

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET



Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Matilda Djolai
Prof. dr Momir Mikov

Kandidat: Asist. dr Bojana Andrejić Višnjić

Novi Sad, 2015. godine

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

UNIVERZITET U NOVOM SADU
NAZIV FAKULTETA - 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	Bojana Andrejić Višnjić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Matilda Djolai Prof. dr Momir Mikov
Naslov rada: NR	Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
Jezik publikacije: JP	srpski/ latinica
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	7 broj poglavlja, 220 stranica, 56 slika, 25 grafikona, 39 tabela i 256 referenci
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Histologija, Patologija Farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Žučne kiseline i soli; Ursodeoksiholna kiselina; Holne kiseline; Eksperimentalni dijabetes melitus; Oksidativni stres; Apoptoza; Jetra; Nuklearni

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

	receptori
UDK	615.2.01:547.93 612.085.1
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Žučne kiseline (ŽK) su strukturno raznoliki molekuli, koji pored uloge koju ostvaruju putem žuči, deluju i kao signalni molekuli i ostvaruju kako endokrina tako i parakrina dejstva. Činjenica da je do sada u terapijske svrhe primenjivana samo ursodeoksiholna kiselina (UDK), posledica je brojnih ograničenja u mogućnosti primene ostalih prirodnih ŽK, i ističe potrebu za otkrivanjem novih sintetskih ŽK i liganda.</p> <p>Cilj istraživanja bio je ispitivanje sintetske 12-monoketoholne kiseline (MK) i prirodne UDK u modelu holestaze i aloksanom izazvanog dijabetesa. Ispitivanja su vršena na pacovima soja Wistar. Analizirana je telesna masa, glikemija, pokazatelji jetrene funkcije (AST; ALT, γ-GT, ukupni i direktni bilirubin), a iz homogenate jetre određen je intenzitet lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidativnih enzima (CAT, GSH-Px, GSH-R, GSH-ST). Isecci tkiva jetre su histološki obrađeni i bojeni hematoksilin-eozin metodom i histochemijskim metodama (retikulin, Mallory, Periodic Acid Schiff- Alcian Blue (PAS/AB)). Imunohistochemijski je ispitana proliferacija hepatocita (Ki-67), markeri apoptoze (p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax) i ekspresija nuklearnog farnesoid X receptora (FXR). Rezultati istraživanja pokazuju da ispitivane ŽK pomažu očuvanje telesne mase u holestazi i dijabetesu, i značajno snižavaju glikemiju kod dijabetičnih jedinki. Parametri jetrene funkcije u holestazi i dijabetesu su regulisani primenom MK i UDK. Obe ŽK u značajnoj meri smanjuju intenzitet lipidne peroksidacije i pojačavaju enzimsku antioksidativnu odbranu hepatocita u holestazi i dijabetesu.</p> <p>Ekspresija markera apoptoze nije značajno</p>

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

	<p>promenjena izazvanjem modela holestaze i dijabetesa, kao ni primenom ispitivanih ŽK. Nasuprot tome, izazivanje holestaze i dijabetesa značajno smanjuje proliferaciju hepatocita, dok primena MK i UDK poništava ovaj efekat i značajno povećava proliferaciju hepatocita. Hiperglikemija u aloksanskom dijabetesu nije dovela do pojačane ekspresije FXR. Izazivanje holestaze kod zdravih i dijabetičnih životinja dovelo je do porasta ekspresije FXR, koja je redukovana primenom MK i UDK.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sintetska 12-monoketoholna kiselina pokazuje slična hipoglikemijska, hepatoprotektivna i antioksidativna dejstva kao i prirodna ursodeoksiholna kiselina.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	06.02.2014.
Datum odbrane: DOz	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: Karmen Stankov, vanredni profesor, Katedra za biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Dušan Lalošević, redovni profesor, Katedra za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Zoran Šegrt, vanredni profesor, Katedra za farmakologiju, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet Odbrane u Beogradu.</p> <p>član: Isidora Samojlik, vanredni profesor, Katedra za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,</p> <p>član: Biljana Srdić Galić, vanredni profesor, Katedra za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY**

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, Medical faculty
Author: AU	Bojana Andrejic Visnjic
Mentor: MN	Prof. dr Matilda Djolai Prof. dr Momir Mikov
Title: TI	Influence of synthetic and natural bile acid on oxidative stress and apoptosis in hepatocytes
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	english / Serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Ph.D Thesis contents: chapters: 7; pages: 209; pictures 56; graphs: 25; tables: 39; literature 256
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Histology, Pathology, Pharmacology

