblika kao što je fosfokreatin (10 mmol/kg

srčane mase), a kreatin kinaza je odgovorna za konverziju kreatina u fosfokreatin čime ona predstavlja modulatora energetske rezervi. Doksorubicin indukuje oksidativno oštećenje kreatin kinaze, narušavajući energetske homeostazu smanjivanjem nivoa ATP-a i fosfokreatina što smanjuje kontraktilnu funkciju miokarda (368). Deplecija ATP-a je također jedno od svojstava nekroze. Smanjena aktivnost CK-MB u serumu životinja tretiranih doksorubicinom sa/ bez dodatka žučnih kiselina je upravo moguć rezultat oksidativnog oštećenja ovog izoenzima i smanjene aktivnosti u laboratorijskim uslovima (smanjenog potencijala transfera fosfatne grupe sa supstrata kreatin fosfata u okviru dijagnostičkog eseja). Dodatno potkrepljenje ovoj hipotezi se nalazi i u dobijenim rezultatima smanjenje reaktivacije CK-MB pomoću N-acetil cisteina.

Doksorubicin također može da indukuje apoptozu ćelije povećanjem ekspresije FasL (FAS/CD89 ligand receptora ćelijske smrti) praćenog aktivacijom kaspaze-8, medijatora spoljašnjeg puta apoptoze (369). Apoptotski signali također mogu poticati i pokretanjem sa endoplazmatskim/sarkoplazmatskim retikulumom-udružene cistein proteaze, kaspaze-12 (kod glodara) odnosno kaspaze-4 (kod čoveka), stvaranjem proapoptotskog lipidnog sekundarnog glasnika ceramida i degradacijom Akt pomoću serin-treonin proteaza (370, 371).

Lezije DNA indukovane direktnim interakcijama sa doksorubicinom ili indirektno, preko ROS, povećavaju fosforilaciju i nuklearnu translokaciju tumor supresora p53, posredstvom ERK1/2, i menja balans proapoptotski i antiapoptotskih faktora u korist proapoptotskih (372). Štaviše, doksorubicin indukuje i oštećenje mtDNA dejstvom na mitohondrijalnu Top-II β , dovodeći do poremećaja u mitohondrijalnoj biogenezi i formaciji ROS. Delecija Top-II β u kardiomiocitima redukuje pojavu kardiotoksičnosti doksorubicina, a dodatni mehanizam kojim deksrazoksan ispoljava svoje kardioprotektivno dejstvo je pomoću deplecije ovog enzima (373).

Dejstvo noksi koje indukuju ćelijski distres, uključujući i oksidativni stres, aktivira tri najvažnija člana porodice signalnih puteva mitogenima-aktivirane protein kinaze (MAPK): ERK, JNK i p38, čijom fosforilacijom u ćelijama može da se indukuje apoptoza (374, 375). Hiperprodukcija ROS, indukovana redoks ciklusom doksorubicina i oštećenjem mitohondrija može da aktivira i NF- κ B –posredovanu apoptozu za razliku od malignih ćelija u kojima NF- κ B ima uglavnom suprotno, antiapoptotsko dejstvo (185). Smanjenje ekspresije antiapoptotske hem oksigenaze-1 (HO-1) pomoću doksorubicina je jedan od ROS-nezavisnih mehanizama apoptoze indukovane niskim koncentracijama doksorubicina (376).

Odnos ekspresije *Bax/Bcl-2* u tkivu srca je pokazao da je doksorubicin kao i kotretman doksorubicinom i svim ispitivanim žučnim kiselinama povećao proapoptoski potencijal kardiomiocita u odnosu na netretiranu grupu životinja. U UDCA i CDCA kotetiranim grupama je ovaj odnos bio značajno viši u odnosu na grupu životinja tretiranih samo doksorubicinom. Na osnovu navedenih rezultata se može pretpostaviti da značajno smanjenje aktivnosti kreatin kinaze u serumu u ovim grupama životinja predstavlja posledicu smrti kardiomiocita nakon tretmana visokim dozama doksorubicina, sa ili bez žučnih kiselina i redukovano broja ćelija srca nakon 28 dana. Međutim, odsustvo značajnog smanjenja apsolutne i relativne mase srca govori u prilog hipotezi oksidativne modifikacije enzima sa posledičnom smanjenom aktivnosti.

U jetri ispitivanih životinja je dvadeset drugog dana nakon završetka tretmana odnos *Bax/Bcl-2* bio značajno povišen u grupi životinja tretiranih doksorubicinom, dok je u grupama životinja kotretiranih sa svim odabranim žučnim kiselinama ovaj odnos bio značajno niži u odnosu na pozitivnu kontrolu. Navedeni rezultati smanjene osetljivosti na apoptozu posredovanu mitohondrijalnim proteinima su u skladu sa rezultatima smanjenog intenziteta lipidne peroksidacije, kao i direktne ili indirektno antioksidativne aktivnosti žučnih kiselina. Kao i u slučaju CK-MC, smanjena aktivnost AST i ALT u grupama životinja tretiranih doksorubicinom može da bude posledica redukcije broja parenhimskih ćelija jetre ili oksidativne modifikacije i disfunkcionalnosti enzima, usled čega su navedeni enzimi ispoljili manju katalitičku aktivnost u odnosu na kontrolne grupe životinja. Ekspresija *Grp78* kao markera stresa ER je bila povišena u srčanom tkivu u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na netretirane životinje, što ukazuje i na mogućnost apoptoze posredovane kaspazom-12. U srčanom tkivu je jedino UDCA značajno redukovala doksorubicinom-indukovanog stres ER, u odnosu na pozitivnu kontrolnu grupu što je u skladu sa ulogom UDCA kao hemijskog pratioca koji redukuje stres ER (112). Međutim, u CDCA i 12-MKC kotetiranim grupama stres endoplazmatskog retikuluma je bio značajno povišen i u odnosu na grupu životinja tretiranih samo doksorubicinom što ukazuje na značajne alteracije u lumenu ove organele koje su rezultovale u potrebama za povećanom transkripcijom ovog rezidentnog proteina. Međutim, u hepatocitima, ćelijama bogatim ER zbog izražene biosintetske funkcije, u grupi životinja tretiranih doksorubicinom kao i u UDCA i CDCA kotetiranim grupama je ekspresija markera *GRP78* bila niža, dok je u 12-MKC kotetiranoj grupi bila značajno povišena u odnosu na netretirane životinje.

Tkivnu specifičnost su žučne kiseline ispoljile i na ekspresiju gena koji kodiraju transkripciju transmembranskih efluks proteina, *Mdr1a*, *Mrp1* i *Mrp2*. Ekspresija *Mdr1a*, ortologa humanog MDR1, kao i *Mrp1* i *Mrp2* je bila indukovana u srcu životinja tretiranih doksorubicinom nakon pauze u tretmanu u trajanju od tri sedmice. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima Budde i sar. koji su pokazali da akutno izlaganje doksorubicinu povećava ekspresiju Pgp-a u srcu miševa (377). Iako se smatra da je Pgp prevashodno eksprimiran u endotelu kapilara i u gastrointestinalnom traktu, navedeni autori su pokazali da je povećana ekspresija ovog transportera u miokardu značajan odbrambeni faktor koji smanjuje koncentraciju doksorubicina u srčanom tkivu. Van Asperen i sar su takođe pokazali da intravenska administracija doksorubicina miševima sa utišanim *Mdr1a* rezultuje u kumulaciji doksorubicina u srcu, u poređenju sa *wild-type* životinjama (378). Štaviše, pokazano je da inhibicija Pgp-a koadministracijom Pgp inhibitora verapamila sa doksorubicinom dovodi do povećane kardiotsičnosti u poređenju sa samim doksorubicinom (379). Jungsuwadee i sar. su pokazali da nakon primene doksorubicina dolazi i do povećane ekspresije *Mrp1* na nivou mitohondrijalne membrane i sarkoleme što predstavlja fiziološki protektivni mehanizam (234). S obzirom da su sve žučne kiseline snažno inhibirale ekspresiju *Mdr1a*, *Mrp1*, transportera doksorubicina koji efluksom smanjuju intrakardiomiocitne koncentracije doksorubicina, ovi rezultati su u saglasnosti sa našim rezultatima povećane apoptoze kardiomiocita mitohondrijalnim putem kao i sa biohemijskim parametrima. Takođe, usled inhibicije *Mrp1* pod uticajem žučnih kiselina, povećana koncentracija doksorubicina u miokardu je potencijalno indukovala stres endoplazmatskog retikuluma u kardiomiocitima i povećala ekspresiju *Grp78*.

Za razliku od srca, tretman doksorubicinom nije značajno promenio ekspresiju *Mdr1a* u jetri, dok je kotretman sa CDCA značajno smanjio ekspresiju mRNA ovog transportera u odnosu na grupu životinja tretiranih doksorubicinom, dok je kotretman sa 12-MKC značajno indukovao ekspresiju *Mdr1a*. Međutim, dok je tretman doksorubicinom indukovao *Mrp1*, kotretman sa svi žučnim kiselinama je, slično kao u srcu, inhibisao ekspresiju ovog transportnog proteina na transkripcionom nivou. Ekspresija *Mrp2* je bila značajno smanjena nakon tretmana doksorubicinom i kotretmana sa CDCA i UDCA u odnosu na kontrolnu grupu, dok je kotretman sa 12-MKC značajno povećao ekspresiju *Mrp2* u odnosu na navedene grupe. Budući da postoji preklapanje u spektru supstrata ispitivanih transportnih proteina, hepatski klirens doksorubicina u UDCA i CDCA kotretiranim grupama nije morao biti značajno snižen (a samim tim i

sistemska ekspozicija) na osnovu smanjene ekspresije *Mrp1* i *Mrp2*, osim u 12-MKC grupi u kojoj je mogao biti povećan zbog značajne indukcije ekspresije *Mdr1a* i najmanje izražene inhibicije ekspresije *Mrp2*. Hartmann i sar. su pokazali da endotoksin smanjuje ekspresiju *Mdr1a* i *Mdr1b* izoforme u jetri, smanjujući bilijarni klirens doksorubicina za 50% (380). Međutim u navedenoj studiji je došlo do povećanja ekspresije *Mdr1b* u renalnim tubulocitima što je dovelo do tri puta većeg renalnog klirensa doksorubicina i doksorubicinol aglikona u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, u endotoksinom-tretiranoj grupi životinja je bila povećana vrednost AUC doksorubicina u plazmi i smanjen sistemski klirens, što ukazuje da u uslovima inflamacije odn. bakterijskih infekcija može da se javi izmenjena farmakokinetika doksorubicina.