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

Physical description: PD	Ph.D Thesis contents: chapters: 7; pages: 220; pictures 56; graphs: 25; tables: 39; literature 256
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Histology, Pathology, Pharmacology
Subject, Key words SKW	Bile Acids and Salts; Ursodeoxycholic Acid; Cholic Acids; Diabetes Mellitus, Experimental; Oxidative Stress; Apoptosis; Nuclear Receptors; Liver
UC	615.2.01:547.93 612.085.1
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Bile acids (BAs) are structurally diverse molecules, which have their roles in the digestive system, which are exercised through the bile. Beside those, BAs act as signaling molecules and achieve endocrine and paracrine effects. In addition to its own metabolism, bile acids modulate the metabolism of lipids and glucose. The fact that so far only ursodeoxycholic acid (UDC) is used for therapeutic purposes, speak clearly about numerous limitations on the application of other natural BAs, and highlights the need to develop new synthetic BAs and ligands.</p> <p>The aim of this study was to investigate the influence of synthetic 12-monoketocholic acid (MC) and natural bile acid UDC in the model of cholestasis and alloxan-induced diabetes. Tests were performed on male Wistar rats. We analyzed the body mass, glucose, liver function tests (AST, ALT, γ-GT, total and direct bilirubin). Using liver tissue homogenates we determined intensity of lipid peroxidation (by concentration of malondialdehyde) and the activity of antioxidant enzymes (CAT, GSH-Px, GSH -R, GSH-ST). Liver tissue were histologically processed and stained with hematoxylin-eosin method and histochemical methods (reticulin, Mallory,</p>

	<p>Periodic Acid Schiff- Alcian Blue (PAS / AB)). Immunohistochemical examination included hepatocyte proliferation (Ki-67), markers of apoptosis (p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax), and expression of the nuclear farnesoid X receptor (FXR).</p> <p>Results of the research show that MC prevented decrease in body mass during cholestasis and diabetes, and significantly reduced glycemia in diabetic animals. The liver function tests in cholestasis and diabetes are normalised by MC and UDC application. Both BAs significantly reduce lipid peroxidation and enhance enzymatic antioxidant defense of hepatocytes in cholestasis and diabetes. The expression of markers of apoptosis was not significantly changed in models of cholestasis and diabetes, as well as the application of the tested BAs. In contrast, in cholestasis and diabetes model, the proliferation of hepatocytes was significantly reduced, while the use of MC and UDC reversed this effect and significantly increased the proliferation of hepatocytes. Hyperglycemia in alloxan-induced diabetes did not lead to overexpression of FXR. Induction of cholestasis in healthy and diabetic animals resulted in an increase in the expression of FXR, which is reduced by using the MK and the UDC.</p> <p>Based on these results we can conclude that a synthetic 12-monoketocholeic acid shows similar hypoglycemic, hepatoprotective and antioxidant effects as natural ursodeoxycholic acid.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	06.02.2014.
Defended: DE	

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

Thesis Defend Board: DB	<p>president: Karmen Stankov, Associate professor, Deptment of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Dušan Lalošević, Full professor, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Zoran Šegrt, Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Military Medical Academy Medical Faculty, Defence University Belgrade.</p> <p>member: Isidora Samojlik, Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Biljana Srdić Galić, Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>
-------------------------	---

ZAHVALNICA

Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorima, Prof. dr Matildi Djolai i Prof. dr Momiru Mikovu, na pomoći i podršci tokom celog procesa izrade disertacije. Savršenim balansom sugestija i pružanja slobode u istraživanju i pisanju, učinili su da celokupan proces izrade disertacije bude neprocenjivo iskustvo koje oplemenjuje.

Neizmernu zahvalnost dugujem Prof. dr Karmen Stankov. U momentu kada sam se našla pred naizgled nepremostivom preprekom, njeno razumevanje, dobronamernost, nesebičnost i безусловna spremnost da pomogne mladom saradniku, otvorili su mi nov i neverovatan put!

Takođe, zahvaljujem se rukovodiocima i saradnicima na projektu III 41012, na materijalnoj i stručnoj pomoći.

Veliku stručnu pomoć pružila mi je dipl. molekularni biolog Eva Moldvaji, na čemu joj se od srca zahvaljujem.