Ekspresija mRNA za NAD(P)H-zavisni enzim karbonil reduktazu-1 je bila indukovana u ćelijama srca i jetre životinja tretiranih doksorubicinom, što je pokazatelj povećane sinteze metabolita doksorubicinola u okviru faze I biotransformacije. Doksorubicinol je hidrofilni alkoholni metabolit doksorubicina koji ne ispoljava antitumorske efekte, a smatra se značajnim faktorom za pojavu neželjenih efekata doksorubicina, naročito u miokardu (381). Zbog toga inhibicija karbonil reduktaze-1 predstavlja atraktivan farmakološki pristup kojim se omogućava bolje antitumorsko dejstvo uz smanjene neželjene efekte antraciklina. Ekspresija karbonil reduktaze-1 je bila značajno snižena na transkripcionom nivou u miokardu i jetri životinja kotretiranih sa UDCA i CDCA. UDCA predstavlja potencijalni molekul kandidat za dalja ispitivanja u ovom polju, budući da je UDCA inhibisala transkripciju karbonil reduktaze-1 *in vivo* i *in vitro*, dok *in vivo* nije indukovala ekspresiju gena za drugi doksorubicin-metabolišući enzim Cbr-1.

S obzirom na činjenicu da su žučne kiseline u sukcesivnoj koadministraciji sa doksorubicinom modifikovale odložene celularne odgovore kako na biohemijskom tako i molekularnom nivou u *in vivo* sistemu, u sledećem *in vivo* ogledu je ispitan uticaj pretretmana žučnim kiselinama u trajanju od tri dana na koncentraciju jednokratno primenjenog doksorubicina u plazmi i bilijarnu sekreciju, ali i na prodor tj. kumulaciju leka u jetri i miokardu životinja. Nakon bolus i.v. administracije 10 mg/kg doksorubicina u femoralnu venu, uzorci krvi su uzimani u toku dva sata u odgovarajućim intervalima, a uzorci žuči su uzimani u toku 20-minutnih intervala, Nakon završetka ogleada životinje su eutanazirane i uzeti su uzorci tkiva jetre

i miokarda, a koncentracija doksorubicina je određena HPLC metodom uz primenu fluorescentnog detektora.

Koncentracije doksorubicina u serumu ispitivanih životinja nakon i.v. administracije leka su pokazale značajan pad u toku prvih dvadeset minuta usled ekstenzivne distribucije u tkiva, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (382, 383). Međutim, pretretman žučnim kiselinama je modifikovao profil serumskih koncentracija doksorubicina tako što su UDCA i CDCA povećale, a 12-MKC smanjila vrednosti serumskih koncentracija. Uzevši u obzir farmakokinetičke parametre, UDCA je povećala AUC_{0-t} doksorubicina dok je 12-MKC smanjila vrednost ovog parametra. S obzirom na činjenicu da je smanjenje koncentracionog pika doksorubicina u plazmi povoljan faktor u prevenciji doksorubicinske kardiotoksičnosti može se pretpostaviti da je pretretman sa 12-MKC rezultovao u najmanjoj ekspresiji kardiomiocita doksorubicinu. Zaista, koncentracije doksorubicina u 12-MKC pretretiranoj grupi su bile smanjene u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Međutim, povećan volumen distribucije doksorubicina u 12-MKC pretretiranoj grupi životinja pokazuje na povećani maseni fluks leka u tkivne kompartmane. Prethodne studije su pokazale na ulogu 12-MKC kao promotera transporta kroz krvno-moždanu i intestinalnu barijeru (384, 385). Osnovni mehanizam protekcije na nivou hemato-encefalne barije je ekspresija Pgp na luminalnoj strani endotelnih ćelija krvnih sudova, koji vrši efluks ksenobiotika u cirkulaciju. Takođe, ekspresija Pgp na apikalnom polu enterocita značajno utiče na bioraspoloživost lekova unetih *per os*. Na osnovu ove činjenice se može pretpostaviti da 12-MKC na tkivno specifičan način modulira ekspresiju Pgp, ali i drugih transportnih proteina.

Smanjenje serumskih koncentracija citostatika se može dovesti u vezu sa smanjenom antitumorskom aktivnošću leka (386). Međutim pretretman sa 12-MKC je povećao poluvreme eliminacije leka na osnovu čega se može pretpostaviti da će maligne ćelije biti duže izložene dejstvu antitumorskog agensa, te da antitumorska aktivnost neće biti redukovana (387). Pretretman sa svim odabranim žučnim kiselinama je povećao bilijarnu ekskreciju doksorubicina što je u saglasnosti sa činjenicom da se doksorubicin nakon primene brzo kumulira u jetri kao mestu biotransformacije i eliminiše bilijarnim putem. Povećana bilijarna ekskrecija doksorubicina se može javiti kao posledica interakcije žučnih kiselina sa nuklearnim receptorima i indukcije ekspresije gena koji kodiraju transkripciju ovih proteina (388, 389). Međutim,

diskrepanca između navedene pretpostavke i smanjene ekspresije gena za *Mdr1a*, *Mrp1* i *Mrp2* u grupama životinja tretiranih doksorubicinom i žučnim kiselinama na modelu odložene toksičnosti, ukazuje na neophodnost detaljnog razmatranja uloge svih faktora koji doprinose razlikama u akutnim i odloženim efektima tretmana kao i razlikama između akutne i hronične primene kako doksorubicina tako i ispitivanih žučnih kiselina. Pojedine studije ukazuju na značaj eksporta posredovanog pomoću Mrp3 (Abcc3) transportnog proteina lokalizovanog na bazolateralnoj membrani hepatocita u uslovima u kojima je smanjena ili odsutna ekspresija Mrp2 transportnog proteina (390). Produženo poluvreme eliminacije doksorubicina u 12-MKC pretretiranoj grupi se može objasniti povećanjem ekspresije upravo ovog transportera, u cilju prevencije hepatocelularnog oštećenja, sa posledičnim efluksom doksorubicina u sistemsku cirkulaciju.

U *in vitro* uslovima je pretretman žučnim kiselinama u trajanju od 30 minuta značajno povećao kumulaciju doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji. Pri tome je 12-MKC ispoljila najizraženiji efekat u poboljšanju prodora doksorubicina u MCF-7 ćelijsku liniju. Pored uticaja na ekspresiju i aktivnost membranskih transportnih proteina, žučne kiseline su ispoljile efekat promocije transporta doksorubicina zahvaljujući promenama sastava ćelijske membrane u maligno transformisanim ćelijama, uticajem na fluidnost ćelijske membrane, ili interakcijama sa membranskim lipidima alterisanih ćelija (391). Poboljšanje selektivnog preuzimanja i prodora doksorubicina u maligne ćelije koje nije praćeno kumulacijom u normalnim tkivima kao i poboljšanje antitumorskog dejstva doksorubicina sa mogućim smanjenjem doze uz smanjenje pojave dozno-zavisnih neželjenih dejstava doksorubicina čini žučne kiseline interesantnim i značajnim molekulima kandidatima za dalja ispitivanja u cilju razvoja novih, poboljšanih antitumorskih strategija.

6. ZAKLJUČCI

Prirodne žučne kiseline, UDCA i CDCA primenjene u netoksičnim IC₂₀ koncentracijama značajno povećavaju citotoksične efekte doksorubicina *in vitro* na MCF-7 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke, dok je koinkubacija MCF-7 ćelija sa doksorubicinom i semisintetskim derivatom, 12-MKC, povećala citotoksičnu aktivnost doksorubicina, ali bez statističke značajnosti. Potenciranje citotoksičnog efekta doksorubicina pomoću žučnih kiselina u *in vitro* sistemu odgovara redosledu CDCA>UDCA>12-MKC. Analizom tipa interakcije utvrđeno je da CDCA ispoljava sinergistički, dok UDCA i 12-MKC primenjene sa doksorubicinom ispoljavaju aditivni citotoksični efekat.

Koinkubacija MCF-7 ćelijske linije sa doksorubicinom i CDCA odnosno doksorubicinom i UDCA je rezultovala u značajnom povećanju specifične aktivnosti enzima antioksidativne zaštite što je pokazatelj povećanog nivoa oksidativnog stresa u navedenim eksperimentalnim grupama. Koinkubacija MCF-7 ćelija sa 12-MKC nije dovela do značajnih promena specifične aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Povećan nivo oksidativnog stresa u UDCA- i CDCA-, ali ne i u 12-MKC-kotretiranoj grupi je u skladu sa citotoksičnim efektima navedenih kombinacija.

Transkriptomaska analiza ukazuje da žučne kiseline značajno moduliraju gensku ekspresiju u MCF-7 ćelijama humanog adenokarcinoma dojke inkubiranih u medijumu sa doksorubicinom. Dodavanje odabranih žučnih kiselina u medijum sa doksorubicinom rezultuje u indukciji apoptoze unutrašnjim, mitohondrijalnim putem i u povećanju stresa endoplazmatskog retikuluma koji su najizraženiji nakon dodavanja CDCA, zatim 12-MKC i UDCA (CDCA>12-MKC>UDCA). Međutim, povećana ekspresija mRNA gena koji kodiraju sintezu medijatora programirane ćelijske smrti i markera stresa endoplazmatskog retikuluma, koja nije bila praćena povećanom citotoksičnošću u grupi ćelija koinkubiranih sa 12-MKC ukazuje na postojanje potencijalnih post-transkripcionih ili post-translacionih modifikacija navedenih proteina u ćelijama ove eksperimentalne grupe. Koinkubacija MCF-7 ćelija sa doksorubicinom i žučnim kiselinama je značajno modifikovala molekularni odgovor na nivou gena koji kodiraju sintezu enzima antioksidativne zaštite u odnosu na grupu ćelija tretiranih doksorubicinom. Pri tome je kotretman sa CDCA i 12-MKC povećao ekspresiju *SOD* i *GR*, a smanjio ekspresiju *CAT*, dok je kotretman sa UDCA ispoljio suprotni efekat na ekspresiju gena za navedene antioksidativne

enzime u odnosu na CDCA i 12-MKC. Žučne kiseline UDCA, CDCA i 12-MKC primenjene u kombinaciji sa doksorubicinom *in vitro* su značajno inhibirale ekspresiju *MDR1* što je jedan od potencijalnih mehanizama povećanja intracelularne kumulacije doksorubicina u MCF-7 ćelijskoj liniji. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da žučne kiseline, CDCA, 12-MKC i UDCA poboljšavaju antitumorska farmakodinamska svojstva doksorubicina *in vitro*, na MCF-7 ćelijskoj liniji.

Tretman ekvimolarnim koncentracijama UDCA, CDCA i 12-MKC p.o. i doksorubicinom i.p. *in vivo* u trajanju od šest dana, nije poboljšao toksodinamske efekte na nivou tkiva jetre i miokarda sa biohemijskog stanovišta tri sedmice nakon završetka tretmana. Kotretman žučnim kiselinama i doksorubicinom je rezultovao u povećanju ekspresije enzima antioksidativne zaštite. Smanjenje serumskih biohemijških parametara AST, ALT i CK-MB može ukazati na redukciju parenhimskih ćelija jetre i kardiomiocita usled izlaganja visokim dozama doksorubicina, ili, verovatnije, na oksidativnu modifikaciju i disfunkcionalnost tj. smanjenu katalitičku aktivnost enzima. Analizom genske ekspresije qRT-PCR metodom su utvrđeni tkivno-specifični efekti kotretmana doksorubicinom i različitim žučnim kiselinama, pri čemu su UDCA i CDCA značajno povećale (UDCA>CDCA), a 12-MKC smanjila ekspresiju markera mitohondrijalnog puta apoptoze kardiomiocita, dok su sve tri žučne kiseline značajno smanjile ekspresiju molekularnih prediktora mitohondrijalnog puta apoptoze hepatocita. Takođe, sve tri odabrane žučne kiseline su smanjile ekspresiju *Mdr1*, *Mrp1* i *Mrp2* u tkivu srca kao i *Mrp1* u jetri, dok su UDCA i 12-MKC povećale, a CDCA smanjila ekspresiju *Mdr1* i *Mrp2* u tkivu jetre. Smanjenje ekspresije mRNA za navedene efluks transportne proteine može rezultovati u smanjenoj ekspresiji i translaciji navedenih transportnih proteina, dok povećan nivo oksidativnog stresa može dovesti do post-translacionih modifikacija i smanjenja aktivnosti već sintetisanih transportnih proteina. Ovi mehanizmi potencijalno mogu povećati kumulaciju doksorubicina u tkivu srca i jetre i aktivirati druge mehanizme ćelijske smrti hepatocita i kardiomiocita, nezavisne od mitohondrijalne signalne apoptotske kaskade, čime se potencijalno mogu objasniti odloženi *in vivo* toksodinamski efekti.

Žučne kiseline UDCA, CDCA i 12-MKC značajno povećavaju prodor i intracelularnu kumulaciju doksorubicina *in vitro* u MCF-7 ćelijskoj liniji, pri čemu je 12-MKC ispoljila

najizraženiju promociju intracelularne kumulacije doksorubicina u odnosu na prirodne žučne kiseline (12-MKC>CDCA>UDCA).

Trodnevni p.o. pretretman eksperimentalnih životinja žučnim kiselinama je ispoljio različite efekte na profil serumskih koncentracija doksorubicina u funkciji vremena, nakon primene citostatika u vidu unidoze. HPLC analizom je utvrđeno da je 12-MKC najpovoljnije uticala na farmakokinetički profil doksorubicina. Pretretman sa 12-MKC je rezultovao u smanjenju serumskih koncentracija doksorubicina, čime se potencijalno mogu redukovati kardiotoksični neželjeni efekti, dok se povećanjem poluvremena eliminacije potencijalno omogućava prolongirano dejstvo na maligne ćelije. Pretretman sa CDCA i UDCA je rezultovao u povećanju serumskih koncentracija doksorubicina (UDCA>CDCA) i smanjenju poluvremena eliminacije. Takođe, sve tri žučne kiseline su bez indukcije holereze povećale bilijarni klirens doksorubicina (12-MKC>CDCA>UDCA), što može biti iskorišćeno u terapiji karcinoma bilijarnog trakta. Trodnevni pretretman žučnim kiselinama je smanjio kumulaciju doksorubicina u tkivu jetre i miokarda nakon dva časa, ali navedeni efekti nisu pokazali statističku značajnost.

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da žučne kiseline CDCA, UDCA i 12-MKC ispoljavaju pozitivne efekte na antitumorska farmakodinamska svojstva doksorubicina. Pozitivni *in vitro* efekti 12-MKC na promociju intracelularne kumulacije doksorubicina u MCF-7 ćelijama, kao i poželjni efekti pretretmana sa ovom žučnom kiselinom na farmakokinetička svojstva doksorubicina *in vivo*, ukazuju na potrebu za daljim ispitivanjima uticaja primene 12-MKC i doksorubicina na *in vivo* modelima ksenografta malignih tumora u cilju ispitivanja odnosa koristi i rizika ovakve kombinovane terapije. Dalja ispitivanja i razvoj novih farmaceutskih formulacija doksorubicina (i drugih antineoplastika) sa žučnim kiselinama kao promoterima transporta i potencijalnim farmakološkim agensima sa farmakodinamskim svojstvima mogu da doprinesu unapređenju postojećih i razvoju novih antitumorskih terapijskih strategija.

7. LITERATURA

1. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2015;14(1):18-33.
2. Pavlovic N, Stanimirov B, Mikov M. Bile acids as novel pharmacological agents: the interplay between gene polymorphisms, epigenetic factors and drug response. *Curr Pharm Des.* 2017;23(1):187-215.
3. Martinot E, Sedes L, Baptissart M, Lobaccaro JM, Caira F, Beaudoin C, et al. Bile acids and their receptors. *Mol Aspects Med.* 2017;56:2-9.
4. Stepanov V, Stankov K, Mikov M. The bile acid membrane receptor TGR5: a novel pharmacological target in metabolic, inflammatory and neoplastic disorders. *J Recept Signal Transduct Res.* 2013;33(4):213-23.
5. van Nierop FS, Scheltema MJ, Eggink HM, Pols TW, Sonne DP, Knop FK, et al. Clinical relevance of the bile acid receptor TGR5 in metabolism. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(3):224-33.
6. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Pleiotropic functions of bile acids mediated by the farnesoid X receptor. *Acta Gastroenterol Belg.* 2012;75(4):389-98.
7. Gadaleta RM, Garcia-Irigoyen O, Moschetta A. Bile acids and colon cancer: Is FXR the solution of the conundrum? *Mol Aspects Med.* 2017;56:66-74.
8. Biemann R, Penner M, Borucki K, Westphal S, Luley C, Rönicke R, et al. Serum bile acids and GLP-1 decrease following telemetric induced weight loss: results of a randomized controlled trial. *Sci Rep.* 2016;6:30173.
9. Mullard A. 2015 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(2):73-6.
10. Gerken G, Nitschmann S. Obeticholic acid in primary biliary cholangitis : PBC OCA international study of efficacy (POISE). *Internist (Berl).* 2017;58(2):202-4.
11. Kuhajda K, Kandrak J, Kevresan S, Mikov M, Fawcett JP. Structure and origin of bile acids: an overview. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;31(3):135-43.
12. 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.
13. Roda A, Minutello A, Angellotti MA, Fini A. Bile acid structure-activity relationship: evaluation of bile acid lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *J Lipid Res.* 1990;31(8):1433-43.
14. 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.

15. Bjedov S, Jakimov D, Pilipovic A, Posa M, Sakac M. Antitumor activity of newly synthesized oxo and ethylidene derivatives of bile acids and their amides and oxazolines. *Steroids*. 2017;120:19-25.
16. Posa M, Bjedov S, Sebenji A, Sakac M. Wittig reaction (with ethylidene triphenylphosphorane) of oxo-hydroxy derivatives of 5 β -cholanic acid: Hydrophobicity, haemolytic potential and capacity of derived ethylidene derivatives for solubilisation of cholesterol. *Steroids*. 2014;86:16-25.
17. Sabbatini P, Filipponi P, Sardella R, Natalini B, Nuti R, Macchiarulo A, et al. Synthesis and quantitative structure-property relationships of side chain-modified hyodeoxycholic acid derivatives. *Molecules*. 2013;18(9):10497-513.
18. Gioiello A, Cerra B, Mostarda S, Guercini C, Pellicciari R, Macchiarulo A. Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid x receptor: molecular determinants for bile acid binding and receptor modulation. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(19):2159-74.
19. Halilbasic E, Steinacher D, Trauner M. Nor-Ursodeoxycholic Acid as a Novel Therapeutic Approach for Cholestatic and Metabolic Liver Diseases. *Dig Dis*. 2017;35(3):288-92.
20. Bowlus CL. Obeticholic acid for the treatment of primary biliary cholangitis in adult patients: clinical utility and patient selection. *Hepat Med*. 2016;8:89-95.
21. Pellicciari R, Passeri D, De Franco F, Mostarda S, Filipponi P, Colliva C, et al. Discovery of 3 α ,7 α ,11 β -Trihydroxy-6 α -ethyl-5 β -cholan-24-oic Acid (TC-100), a novel bile acid as potent and highly selective fxr agonist for enterohepatic disorders. *J Med Chem*. 2016;59(19):9201-14.
22. Vaz FM, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2017;56:10-24.
23. Chiang JYL. Bile acids: Regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009;50(10):1955-66.
24. Chiang JY. Negative feedback regulation of bile acid metabolism: impact on liver metabolism and diseases. *Hepatology*. 2015;62(4):1315-7.
25. Li T, Francl JM, Boehme S, Chiang JY. Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 α -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice. *Hepatology*. 2013;58(3):1111-21.
26. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:137-74.
27. Nakagawa M, Setchell KD. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res*. 1990;31(6):1089-98.