Iznad svega sam zahvalna svojoj porodici i suprugu, kojima i posvećujem ovaj rad. Bili su mi nezamenjivi oslonac u ovom radu i čitavom životu.



SADRŽAJ

Ključna dokumentacijska informacija	i
Key word documentation	iv
Zahvalnica	viii
1. UVOD.....	1
1.1. Histološka građa jetre.....	2
1.1.1. Klasični lobulus.....	2
1.1.2. Portni lobulus.....	3
1.1.3. Jetrin acinus.....	4
1.1.4. Hepatocit.....	5
1.2. Žučne kiseline.....	7
1.2.1. Sinteza i metabolizam žučnih kiselina.....	7
1.2.2. Membranski sistemi transporta žučnih kiselina i žučnih soli u hepatocitima...8	
1.2.2.1. Membranski sistemi transporta na kanalikularnom odeljku membrane hepatocita.....	8
1.2.2.2. Membranski sistemi transporta na sinusoidnom odeljku membrane hepatocita.....	9
1.2.3. Poremećaji metabolizma žučnih kiselina.....	10
1.2.3.1. Holestaza.....	10
1.2.3.1.1. Oštećenje jetre i holestaza izazvana lekovima i toksinima.....	14
1.2.3.1.2. Holestaza izazvana primenom etinilestradiola.....	15
1.2.4. Funkcije žučnih kiselina i nuklearni receptori žučnih kiselina.....	16
1.2.4.1. Funkcije žučnih kiselina.....	16
1.2.4.2. Nuklearni receptori žučnih kiselina.....	18
1.2.4.2.1. Farnesoid X receptor.....	18
1.2.4.2.2. 1.2.4.2.2. Pregnan X receptor i Konstitutivni receptor androgena.....	20
1.2.4.2.3. Receptor vitamina D.....	20
1.2.4.2.4. Receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma.....	20
1.2.4.2.5. Jetrin X receptor.....	21
1.2.4.2.6. Glukokortikoidni receptori.....	21
1.2.4.2.7. Homolog-1 jetrinog receptora.....	22
1.2.5. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina.....	22
1.2.5.1. Ursodeoksiholna kiselina (UDK).....	22
1.2.5.2. Monoketoholna kiselina (MK).....	25
1.3. Oksidativni stres.....	28
1.3.1. Odabrane vrste ROSa.....	29
1.3.2. Antioksidativna zaštita.....	31
1.3.2.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite.....	31
1.3.2.2. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite.....	32
1.3.3. OS i holestaza.....	32
1.4. Ćelijska smrt.....	34
1.4.1. Terminologija ćelijske smrti.....	34
1.4.2. Apoptoza.....	35

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

1.4.2.1. Bcl-2 familija.....	37
1.4.2.2. p53.....	39
1.4.2.3. Morfološke odlike apoptoze.....	40
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	42
3. MATERIJAL I METODE.....	44
3.1. Primijenjene hemijske supstance.....	45
3.1.1. Aloksan.....	45
3.1.2. Etinilestradiol.....	46
3.1.3. Žučne kiseline.....	47
3.1.4. Ostale supstance.....	47
3.2. Ogladne životinje i ogledne grupe, protokol ispitivanja i žrtvovanje.....	48
3.2.1. Ogladne životinje.....	48
3.2.2. Ogladne grupe.....	48
3.2.3. Protokol ispitivanja.....	50
3.2.4. Žrtvovanje životinja.....	50
3.3. Histološka i imunohistohemijska obrada tkiva.....	51
3.3.1. Interpretacija imunohistohemijskih bojenja.....	54
3.3.1.1. Proliferativni indeks hepatocita (ekspresija Ki-67).....	54
3.3.1.2. Ekspresija Bcl-2, Bcl-X, Bax i p53.....	55
3.3.1.3. Ekspresija nuklearnog FXR receptora.....	55
3.4. Biohemijske metode ispitivanja.....	58
3.4.1. Instrumenti.....	58
3.4.2. Uzimanje uzoraka i priprema za analizu.....	58
3.4.3. Homogenizacija.....	58
3.4.4. Određivanje parametara jetrene funkcije.....	58
3.4.5. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa u homogenatima tkiva.....	59
3.4.5.1. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije.....	59
3.4.5.2. Određivanje pokazatelja antioksidativne zaštite.....	60
3.4.5.2.1. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	60
3.4.5.2.2. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px).....	61
3.4.5.2.3. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GSH-R).....	62
3.4.5.2.4. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GSH-ST).....	64
3.5. Statistička obrada podataka.....	65
4. REZULTATI.....	66
4.1. Telesna masa.....	67
4.1.1. Telesna masa životinja koje nisu tretirane aloksanom.....	67
4.1.2. Telesna masa životinja sa aloksanskim dijabetesom.....	68
4.2. Vrednost šećera u krvi (ŠUK).....	70
4.2.1. Vrednost šećera u krvi životinja koje nisu tretirane aloksanom.....	70
4.2.2. Vrednost šećera u krvi životinja sa aloksanskim dijabetesom.....	71
4.3. Parametri jetrene funkcije.....	73
4.3.1. Parametri jetrene funkcije kod životinja koje nisu tretirane aloksanom.....	73
4.3.1.1. Koncentracija AST.....	73
4.3.1.2. Koncentracija ALT.....	74
4.3.1.3. Koncentracija γ -GT.....	76
4.3.1.4. Koncentracija direktnog bilirubina.....	76