28. 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.
29. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(16):2461-83.
30. Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res.* 2009;50(12):2340-57.
31. Baghdasaryan A, Chiba P, Trauner M. Clinical application of transcriptional activators of bile salt transporters. *Mol Aspects Med.* 2014;37:57-76.
32. Droge C, Schaal H, Engelmann G, Wenning D, Haussinger D, Kubitz R. Exon-skipping and mRNA decay in human liver tissue: molecular consequences of pathogenic bile salt export pump mutations. *Sci Rrep.* 2016;6:24827.
33. Dawson PA, Karpen SJ. Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res.* 2015;56(6):1085-99.
34. Pavlovic N, Stankov K, Mikov M. Probiotics-interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;168(7):1880-95.
35. Wahlstrom A, Sayin SI, Marschall HU, Backhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab.* 2016;24(1):41-50.
36. Long SL, Gahan CGM, Joyce SA. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2017;56:54-65.
37. Zwicker BL, Agellon LB. Transport and biological activities of bile acids. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(7):1389-98.
38. Ajouz H, Mukherji D, Shamseddine A. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol.* 2014;12:164.
39. Hofmann AF. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 2004;36(3-4):703-22.
40. Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol.* 2013;3(3):1191-212.
41. Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P. Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(9):1631-50.
42. Di Leva FS, Festa C, Renga B, Sepe V, Novellino E, Fiorucci S, et al. Structure-based drug design targeting the cell membrane receptor GPBAR1: exploiting the bile acid scaffold towards selective agonism. *Sci Rep.* 2015;5:16605.
43. Chavez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2017;152(7):1679-94.

44. Wang XX, Edelstein MH, Gafter U, Qiu L, Luo Y, Dobrinskikh E, et al. G protein-coupled bile acid receptor tgr5 activation inhibits kidney disease in obesity and diabetes J Am Soc Nephrol. 2016;27(5):1362-78.
45. Krattinger R, Bostrom A, Lee SM, Thasler WE, Schioth HB, Kullak-Ublick GA, et al. Chenodeoxycholic acid significantly impacts the expression of miRNAs and genes involved in lipid, bile acid and drug metabolism in human hepatocytes. Life Sci. 2016;156:47-56.
46. Chai J, Zou L, Li X, Han D, Wang S, Hu S, et al. Mechanism of bile acid-regulated glucose and lipid metabolism in duodenal-jejunal bypass. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(12):15778-85.
47. Reich M, Deutschmann K, Sommerfeld A, Klindt C, Kluge S, Kubitz R, et al. TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro. Gut. 2016;65(3):487-501.
48. Li G, G LG. Farnesoid X receptor, the bile acid sensing nuclear receptor, in liver regeneration. Acta Pharm Sin B. 2015;5(2):93-8.
49. Jourdainne V, Pean N, Doignon I, Humbert L, Rainteau D, Tordjmann T. The Bile Acid Receptor TGR5 and Liver Regeneration. Dig Dis. 2015;33(3):319-26.
50. Zhang G, Park MA, Mitchell C, Walker T, Hamed H, Studer E, et al. Multiple cyclin kinase inhibitors promote bile acid-induced apoptosis and autophagy in primary hepatocytes via p53-CD95-dependent signaling. J Biol Chem. 2016;291(39):20823.
51. Sommerfeld A, Reinehr R, Haussinger D. Tauroursodeoxycholate protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via beta1-integrin- and protein kinase a-dependent mechanisms. Cell Physiol Biochem. 2015;36(3):866-83.
52. Duboc H, Rajca S, Rainteau D, Benarous D, Maubert MA, Quervain E, et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. Gut. 2013;62(4):531-9.
53. Deuschle U, Birkel M, Hambruch E, Hornberger M, Kinzel O, Perovic-Ottstadt S, et al. The nuclear bile acid receptor FXR controls the liver derived tumor suppressor histidine-rich glycoprotein. Int J Cancer. 2015;136(11):2693-704.
54. Arlia-Ciommo A, Piano A, Svistkova V, Mohtashami S, Titorenko VI. Mechanisms underlying the anti-aging and anti-tumor effects of lithocholic bile acid. Int J Mol Sci. 2014;15(9):16522-43.
55. Li T, Apte U. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation, and cancer. Adv Pharmacol. 2015;74:263-302.
56. Nizamutdinov D, DeMorrow S, McMillin M, Kain J, Mukherjee S, Zeitouni S, et al. Hepatic alterations are accompanied by changes to bile acid transporter-expressing neurons in the hypothalamus after traumatic brain injury. Sci Rep. 2017;7:40112.

57. Desai MS, Mathur B, Eblimit Z, Vasquez H, Taegtmeyer H, Karpen SJ, et al. Bile acid excess induces cardiomyopathy and metabolic dysfunctions in the heart. *Hepatology*. 2017;65(1):189-201.
58. Kemper JK. Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(8):842-50.
59. Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal*. 2010;8:e005. doi: 10.1621/nrs.08005.
60. Levin ER, Hammes SR. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(12):783-97.
61. Morris A. Metabolism: New insights into the BAT-liver-gut axis. *Nature Rev Endocrinol*. 2017;13(8):438. doi: 10.1038/nrendo.2017.85.
62. Baptissart M, Vega A, Martinot E, Baron S, Lobaccaro JM, Volle DH. Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(23):4511-26.
63. Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2003;278(1):104-10.
64. Mi LZ, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R, Willson TM, et al. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol Cell*. 2003;11(4):1093-100.
65. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*. 2009;89(1):147-91.
66. 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.
67. Katona BW, Cummins CL, Ferguson AD, Li T, Schmidt DR, Mangelsdorf DJ, et al. Synthesis, characterization, and receptor interaction profiles of enantiomeric bile acids. *J Med Chem*. 2007;50(24):6048-58.
68. 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.
69. 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.
70. 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.

71. Lin BC, Wang M, Blackmore C, Desnoyers LR. Liver-specific activities of FGF19 require Klotho beta. *J Biol Chem*. 2007;282(37):27277-84.
72. Fang S, Suh JM, Reilly SM, Yu E, Osborn O, Lackey D, et al. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat Med*. 2015;21(2):159-65.
73. Degirolamo C, Sabba C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(1):51-69.
74. Benoit B, Meugnier E, Castelli M, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Durand C, et al. Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice. *Nat Med*. 2017;23(8):990-6.
75. Gnerre C, Blattler S, Kaufmann MR, Looser R, Meyer UA. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics*. 2004;14(10):635-45.
76. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(6):3369-74.
77. Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(2):604-12.
78. Adorini L, Pruzanski M, Shapiro D. Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov Today*. 2012;17(17-18):988-97.
79. Maneschi E, Vignozzi L, Morelli A, Mello T, Filippi S, Cellai I, et al. FXR activation normalizes insulin sensitivity in visceral preadipocytes of a rabbit model of MetS. *J Endocrinol*. 2013;218(2):215-31.
80. Verbeke L, Farre R, Trebicka J, Komuta M, Roskams T, Klein S, et al. Obeticholic acid, a farnesoid X receptor agonist, improves portal hypertension by two distinct pathways in cirrhotic rats. *Hepatology*. 2014;59(6):2286-98.
81. Ho PP, Steinman L. Obeticholic acid, a synthetic bile acid agonist of the farnesoid X receptor, attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(6):1600-5.
82. Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall HU, Kipnes M, et al. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2013;145(3):574-82.e1.
83. Walters JR, Johnston IM, Nolan JD, Vassie C, Pruzanski ME, Shapiro DA. The response of patients with bile acid diarrhoea to the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(1):54-64.

84. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015;385(9972):956-65.
85. Hirschfield GM, Mason A, Luketic V, Lindor K, Gordon SC, Mayo M, et al. Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*. 2015;148(4):751-61.e8.
86. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*. 2009;15(14):1677-89.
87. 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;255:83-91.
88. 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.
89. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *J Cell Death*. 2016;9:19-29.
90. Deng J. How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers? *Acta Pharm Sin B*. 2017;7(1):18-26.
91. Mehlen P, Tauszig-Delamasure S. Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut*. 2014;63(11):1821-9.
92. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*. 2017;277(1):76-89.
93. Stankov K, Bogdanovic G, Stankov S, Draskovic D, Grubor-Lajsic G, Spasic M, 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.
94. Corazzari M, Gagliardi M, Fimia GM, Piacentini M. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol*. 2017;7:78.
95. Maher JJ. What doesn't kill you makes you stronger: how hepatocytes survive prolonged cholestasis. *Hepatology*. 2004;39(4):1141-3.
96. 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.
97. Katona BW, Anant S, Covey DF, Stenson WF. Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3354-64.

98. Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280(29):27179-94.
99. Yang JI, Yoon JH, Myung SJ, Gwak GY, Kim W, Chung GE, et al. Bile acid-induced TGR5-dependent c-Jun-N terminal kinase activation leads to enhanced caspase 8 activation in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361(1):156-61.
100. Rust C, Wild N, Bernt C, Vennegeerts T, Wimmer R, Beuers U. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *J Biol Chem.* 2009;284(5):2908-16.
101. Adachi T, Kaminaga T, Yasuda H, Kamiya T, Hara H. The involvement of endoplasmic reticulum stress in bile acid-induced hepatocellular injury. *J Clin Biochem Nutr.* 2014;54(2):129-35.
102. Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, et al. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology.* 2002;35(4):779-89.
103. Haussinger D, Kordes C. Mechanisms of tauroursodeoxycholate-mediated hepatoprotection. *Dig Dis.* 2017;35(3):224-31.
104. Kulkarni SR, Soroka CJ, Hagey LR, Boyer JL. Sirtuin 1 activation alleviates cholestatic liver injury in a cholic acid-fed mouse model of cholestasis. *Hepatology.* 2016;64(6):2151-64.
105. Rao YP, Studer EJ, Stravitz RT, Gupta S, Qiao L, Dent P, et al. Activation of the Raf-1/MEK/ERK cascade by bile acids occurs via the epidermal growth factor receptor in primary rat hepatocytes. *Hepatology.* 2002;35(2):307-14.
106. Qiao L, Han SI, Fang Y, Park JS, Gupta S, Gilfor D, et al. Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 2003;23(9):3052-66.
107. 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(2):483-6.
108. 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.
109. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ.* 1999;6(9):842-54.
110. 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.

111. 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.
112. 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 Health Med*. 2014;3(3):58-69.
113. Monte MJ, Martinez-Diez MC, El-Mir MY, Mendoza ME, Bravo P, Bachs O, et al. Changes in the pool of bile acids in hepatocyte nuclei during rat liver regeneration. *J Hepatol*. 2002;36(4):534-42.
114. Solá S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT, et al. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF- β 1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2005;42(4):925-34.
115. Castro RE, Sola S, Ma X, Ramalho RM, Kren BT, Steer CJ, et al. A distinct microarray gene expression profile in primary rat hepatocytes incubated with ursodeoxycholic acid. *J Hepatol*. 2005;42(6):897-906.
116. Castro RE, Amaral JD, Sola S, Kren BT, Steer CJ, Rodrigues CM. Differential regulation of cyclin D1 and cell death by bile acids in primary rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(1):G327-34.
117. Pusl T, Vennegeerts T, Wimmer R, Denk GU, Beuers U, Rust C. Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367(1):208-12.
118. Sola S, Castro RE, Kren BT, Steer CJ, Rodrigues CM. Modulation of nuclear steroid receptors by ursodeoxycholic acid inhibits TGF-beta1-induced E2F-1/p53-mediated apoptosis of rat hepatocytes. *Biochemistry*. 2004;43(26):8429-38.
119. Serfaty L, De Leusse A, Rosmorduc O, Desaint B, Flejou JF, Chazouilleres O, et al. Ursodeoxycholic acid therapy and the risk of colorectal adenoma in patients with primary biliary cirrhosis: an observational study. *Hepatology*. 2003;38(1):203-9.
120. Serfaty L. Chemoprevention of colorectal cancer with ursodeoxycholic acid: pro. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36 Suppl 1:S53-60.
121. Park IH, Kim MK, Kim SU. Ursodeoxycholic acid prevents apoptosis of mouse sensory neurons induced by cisplatin by reducing P53 accumulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(4):1025-30.
122. Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, et al. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology*. 2004;39(6):1563-73.
123. Rajesh KG, Suzuki R, Maeda H, Yamamoto M, Yutong X, Sasaguri S. Hydrophilic bile salt ursodeoxycholic acid protects myocardium against reperfusion injury in a PI3K/Akt dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39(5):766-76.

124. Miura T, Ouchida R, Yoshikawa N, Okamoto K, Makino Y, Nakamura T, et al. Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of NF- κ B-dependent transcription by ursodeoxycholic acid. *J Biol Chem*. 2001;276(50):47371-8.
125. Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning house: selective autophagy of organelles. *Dev Cell*. 2017;41(1):10-22.
126. Kim KH, Lee MS. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(6):322-37.
127. Manley S, Ni HM, Kong B, Apte U, Guo G, Ding WX. Suppression of autophagic flux by bile acids in hepatocytes. *Toxicol Sci*. 2014;137(2):478-90.
128. Williams JA, Thomas AM, Li G, Kong B, Zhan L, Inaba Y, et al. Tissue specific induction of p62/Sqstm1 by farnesoid X receptor. *PloS one*. 2012;7(8):e43961.
129. Afonso MB, Rodrigues PM, Simao AL, Ofengeim D, Carvalho T, Amaral JD, et al. Activation of necroptosis in human and experimental cholestasis. *Cell Death Dis*. 2016;7(9):e2390.
130. Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM, Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology*. 1995;109(4):1249-56.
131. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res*. 2005;589(1):47-65.
132. Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumprich E, et al. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr Res*. 2001;49(4):519-31.
133. Destainville N, Schmidt TH, Lang T. Where biology meets physics--a converging view on membrane microdomain dynamics. *Curr Top Membr*. 2016;77:27-65.
134. Sonnino S, Prinetti A. Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem*. 2013;20(1):4-21.
135. Escriba PV, Busquets X, Inokuchi J, Balogh G, Torok Z, Horvath I, et al. Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res*. 2015;59:38-53.
136. Mikov M, Fawcett JP, Kuhajda K, Kevresan S. Pharmacology of bile acids and their derivatives: absorption promoters and therapeutic agents. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;31(3):237-51.
137. Lalic-Popovic M, Vasovic V, Miliasevic B, Golocorbin-Kon S, Al-Salami H, Mikov M. Deoxycholic acid as a modifier of the permeation of gliclazide through the blood brain barrier of a rat. *J Diabetes Res*. 2013;2013:598603.

138. Garidel P, Hildebrand A, Knauf K, Blume A. Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition. *Molecules*. 2007;12(10):2292-326.
139. Sharma P, Varma MV, Chawla HP, Panchagnula R. Absorption enhancement, mechanistic and toxicity studies of medium chain fatty acids, cyclodextrins and bile salts as peroral absorption enhancers. *Farmaco*. 2005;60(11-12):884-93.
140. Akare S, Martinez JD. Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1735(1):59-67.
141. Zhou Y, Maxwell KN, Sezgin E, Lu M, Liang H, Hancock JF, et al. Bile acids modulate signaling by functional perturbation of plasma membrane domains. *J Biol Chem*. 2013;288(50):35660-70.
142. Yang L, Zhang H, Mikov M, Tucker IG. Physicochemical and biological characterization of monoketocholeic acid, a novel permeability enhancer. *Mol Pharm*. 2009;6(2):448-56.
143. Staudinger JL, Woody S, Sun M, Cui W. Nuclear-receptor-mediated regulation of drug- and bile-acid-transporter proteins in gut and liver. *Drug Metab Rev*. 2013;45(1):48-59.
144. Kramer W. Transporters, Trojan horses and therapeutics: suitability of bile acid and peptide transporters for drug delivery. *Biol Chem*. 2011;392(1-2):77-94.
145. Cuperus FJC, Claudel T, Gautherot J, Halilbasic E, Trauner M. The role of canalicular ABC transporters in cholestasis. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(4):546-60.
146. Claro Da Silva T, Polli JE, Swaan PW. The solute carrier family 10 (SLC10): Beyond bile acid transport. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):252-69.
147. Suga T, Yamaguchi H, Sato T, Maekawa M, Goto J, Mano N. Preference of Conjugated Bile Acids over Unconjugated Bile Acids as Substrates for OATP1B1 and OATP1B3. *PloS one*. 2017;12(1):e0169719.
148. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):653-65.
149. Dawson PA. Role of the intestinal bile acid transporters in bile acid and drug disposition. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(201):169-203.
150. Anwer MS, Stieger B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch*. 2014;466(1):77-89.
151. Vauthier V, Housset C, Falguières T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. *Biochem Pharmacol*. 2017;136:1-11.

152. Bruhn O, Cascorbi I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014;10(10):1337-54.
153. Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev.* 2010;62(1):1-96.
154. Lage H. Gene Therapeutic Approaches to Overcome ABCB1-Mediated Drug Resistance. *Recent Results Cancer Res.* 2016;209:87-94.
155. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 2016;370(1):153-64.
156. Cascorbi I, Haenisch S. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications. *Methods Mol Biol.* 2010;596:95-121.
157. Lund M, Petersen TS, Dalhoff KP. Clinical Implications of P-Glycoprotein Modulation in Drug-Drug Interactions. *Drugs.* 2017;77(8):859-83.
158. Chufan EE, Sim HM, Ambudkar SV. Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): recent biochemical and structural studies. *Adv Cancer Res.* 2015;125:71-96.
159. Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, et al. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics.* 2004;14(6):381-5.
160. Carazo A, Hyrsova L, Dusek J, Chodounska H, Horvatova A, Berka K, et al. Acetylated deoxycholic (DCA) and cholic (CA) acids are potent ligands of pregnane X (PXR) receptor. *Toxicol Lett.* 2017;265:86-96.
161. Lam P, Wang R, Ling V. Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry.* 2005;44(37):12598-605.
162. Cole SP. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem.* 2014;289(45):30880-8.
163. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(1):3-29.
164. Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 2007;24(10):1803-23.
165. Jeong HS, Ryoo IG, Kwak MK. Regulation of the expression of renal drug transporters in KEAP1-knockdown human tubular cells. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(5):884-92.
166. van der Schoor LW, Verkade HJ, Kuipers F, Jonker JW. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015;11(2):273-93.

167. Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy *Handb Exp Pharmacol*. 2011(201):299-323.
168. Ritter CA, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Grube M, Kock K, Kroemer HK. Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev*. 2005;37(1):253-78.
169. Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(4):200-7.
170. Renga B, Migliorati M, Mencarelli A, Cipriani S, D'Amore C, Distrutti E, et al. Farnesoid X receptor suppresses constitutive androstane receptor activity at the multidrug resistance protein-4 promoter. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1809(3):157-65.
171. Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, Kowal J, Stahlberg H, Locher KP. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*. 2017;546(7659):504-9.
172. Meyer zu Schwabedissen HE, Grube M, Dreisbach A, Jedlitschky G, Meissner K, Linnemann K, et al. Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP). *Drug Metab Dispos*. 2006;34(4):524-33.
173. Maestrelli F, Cirri M, Mennini N, Zerrouk N, Mura P. Improvement of oxaprozin solubility and permeability by the combined use of cyclodextrin, chitosan, and bile components. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(3):385-93.
174. Meaney CM, O'Driscoll CM. A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt:fatty acid micellar systems using the CaCo-2 cell culture model. *Int J Pharm*. 2000;207(1-2):21-30.
175. Nguyen TX, Huang L, Gauthier M, Yang G, Wang Q. Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(9):1169-85.
176. Ahmad J, Singhal M, Amin S, Rizwanullah M, Akhter S, Kamal MA, et al. Bile salt stabilized vesicles (bilosomes): a novel nano-pharmaceutical design for oral delivery of proteins and peptides. *Curr Pharm Des*. 2017;23(11):1575-88.
177. Jain S, Harde H, Indulkar A, Agrawal AK. Improved stability and immunological potential of tetanus toxoid containing surface engineered bilosomes following oral administration. *Nanomedicine*. 2014;10(2):431-40.
178. Mann JF, Shakir E, Carter KC, Mullen AB, Alexander J, Ferro VA. Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine*. 2009;27(27):3643-9.
179. Mann JF, Scales HE, Shakir E, Alexander J, Carter KC, Mullen AB, et al. Oral delivery of tetanus toxoid using vesicles containing bile salts (bilosomes) induces significant systemic and mucosal immunity. *Methods*. 2006;38(2):90-5.