4.3.1.5. Koncentracija ukupnog bilirubina.....	77
4.3.2. Parametri jetrene funkcije životinja sa aloksanskim dijabetesom.....	78
4.3.2.1. Koncentracija AST.....	78
4.3.2.2. Koncentracija ALT.....	79
4.3.2.3. Koncentracija γ -GT.....	81
4.3.2.4. Koncentracija direktnog bilirubina.....	81
4.3.2.5. Koncentracija ukupnog bilirubina.....	82
4.4. Kvalitativna histološka analiza tkiva jetre.....	84
4.4.1. Kvalitativna histološka analiza tkiva jetre životinja koje nisu tretirane aloksanom.....	84
4.4.1.1. Grupa K1 i K2.....	84
4.4.1.2. Grupa EE.....	85
4.4.1.3. Grupe E-UDK i E-MK.....	87
4.4.2. Kvalitativna histološka analiza tkiva jetre životinja sa aloksanskim dijabetesom.....	89
4.4.2.1. Grupa A.....	89
4.4.2.2. Grupa AE.....	90
4.4.2.3. Grupe AE-UDK i AE-MK.....	92
4.5. Imunohistohemijska analiza tkiva jetre.....	94
4.5.1. Imunohistohemijska analiza tkiva jetre životinja koje nisu tretirane aloksanom.....	94
4.5.1.1. Proliferativni indeks hepatocita.....	94
4.5.1.2. Ekspresija markera apoptoze.....	97
4.5.1.2.1. Ekspresija Bcl-2.....	97
4.5.1.2.2. Ekspresija Bcl-X.....	97
4.5.1.2.3. Ekspresija Bax.....	99
4.5.1.2.4. Ekspresija p53.....	101
4.5.1.3. Ekspresija FXR receptora.....	103
4.5.2. Imunohistohemijska analiza tkiva jetre životinja sa aloksanskim dijabetesom.....	107
4.5.2.1. Proliferativni indeks hepatocita.....	107
4.5.2.2. Ekspresija markera apoptoze.....	109
4.5.2.2.1. Ekspresija Bcl-2.....	109
4.5.2.2.2. Ekspresija Bcl-X.....	110
4.5.2.2.3. Ekspresija Bax.....	110
4.5.2.2.4. Ekspresija p53.....	111
4.5.2.3. Ekspresija FXR receptora.....	112
4.6. Ispitivanje intenziteta lipidne peroksidacije i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite.....	115
4.6.1. Koncentracija malonilaldehida	115
4.6.1.1. Koncentracija malonilaldehida u jetri životinja koje nisu tretirane aloksanom.....	115
4.6.1.2. Koncentracija malonilaldehida u jetri životinja sa aloksanskim dijabetesom.....	118
4.6.2. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri životinja koje nisu tretirane aloksanom.....	120

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni stres i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

4.6.2.1. Aktivnost enzima katalaze (CAT).....	120
4.6.2.2. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px).....	121
4.6.2.3. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GSH-R).....	123
4.6.2.4. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GSH-ST).....	124
4.6.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite životinja sa aloksanskim dijabetesom.....	127
4.6.3.1. Aktivnost enzima katalaze (CAT).....	129
4.6.3.2. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px).....	129
4.6.3.3. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GSH-R).....	131
4.6.3.4. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GSH-ST).....	133
5. DISKUSIJA.....	136
5.1. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na telesnu masu životinja...137	
5.2. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na vrednosti šećera u krvi.....142	
5.3. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na parametre jetrene funkcije..146	
5.4. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na histopatološke promene.....	152
5.5. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na ekspresiju Ki-67 markera i proliferaciju hepatocita.....	157
5.6. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na apoptozu hepatocita....161	
5.7. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na ekspresiju FXR u hepatocitima.....	169
5.8. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na lipidnu peroksidaciju i antioksidativne enzime hepatocita.....	174
5.6.1. Lipidna peroksidacija.....	175
5.6.2. Antioksidativni enzimi.....	180
6. ZAKLJUČCI.....	187
7. LITERATURA.....	188

1. Uvod

1.1. Histološka građa jetre

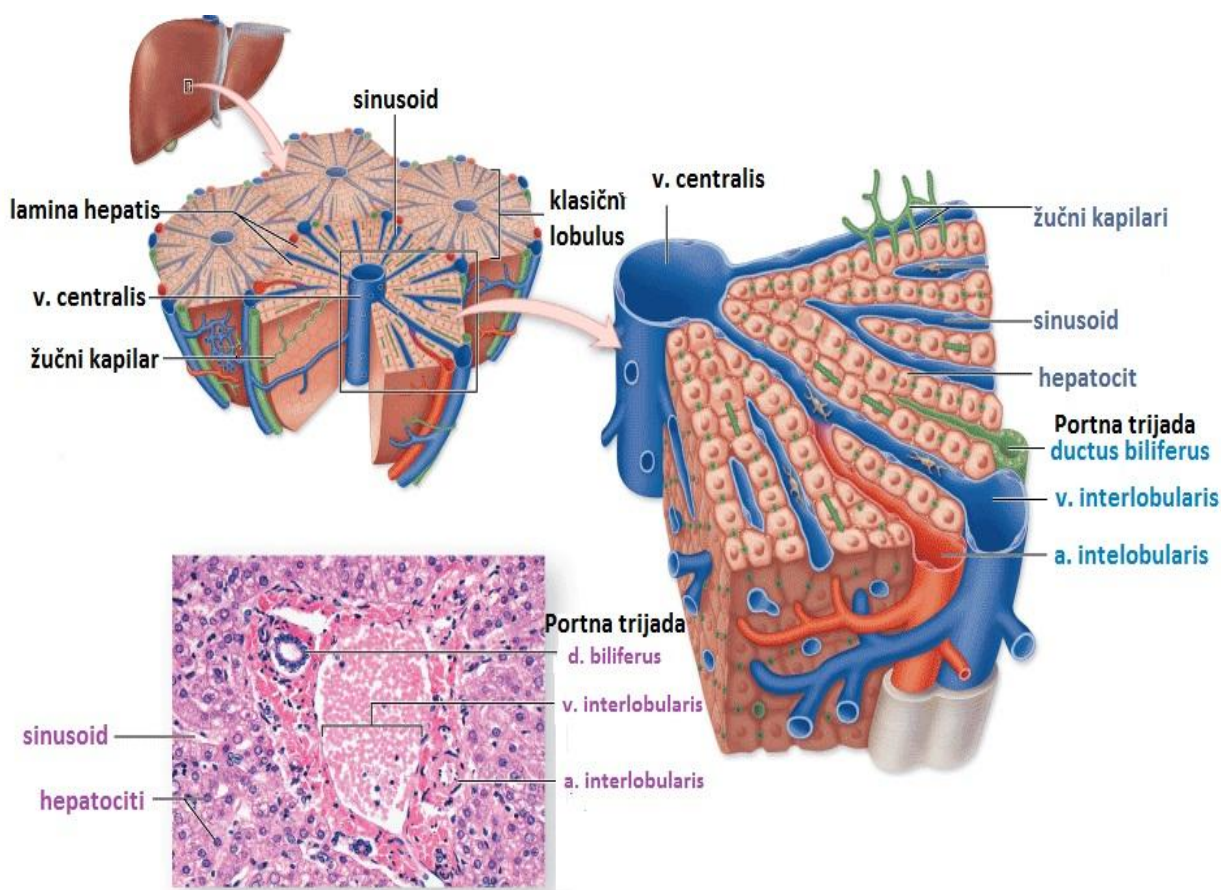
Jetra, kao organ, ima endokrinu i egzokrinu funkciju. Strukturne komponente jetre su a) hepatociti, b) vezivnotkivna stroma, c) sinusoidni kapilari (sinusoidi), d) perisinusoidni prostori i e) Kupferove i perisinusoidne (Ito) ćelije. Osnovom morfofunkcionalnom jedinicom jetre mogu se smatrati: klasični jetrin lobulus, portni lobulus i jetrin acinus (1).