180. Ayogu IJ, Ogbonna O, Ayolugbe CI, Attama AA. Evaluation of the pharmacodynamic activity of insulin from bilosomal formulation. *Curr Drug Deliv.* 2009;6(4):415-8.
181. Faustino C, Serafim C, Rijo P, Reis CP. Bile acids and bile acid derivatives: use in drug delivery systems and as therapeutic agents. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;13(8):1133-48.
182. Baringhaus KH, Matter H, Stengelin S, Kramer W. Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. II. A reliable 3D QSAR pharmacophore model for the ileal Na(+)/bile acid cotransporter. *J Lipid Res.* 1999;40(12):2158-68.
183. Menear KA, Patel D, Clay V, Howes C, Taylor PW. A novel approach to the site specific delivery of potential HMG-CoA reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 1992;2(4):285-90.
184. Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, et al. Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J Biol Chem.* 1992;267(26):18598-604.
185. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):185-229.
186. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(7):727-41.
187. Trachtenberg BH, Landy DC, Franco VI, Henkel JM, Pearson EJ, Miller TL, et al. Anthracycline-associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Pediatr Cardiol.* 2011;32(3):342-53.
188. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
189. Edwardson DW, Narendrula R, Chewchuk S, Mispel-Beyer K, Mapletoft JP, Parissenti AM. Role of drug metabolism in the cytotoxicity and clinical efficacy of anthracyclines. *Curr Drug Metab.* 2015;16(6):412-26.
190. Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today.* 2017;22(2):270-81.
191. Fiallo MM, Tayeb H, Suarato A, Garnier-Suillerot A. Circular dichroism studies on anthracycline antitumor compounds. Relationship between the molecular structure and the spectroscopic data. *J Pharm Sci.* 1998;87(8):967-75.
192. Volm M, Efferth T. Prediction of cancer drug resistance and implications for personalized medicine. *Front Oncol.* 2015;5:282.

193. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(2):157-70.
194. McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017;31(1):63-75.
195. Perez-Arnaiz C, Busto N, Leal JM, Garcia B. New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin interaction. *J Phys Chem B*. 2014;118(5):1288-95.
196. Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res*. 2001;61(6):2467-71.
197. Lee KC, Bramley RL, Cowell IG, Jackson GH, Austin CA. Proteasomal inhibition potentiates drugs targeting DNA topoisomerase II. *Biochem Pharmacol*. 2016;103:29-39.
198. Schrader J, Henneberg F, Mata RA, Tittmann K, Schneider TR, Stark H, et al. The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science*. 2016;353(6299):594-8.
199. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*. 2010;17(5):421-33.
200. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(1):84-9.
201. Meredith AM, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68(6):729-41.
202. Dubbelboer IR, Lilienberg E. A model-based approach to assessing the importance of intracellular binding sites in doxorubicin disposition. *Mol Pharm*. 2017;14(3):686-98.
203. Chen N-T, Wu C-Y, Chung C-Y, Hwu Y, Cheng S-H, Mou C-Y, et al. Probing the dynamics of doxorubicin-dna intercalation during the initial activation of apoptosis by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *PloS one*. 2012;7(9):e44947.
204. Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, et al. Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2001;1(2):113-30.
205. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267-85.
206. Coldwell K, Cutts SM, Ognibene TJ, Henderson PT, Phillips DR. Detection of adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2010;613:103-18.

207. Tahover E, Patil YP, Gabizon AA. Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index: Focus on liposomes. *Anticancer Drugs*. 2015;26(3):241-58.
208. Zhang B, Qian D, Ma HH, Jin R, Yang PX, Cai MY, et al. Anthracyclines disrupt telomere maintenance by telomerase through inducing PinX1 ubiquitination and degradation. *Oncogene*. 2012;31(1):1-12.
209. Doroshow JH, Synold TW, Somlo G, Akman SA, Gajewski E. Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin. *Blood*. 2001;97(9):2839-45.
210. Sterba M, Popelova O, Vavrova A, Jirkovsky E, Kovarikova P, Gersl V, et al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(8):899-929.
211. Cappetta D, Rossi F, Piegari E, Quaini F, Berrino L, Urbanek K, et al. Doxorubicin targets multiple players: A new view of an old problem. *Pharmacol Res*. 2017. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.016.
212. Kawase M, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Umehara H, et al. Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1584(2-3):104-14.
213. Liu YY, Yu JY, Yin D, Patwardhan GA, Gupta V, Hirabayashi Y, et al. A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. *FASEB J*. 2008;22(7):2541-51.
214. Piscitelli SC, Rodvold KA, Rushing DA, Tewksbury DA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin in patients with small cell lung cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 1993;53(5):555-61.
215. Lal S, Mahajan A, Chen WN, Chowbay B. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Curr Drug Metab*. 2010;11(1):115-28.
216. Soininen SK, Vellonen KS, Heikkinen AT, Auriola S, Ranta VP, Urtti A, et al. Intracellular PK/PD Relationships of free and liposomal doxorubicin: quantitative analyses and PK/PD modeling. *Mol Pharm*. 2016;13(4):1358-65.
217. Behnia K, Boroujerdi M. Investigation of the enterohepatic recirculation of Adriamycin and its metabolites by a linked-rat model. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;41(5):370-6.
218. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(6):431-44.
219. Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(1):118-33.

220. Dragojevic-Simic V, Dobric S, Jacevic V, Bokonjic D, Milosavljevic I, Kovacevic A, et al. Efficacy of amifostine in protection against doxorubicin-induced acute cardiotoxic effects in rats. *Vojnosanit Pregl*. 2013;70(1):38-45.
221. Kankeu C, Clarke K, Passante E, Huber HJ. Doxorubicin-induced chronic dilated cardiomyopathy-the apoptosis hypothesis revisited. *J Mol Med (Berl)*. 2017;95(3):239-48.
222. Lipshultz SE, Karnik R, Sambatakos P, Franco VI, Ross SW, Miller TL. Anthracycline-related cardiotoxicity in childhood cancer survivors. *Curr Opin Cardiol*. 2014;29(1):103-12.
223. Eschenhagen T, Force T, Ewer MS, de Keulenaer GW, Suter TM, Anker SD, et al. Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(1):1-10.
224. Rodvold KA, Rushing DA, Tewksbury DA. Doxorubicin clearance in the obese. *J Clin Oncol*. 1988;6(8):1321-7.
225. Volkova M, Russell R, 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev*. 2011;7(4):214-20.
226. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M, Voute PA. Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children: a systematic review. *Ann Oncol*. 2002;13(4):503-12.
227. Jain D, Russell RR, Schwartz RG, Panjra GS, Aronow W. Cardiac complications of cancer therapy: pathophysiology, identification, prevention, treatment, and future directions. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(5):36.
228. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973;32(2):302-14.
229. Nohl H. Demonstration of the existence of an organo-specific NADH dehydrogenase in heart mitochondria. *Eur J Biochem*. 1987;169(3):585-91.
230. Li T, Danelisen I, Singal PK. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem*. 2002;232(1-2):19-26.
231. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996;98(5):1253-60.
232. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*. 2012;2012:137289.
233. Ashley N, Poulton J. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378(3):450-5.

234. Jungsuwadee P, Nithipongvanitch R, Chen Y, Oberley TD, Butterfield DA, St Clair DK, et al. Mrp1 localization and function in cardiac mitochondria after doxorubicin. *Mol Pharmacol*. 2009;75(5):1117-26.
235. Montaigne D, Marechal X, Preau S, Baccouch R, Modine T, Fayad G, et al. Doxorubicin induces mitochondrial permeability transition and contractile dysfunction in the human myocardium. *Mitochondrion*. 2011;11(1):22-6.
236. Sacco G, Giampietro R, Salvatorelli E, Menna P, Bertani N, Graiani G, et al. Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity. *Br J Pharmacol*. 2003;139(3):641-51.
237. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 2003;97(11):2869-79.
238. Plosker GL, Faulds D. Epirubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cancer chemotherapy. *Drugs*. 1993;45(5):788-856.
239. Shi Y, Moon M, Dawood S, McManus B, Liu PP. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz*. 2011;36(4):296-305.
240. Webster DM, Sundaram P, Byrne ME. Injectable nanomaterials for drug delivery: carriers, targeting moieties, and therapeutics. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;84(1):1-20.
241. Vincent DT, Ibrahim YF, Espey MG, Suzuki YJ. The role of antioxidants in the era of cardiooncology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(6):1157-68.
242. Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, et al. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol*. 1983;10(1 Suppl 1):53-5.
243. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2258-62.
244. Waldner R, Laschan C, Lohninger A, Gessner M, Tuchler H, Huemer M, et al. Effects of doxorubicin-containing chemotherapy and a combination with L-carnitine on oxidative metabolism in patients with non-Hodgkin lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132(2):121-8.
245. Iarussi D, Auricchio U, Agretto A, Murano A, Giuliano M, Casale F, et al. Protective effect of coenzyme Q10 on anthracyclines cardiotoxicity: control study in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Mol Aspects Med*. 1994;15 Suppl:s207-12.
246. van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LC. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(2):Cd003917.

247. Tashakori Beheshti A, Mostafavi Toroghi H, Hosseini G, Zarifian A, Homaei Shandiz F, Fazlinezhad A. Carvedilol administration can prevent doxorubicin-induced cardiotoxicity: a double-blind randomized trial. *Cardiology*. 2016;134(1):47-53.
248. Elitok A, Oz F, Cizgici AY, Kilic L, Ciftci R, Sen F, et al. Effect of carvedilol on silent anthracycline-induced cardiotoxicity assessed by strain imaging: A prospective randomized controlled study with six-month follow-up. *Cardiol J*. 2014;21(5):509-15.
249. Asselin BL, Devidas M, Chen L, Franco VI, Pullen J, Borowitz MJ, et al. cardioprotection and safety of dexrazoxane in patients treated for newly diagnosed t-cell acute lymphoblastic leukemia or advanced-stage lymphoblastic non-hodgkin lymphoma: a report of the children's oncology group randomized trial pediatric oncology group 9404. *J Clin Oncol*. 2016;34(8):854-62.
250. Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, et al. Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res*. 2007;67(18):8839-46.
251. Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T, Green DM, Meropol NJ, Wasserman TH, et al. American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol*. 2009;27(1):127-45.
252. Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, Constine LS, et al. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):493-500.
253. Poljsak B, Milisav I. The neglected significance of “antioxidative stress”. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:12.doi: 10.1155/2012/480895.
254. Chandran K, Aggarwal D, Migrino RQ, Joseph J, McAllister D, Konorev EA, et al. Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. *Biophys J*. 2009;96(4):1388-98.
255. James AM, Cocheme HM, Smith RA, Murphy MP. Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. *J Biol Chem*. 2005;280(22):21295-312.
256. Black L, Berenbaum MC. Factors affecting the dye exclusion test for cell viability. *Exp Cell Res*. 1964;35:9-13.
257. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
258. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-6.
259. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for

alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986;24(7):481-95.

260. Bergmeyer HU, Bowers GN, Jr., Horder M, Moss DW. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chim Acta.* 1976;70(2):F19-29.

261. Hørder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC): scientific division, committee on enzymes. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine (N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). IFCC Recommendation. *J Automat Chem.* 1990;12(1):22-40.

262. Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res.* 2010;44(10):1098-124.

263. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-55.

264. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974. p.674-84.

265. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia.* 1974;30(6):665-7.

266. Weissman SM. Red Cell Metabolism. *A Manual of Biochemical Methods.* 2nd Edition. *Yale J Biol Med.* 1976;49(3):310-1.

267. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.

268. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.

269. Alvarez-Cedron L, Sayalero ML, Lanao JM. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;721(2):271-8.

270. Zhou Q, Chowbay B. Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;30(4):1063-74.

271. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010;99(3):306-14.

272. Ignacio Barrasa J, Olmo N, Perez-Ramos P, Santiago-Gomez A, Lecona E, Turnay J, et al. Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis.* 2011;16(10):1054-67.

273. Alasmael N, Mohan R, Meira LB, Swales KE, Plant NJ. Activation of the Farnesoid X-receptor in breast cancer cell lines results in cytotoxicity but not increased migration potential. *Cancer Lett.* 2016;370(2):250-9.
274. Wachs FP, Krieg RC, Rodrigues CM, Messmann H, Kullmann F, Knuchel-Clarke R, et al. Bile salt-induced apoptosis in human colon cancer cell lines involves the mitochondrial transmembrane potential but not the CD95 (Fas/Apo-1) receptor. *Int J Colorectal Dis.* 2005;20(2):103-13.
275. Sokol RJ, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Kobak GE, Gumprich E. Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41(2):235-43.
276. Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology.* 1994;19(2):471-9.
277. Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicol Sci.* 2000;57(1):177-85.
278. Palmeira CM, Rolo AP. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology.* 2004;203(1-3):1-15.
279. Anwer MS, Engelking LR, Nolan K, Sullivan D, Zimniak P, Lester R. Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca⁺⁺ activity of isolated rat hepatocytes. *Hepatology.* 1988;8(4):887-91.
280. Araki Y, Katoh T, Ogawa A, Bamba S, Andoh A, Koyama S, et al. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(6):769-80.
281. Fuse Y, Kobayashi M. Conservation of the Keap1-Nrf2 system: an evolutionary journey through stressful space and time. *Molecules.* 2017;22(3). doi: 10.3390/molecules22030436.
282. Zhang W, Chen L, Feng H, Wang W, Cai Y, Qi F, et al. Rifampicin-induced injury in HepG2 cells is alleviated by TUDCA via increasing bile acid transporters expression and enhancing the Nrf2-mediated adaptive response. *Free Radic Biol Med.* 2017;112:24-35.
283. Bai Y, Chen Q, Sun YP, Wang X, Lv L, Zhang LP, et al. Sulforaphane Protection against the development of doxorubicin-induced chronic heart failure is associated with Nrf2 upregulation. *Cardiovasc Ther.* 2017. doi: 10.1111/1755-5922.12277.
284. Ryoo IG, Kim G, Choi BH, Lee SH, Kwak MK. Involvement of NRF2 signaling in doxorubicin resistance of cancer stem cell-enriched colonospheres. *Biomol Ther (Seoul).* 2016;24(5):482-8.
285. Peng H, Wang H, Xue P, Hou Y, Dong J, Zhou T, et al. Suppression of NRF2-ARE activity sensitizes chemotherapeutic agent-induced cytotoxicity in human acute monocytic leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;292:1-7.

286. Janicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117(1):219-21.
287. Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2001;61(1):348-54.
288. Stankov K. Genetic predisposition for type 1 diabetes mellitus-The role of endoplasmic reticulum stress in human disease etiopathogenesis. *J Med Biochem.* 2010;29(3):139-49.
289. Shapiro DJ, Livezey M, Yu L, Zheng X, Andruska N. Anticipatory UPR activation: a protective pathway and target in cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(10):731-41.
290. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(3):141-8.
291. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods.* 2005;35(4):373-81.
292. Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(9):581-97.
293. Szymanski J, Janikiewicz J, Michalska B, Patalas-Krawczyk P, Perrone M, Ziolkowski W, et al. Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
294. Zhuang S, Li Q, Cai L, Wang C, Lei X. Chemoproteomic profiling of bile acid interacting proteins. *ACS Cent Sci.* 2017;3(5):501-9.
295. Sasaki M, Nakanuma Y. Bile acids and deregulated cholangiocyte autophagy in primary biliary cholangitis. *Dig Dis.* 2017;35(3):210-6.
296. Gafar AA, Draz HM, Goldberg AA, Bashandy MA, Bakry S, Khalifa MA, et al. Lithocholic acid induces endoplasmic reticulum stress, autophagy and mitochondrial dysfunction in human prostate cancer cells. *Peer J.* 2016;4:e2445.
297. Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, Sukhomlin TK, Tepikin AV, Petersen OH, et al. Bile acids induce Ca²⁺ release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. *J Biol Chem.* 2006;281(52):40154-63.
298. Duan Y, Gross RA, Sheu SS. Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *J Physiol.* 2007;585(Pt 3):741-58.
299. Gifford JB, Hill R. GRP78 influences chemoresistance and prognosis in cancer. *Curr Drug Targets.* 2017. doi: 10.2174/1389450118666170615100918.

300. Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J.* 2011;434(2):181-8.
301. Pujari R, Jose J, Bhavnani V, Kumar N, Shastry P, Pal JK. Tamoxifen-induced cytotoxicity in breast cancer cells is mediated by glucose-regulated protein 78 (GRP78) via AKT (Thr308) regulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;77(Pt A):57-67.
302. Wang Y, Wang W, Wang S, Wang J, Shao S, Wang Q. Down-regulation of GRP78 is associated with the sensitivity of chemotherapy to VP-16 in small cell lung cancer NCI-H446 cells. *BMC Cancer.* 2008;8:372.
303. Lee HK, Xiang C, Cazacu S, Finniss S, Kazimirsky G, Lemke N, et al. GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. *Neuro Oncol.* 2008;10(3):236-43.
304. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem.* 2003;278(23):20915-24.
305. Kim SJ, Park KM, Kim N, Yeom YI. Doxorubicin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339(2):463-8.
306. Wang L, Chan JY, Zhou X, Cui G, Yan Z, Wang L, et al. A novel agent enhances the chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in mcf-7 breast cancer cells. *Front Pharmacol.* 2016;7:249.
307. Lin ZP, Boller YC, Amer SM, Russell RL, Pacelli KA, Patierno SR, et al. Prevention of brefeldin a-induced resistance to teniposide by the proteasome inhibitor MG-132: Involvement of NF- κ B activation in drug resistance. *Cancer Res.* 1998;58(14):3059-65.
308. Chakravarty G, Mathur A, Mallade P, Gerlach S, Willis J, Datta A, et al. Nelfinavir targets multiple drug resistance mechanisms to increase the efficacy of doxorubicin in MCF-7/Dox breast cancer cells. *Biochimie.* 2016;124:53-64.
309. Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, et al. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(5):310-22.
310. Swales KE, Korbonits M, Carpenter R, Walsh DT, Warner TD, Bishop-Bailey D. The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. *Cancer Res.* 2006;66(20):10120-6.
311. Fang S, Tsang S, Jones R, Ponugoti B, Yoon H, Wu SY, et al. The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J Biol Chem.* 2008;283(50):35086-95.
312. Kemper JK. Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(8):842-50.

313. Jain S, Wei J, Mitrani LR, Bishopric NH. Auto-acetylation stabilizes p300 in cardiac myocytes during acute oxidative stress, promoting STAT3 accumulation and cell survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;135(1):103-14.
314. Krattinger R, Bostrom A, Schioth HB, Thasler WE, Mwinyi J, Kullak-Ublick GA. microRNA-192 suppresses the expression of the farnesoid X receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310(11):G1044-51.
315. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015;64(5):800-12.
316. Geng L, Chaudhuri A, Talmon G, Wisecarver JL, Are C, Brattain M, et al. MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer. *Oncogene.* 2014;33(46):5332-40.
317. Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, Wolff S, Moll UM, Schepeler T, et al. p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2008;68(24):10094-104.
318. Zhong XY, Yu JH, Zhang WG, Wang ZD, Dong Q, Tai S, et al. MicroRNA-421 functions as an oncogenic miRNA in biliary tract cancer through down-regulating farnesoid X receptor expression. *Gene.* 2012;493(1):44-51.
319. Kim DH, Lee JW. Tumor suppressor p53 regulates bile acid homeostasis via small heterodimer partner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(30):12266-70.
320. Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo YY, et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12604-11.
321. Ananthanarayanan M, Li Y, Surapureddi S, Balasubramanian N, Ahn J, Goldstein JA, et al. Histone H3K4 trimethylation by MLL3 as part of ASCOM complex is critical for NR activation of bile acid transporter genes and is downregulated in cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(5):G771-G81.
322. Lee J, Kim DH, Lee S, Yang QH, Lee DK, Lee SK, et al. A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(21):8513-8.
323. Jansson M, Durant ST, Cho EC, Sheahan S, Edelmann M, Kessler B, et al. Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1431-9.
324. Kanamaluru D, Xiao Z, Fang S, Choi SE, Kim DH, Veenstra TD, et al. Arginine methylation by PRMT5 at a naturally occurring mutation site is critical for liver metabolic regulation by small heterodimer partner. *Mol Cell Biol.* 2011;31(7):1540-50.
325. Rizzo G, Renga B, Antonelli E, Passeri D, Pellicciari R, Fiorucci S. The methyl transferase PRMT1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9-cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes. *Mol Pharmacol.* 2005;68(2):551-8.

326. Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, Chen WY, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(14):1079-85.
327. Costarelli V, Sanders TA. Acute effects of dietary fat composition on postprandial plasma bile acid and cholecystokinin concentrations in healthy premenopausal women. *Br J Nutr.* 2001;86(4):471-7.
328. Costarelli V, Sanders TA. Plasma deoxycholic acid concentration is elevated in postmenopausal women with newly diagnosed breast cancer. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(9):925-7.
329. Javitt NB, Budai K, Miller DG, Cahan AC, Raju U, Levitz M. Breast-gut connection: origin of chenodeoxycholic acid in breast cyst fluid. *Lancet.* 1994;343(8898):633-5.
330. Silva J, Dasgupta S, Wang G, Krishnamurthy K, Ritter E, Bieberich E. Lipids isolated from bone induce the migration of human breast cancer cells. *J Lipid Res.* 2006;47(4):724-33.
331. Catalano S, Malivindi R, Giordano C, Gu G, Panza S, Bonofiglio D, et al. Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor Leydig cells. *J Biol Chem.* 2010;285(8):5581-93.
332. Journe F, Laurent G, Chaboteaux C, Nonclercq D, Durbecq V, Larsimont D, et al. Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107(1):49-61.
333. Journe F, Durbecq V, Chaboteaux C, Rouas G, Laurent G, Nonclercq D, et al. Association between farnesoid X receptor expression and cell proliferation in estrogen receptor-positive luminal-like breast cancer from postmenopausal patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115(3):523-35.
334. Koutsounas I, Giaginis C, Theocharis S. Farnesoid X Receptor (FXR) from normal to malignant state. *Histol Histopathol.* 2012;27(7):835-53.
335. Lai K, Harnish DC, Evans MJ. Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem.* 2003;278(38):36418-29.
336. Fukase K, Ohtsuka H, Onogawa T, Oshio H, Ii T, Mutoh M, et al. Bile acids repress E-cadherin through the induction of Snail and increase cancer invasiveness in human hepatobiliary carcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99(9):1785-92.
337. Strauch ED, Yamaguchi J, Bass BL, Wang JY. Bile salts regulate intestinal epithelial cell migration by nuclear factor-kappa B-induced expression of transforming growth factor-beta. *J Am Coll Surg.* 2003;197(6):974-84.
338. Zhang Y, Gong W, Dai S, Huang G, Shen X, Gao M, et al. Downregulation of human farnesoid X receptor by miR-421 promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2012;10(4):516-22.

339. Li YT, Swales KE, Thomas GJ, Warner TD, Bishop-Bailey D. Farnesoid x receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2606-11.
340. Giordano C, Catalano S, Panza S, Vizza D, Barone I, Bonofiglio D, et al. Farnesoid X receptor inhibits tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cell growth through downregulation of HER2 expression. *Oncogene.* 2011;30(39):4129-40.
341. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget.* 2017;8(5):8921-46.
342. Dashzeveg N, Yoshida K. Crosstalk between tumor suppressors p53 and PKCdelta: Execution of the intrinsic apoptotic pathways. *Cancer Lett.* 2016;377(2):158-63.
343. Bilim V, Kawasaki T, Takahashi K, Tomita Y. Adriamycin induced G2/M cell cycle arrest in transitional cell cancer cells with wt p53 and p21(WAF1/CIP1) genes. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000;19(4):483-8.
344. Xia M, Knezevic D, Vassilev LT. p21 does not protect cancer cells from apoptosis induced by nongenotoxic p53 activation. *Oncogene.* 2011;30(3):346-55.
345. Zhang W, Kornblau SM, Kobayashi T, Gambel A, Claxton D, Deisseroth AB. High levels of constitutive WAF1/Cip1 protein are associated with chemoresistance in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 1995;1(9):1051-7.
346. Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgartner M, Fritz G, Kaina B. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA repair.* 2003;2(1):49-60.
347. Martin D, Salinas M, Fujita N, Tsuruo T, Cuadrado A. Ceramide and reactive oxygen species generated by H2O2 induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem.* 2002;277(45):42943-52.
348. Millour J, de Olano N, Horimoto Y, Monteiro LJ, Langer JK, Aligue R, et al. ATM and p53 regulate FOXM1 expression via E2F in breast cancer epirubicin treatment and resistance. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(6):1046-58.
349. Hamilton G, Rath B. A short update on cancer chemoresistance. *Wien Med Wochenschr.* 2014;164(21-22):456-60.
350. Ballatori N, Rebbear JF. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis.* 1998;18(4):377-87.
351. Komori Y, Arisawa S, Takai M, Yokoyama K, Honda M, Hayashi K, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits overexpression of P-glycoprotein induced by doxorubicin in HepG2 cells. *Eur J Pharmacol.* 2014;724:161-7.
352. Becquemont L, Glaeser H, Drescher S, Hitzl M, Simon N, Murdter TE, et al. Effects of ursodeoxycholic acid on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4-dependent pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(5):449-60.

353. Kneuer C, Honscha W, Gabel G, Honscha KU. Adaptive response to increased bile acids: induction of MDR1 gene expression and P-glycoprotein activity in renal epithelial cells. *Pflugers Arch.* 2007;454(4):587-94.
354. Yang L, Fawcett JP, Ostergaard J, Zhang H, Tucker IG. Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. *Mol Pharm.* 2012;9(1):29-36.
355. Mazzanti R, Fantappie O, Kamimoto Y, Gatmaitan Z, Gentilini P, Arias IM. Bile acid inhibition of P-glycoprotein-mediated transport in multidrug-resistant cells and rat liver canalicular membrane vesicles. *Hepatology.* 1994;20(1 Pt 1):170-6.
356. Wimmer R, Hohenester S, Pusl T, Denk GU, Rust C, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid exerts anticholestatic effects by a cooperative cPKC alpha-/PKA-dependent mechanism in rat liver. *Gut.* 2008;57(10):1448-54.
357. Malatkova P, Wsol V. Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metab Rev.* 2014;46(1):96-123.
358. Heibein AD, Guo B, Sprowl JA, Maclean DA, Parissenti AM. Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization. *BMC Cancer.* 2012;12:381.
359. Olson LE, Bedja D, Alvey SJ, Cardounel AJ, Gabrielson KL, Reeves RH. Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res.* 2003;63(20):6602-6.
360. Jo A, Choi TG, Jo YH, Jyothi KR, Nguyen MN, Kim JH, et al. Inhibition of carbonyl reductase 1 safely improves the efficacy of doxorubicin in breast cancer treatment. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26(2):70-83.
361. Xiao J, Sun GB, Sun B, Wu Y, He L, Wang X, et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology.* 2012;292(1):53-62.
362. Ascensao A, Oliveira PJ, Magalhaes J. Exercise as a beneficial adjunct therapy during Doxorubicin treatment--role of mitochondria in cardioprotection. *Int J Cardiol.* 2012;156(1):4-10.
363. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009;61(1):154-71.
364. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol.* 2014;5:25.
365. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J clin Invest.* 2014;124(2):617-30.

366. Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem.* 1990;35(2-3):247-57.
367. Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B. Anthracyclines and mitochondria. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:385-419.
368. Govender J, Loos B, Marais E, Engelbrecht AM. Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. *J Pineal Res.* 2014;57(4):367-80.
369. Ren D, Zhu Q, Li J, Ha T, Wang X, Li Y. Overexpression of angiopoietin-1 reduces doxorubicin-induced apoptosis in cardiomyocytes. *J Biomed Res.* 2012;26(6):432-8.
370. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012;18(11):1639-42.
371. Lamkanfi M, Kalai M, Vandenabeele P. Caspase-12: an overview. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):365-8.
372. Venkatesan B, Prabhu SD, Venkatachalam K, Mummidi S, Valente AJ, Clark RA, et al. WNT1-inducible signaling pathway protein-1 activates diverse cell survival pathways and blocks doxorubicin-induced cardiomyocyte death. *Cell Signal.* 2010;22(5):809-20.
373. Deng S, Yan T, Jendry C, Nemecek A, Vincetic M, Gödtel-Armbrust U, et al. Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both Topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer.* 2014;14(1):1-11.
374. Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(12):2351-5.
375. Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1227-37.
376. Bernuzzi F, Recalcati S, Alberghini A, Cairo G. Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: role for heme oxygenase-1 down-modulation. *Chem Biol Interact.* 2009;177(1):12-20.
377. Budde T, Haney J, Bien S, Schwebe M, Riad A, Tschöpe C, et al. Acute exposure to doxorubicin results in increased cardiac P-glycoprotein expression. *J Pharm Sci.* 2011;100(9):3951-8.
378. van Asperen J, van Tellingen O, Tijssen F, Schinkel AH, Beijnen JH. Increased accumulation of doxorubicin and doxorubicinol in cardiac tissue of mice lacking mdr1a P-glycoprotein. *Br J Cancer.* 1999;79(1):108-13.
379. Sridhar R, Dwivedi C, Anderson J, Baker PB, Sharma HM, Desai P, et al. Effects of verapamil on the acute toxicity of doxorubicin in vivo. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(21):1653-60.

380. Hartmann G, Vassileva V, Piquette-Miller M. Impact of endotoxin-induced changes in P-glycoprotein expression on disposition of doxorubicin in mice. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(6):820-8.
381. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(9):547-58.
382. Hidemura K, Zhao YL, Ito K, Nakao A, Tatsumi Y, Kanazawa H, et al. Shiga-like toxin II impairs hepatobiliary transport of doxorubicin in rats by down-regulation of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein Mrp2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(5):1636-42.
383. Zhou Q, Chowbay B. Effect of coenzyme Q10 on the disposition of doxorubicin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2002;27(3):185-92.
384. Mikov M, Kevresan S, Kuhajda K, Jakovljevic V, Vasovic V. 3Alpha,7alpha-dihydroxy-12-oxo-5beta-cholanate as blood-brain barrier permeator. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(3):367-71.
385. Golocorbin-Kon S, Mikov M, Arafat M, Lepojevic Z, Mikov I, Sahman-Zaimovic M, et al. Cefotaxime pharmacokinetics after oral application in the form of 3alpha,7alpha-dihydroxy-12-keto-5beta-cholanate microvesicles in rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;34(1):31-6.
386. Biswas S, Dodwadkar NS, Deshpande PP, Parab S, Torchilin VP. Surface functionalization of doxorubicin-loaded liposomes with octa-arginine for enhanced anticancer activity. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;84(3):517-25.
387. Marcucci F, Corti A. Improving drug penetration to curb tumor drug resistance. *Drug Discov Today.* 2012;17(19):1139-46.
388. Chai X, Zeng S, Xie W. Nuclear receptors PXR and CAR: Implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(3):253-66.
389. van Asperen J, van Tellingen O, Beijnen JH. The role of mdr1a P-glycoprotein in the biliary and intestinal secretion of doxorubicin and vinblastine in mice. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(3):264-7.
390. Vlaming ML, Mohrmann K, Wagenaar E, de Waart DR, Elferink RP, Lagas JS, et al. Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(1):319-27.
391. Tan LT-H, Chan K-G, Pusparajah P, Lee W-L, Chuah L-H, Khan TM, et al. Targeting membrane lipid a potential cancer cure? *Front Pharmacol.* 2017;8:12. doi: 10.3389/fphar.2017.00012