1.1.1 Klasični lobulus

Heksagonalni klasični lobulusi, su u humanoj jetri u fiziološkim uslovima, gusto raspoređeni i razdvojeni oskudnim vezivnim tkivom strome (Slika 1.). Na mestu susticanja tri klasična lobulusa, nalaze se portni (Kiernanovi) prostori, u kojima se, u vezivnom tkivu, nalaze elementi portne trijade, koju čine *a. interlobularis* (ogranak hepatične arterije), *v. interlobularis* (ogranak portne vene) i dva do tri interlobularna žučna kanala (*ductus biliferus*), a prisutan je i jedan ili više limfnih sudova i nervna vlakna (1,2). Vezivo portnog prostora nastavlja se na uski Molov prostor, koji je sa druge strane ograničen graničnom pločom, strukturom gradjenom od modifikovanih hepatocita. Granična ploča ima brojne otvore kroz koje u lobulus ulaze krvni sudovi (distributivne arteriole i venule), a izlaze žučni kanali. U centru klasičnog lobulusa nalazi se centralna vena, početna grana hepatične vene.

Hepatociti su u lobulusu raspoređeni u vidu anastomozirajućih ploča (*lamina hepatis*, Remakove gredice), građenih od jednog sloja hepatocita, a pružaju se radijarno u pravcu od centralne vene prema portnim prostorima, tj periferiji lobulusa. Ploče hepatocita su međusobno razdvojene vaskularnim prostorima, sinusoidima. Od krvnih sudova portnog prostora polaze ogranci, distributivne arteriole i venule, koje probijaju graničnu ploču i izlivaju krv u sinusoidne. Nakon ulaska u sinusoidne, dolazi do mešanja arterijske i venske krvi, krv usporava svoj tok i otiče ka centralnoj veni. Perisinusoidni, tj. Diseov prostor je uzani prostor između hepatocita i sinusoidnih kapilara (Slika 2). Granicu Diseovog prostora čine bazalne membrane endotelnih ćelija sinusoida i bazalne površine hepatocita. Krv nije direktno u kontaktu sa hepatocitima, već plazma prolazi kroz pore u zidu sinusoida i prelazi u Diseov prostor, noseći hepatocitima hranljive i toksične materije, i preuzimajući produkte hepatocita. Ćelijska membrana hepatocita obrazuje mikrovile koji se pružaju u Diseov prostor

povećavajući površinu preko koje se vrši razmena materija. Tečnost Diseovih prostora je ekvivalent limfe, i ona se jednim delom vraća u sinusoidne a jednim delom ide u vezivo na periferiji lobulusa (Molovi prostori).



Slika 1. Grafički prikaz klasičnog lobulusa jetre i histološka slika dela lobulusa sa portnim prostorom (3).

U Diseovim prostorima prisutne su i Ito ćelije koje osim uloge u metabolizmu vitamina A, mogu da se diferenciraju u pravcu miofibroblasta ili da sekretuju faktore rasta i komponente strome (1,2,3).

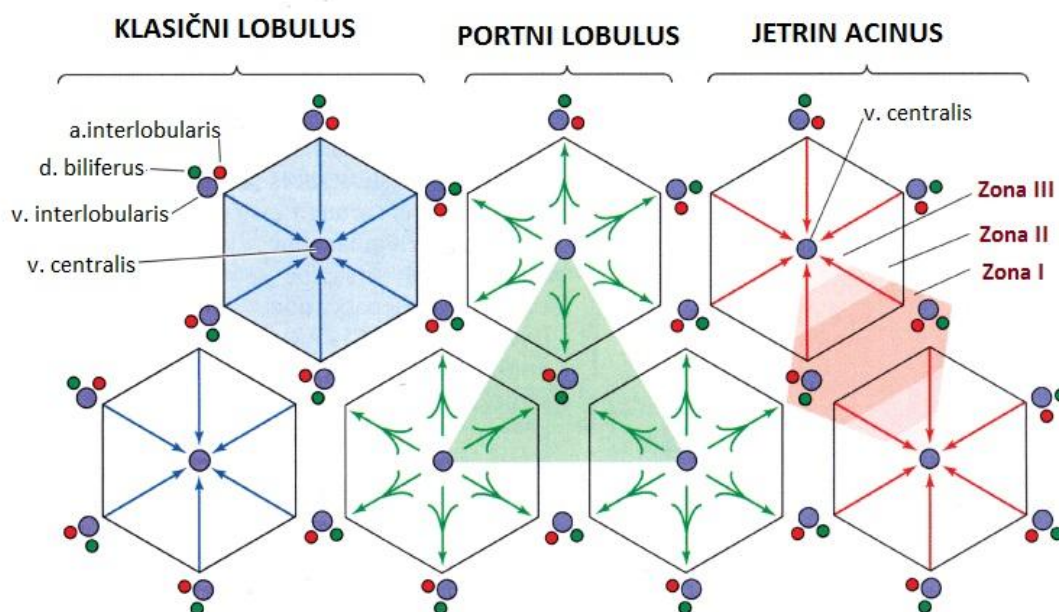
1.1.2. Portni lobulus

Klasični lobulus je prvi opisan histološki, zbog jasne ograničenosti vezivnim tkivom, ali morfofunkcionalnom jedinicom jetre može se smatrati i portni lobulus koji je morfološki odraz mreže žučnih puteva. Portni lobulus zahvata delove tri susedna klasična lobulusa iz kojih se stvorena žuč izliva u jedan žučni kanalić. To je segment tkiva koji na preseku ima

oblik jednakostraničnog trougla (Slika 3), u čijem se centru nalazi portni prostor, odnosno žučni kanalići portnog prostora (ducti biliferi), a uglove ovog lobulusa čine tri susedne centralne vene najbliže tom portnom prostoru. Stranice portnog lobulusa su linije koje povezuju uglove lobulusa tj. centralne vene (2).

1.1.3. Jetrin acinus

Treći koncept strukturne organizacije jetre, tj jetrin acinus ili Rapaportov acinus, pogodan je za tumačenje metaboličke aktivnosti i patoloških procesa u jetri (tok i redosled procesa degeneracije hepatocita kod toksičnih i hipoksičnih oštećenja). To je segment tkiva jetre oblika romba, koji zahvata otprilike po šestinu svakog od dva susedna klasična lobulusa jetre, zajedno sa interlobularnim vezivom koje ih razdvaja.



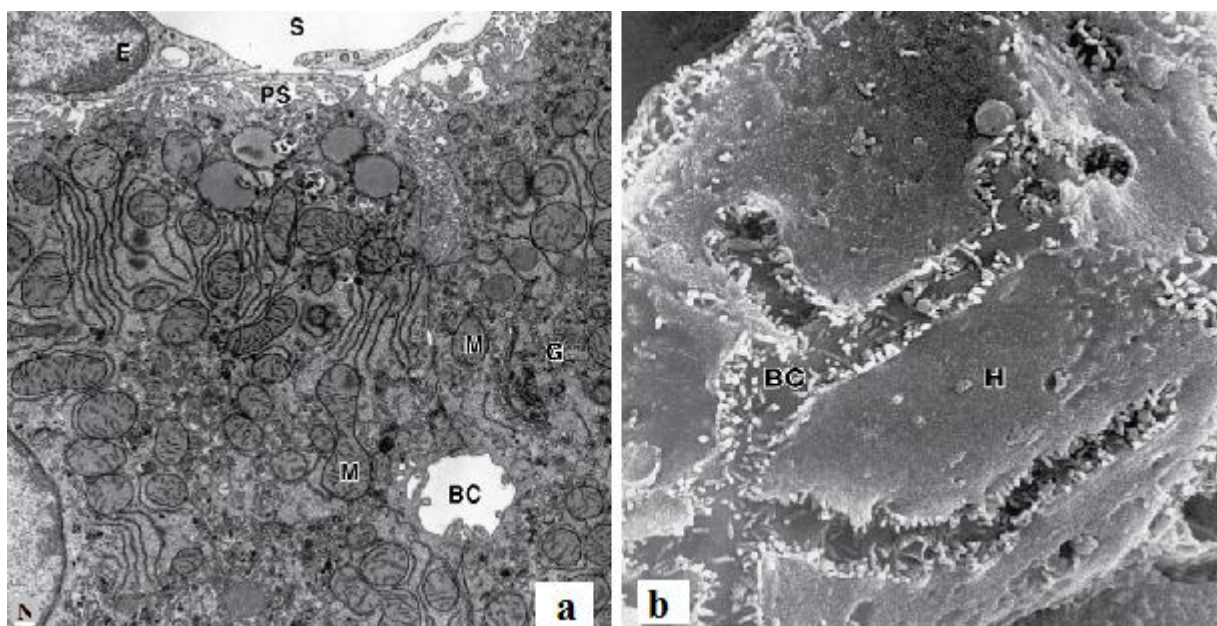
Slika 2. Šematski prikaz klasičnog i portnog lobulusa jetre i jetrinog acinusa (3).

Temena tako zamišljenog acinusa čine dva bliska portna prostora i dve centralne vene susednih klasičnih lobulusa. U centru jetrinog acinusa, nalaze se distributivne arteriole i venule. Na osnovu udaljenosti od distributivnih venula, hepatociti jetrinog acinusa mogu se razvrstati u tri koncentrične zone: periportalna zona, zona I (u blizini distributivnih krvnih sudova, tj na periferiji klasičnog lobulusa), centrolobularna zona, zona III (hepatociti oko centralne vene) i zona II (između hepatocita zone I i III, tj središnji deo acinusa) (Slika 3) (1).

Ćelije navedenih zona su u nejednakoj meri izložene supstancama iz krvi, posebno kiseoniku i toksičnim materijama, te imaju različit stepen metaboličke aktivnosti, distribucije i aktivnosti enzima i “sudbinu” u slučaju ishemije, intoksikacije i holestaze. Hepatociti zone I su metabolički najaktivniji, u najpovoljnijem su položaju što se tiče ishemije, ali i najugroženiji u slučaju intoksikacije ili holestaze. Nasuprot njima, hepatociti zone III su u najgorem položaju kod cirkulatornih i ishemijskih poremećaja, a u najpovoljnijem kod toksičnih i holestaznih premećaja (3).

1.1.4. Hepatocit

Hepatociti su dominantan tip ćelija jetre (80% ćelijske populacije u jetri). Poligonalnog oblika, bogate mitohondrijama i glatkim endoplazmatskim retikulumom, mono- ili binuklearne, sa nekoliko nukleolusa (1).

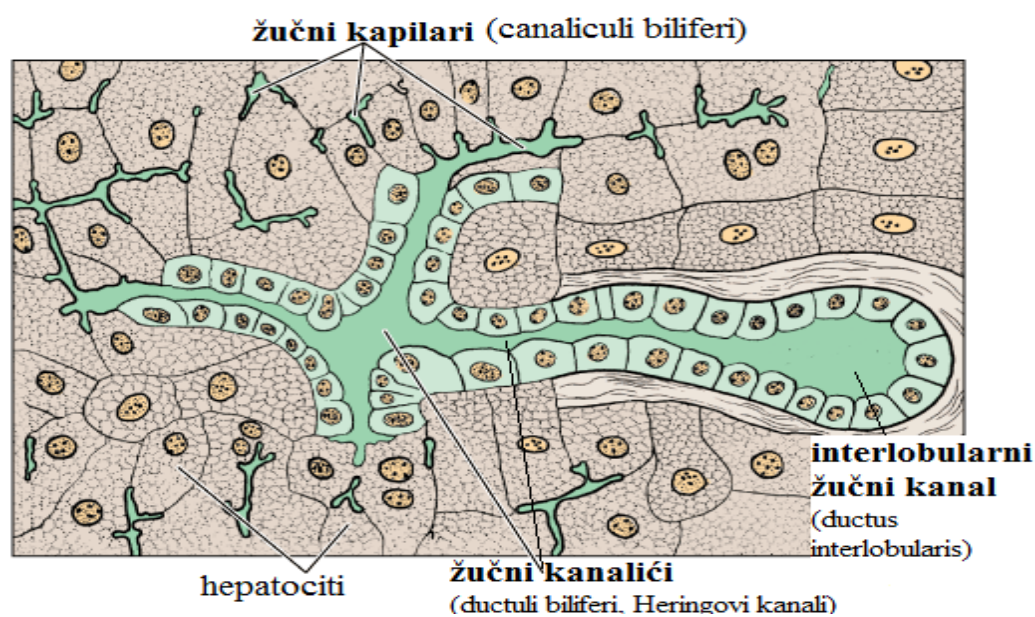


Slika 3. Hepatocit (H).

Legenda: **(a)** transmisioni elektronski mikroskop (TEM, x9500) - žučni kapilar između dva hepatocita (BC) u čijem se lumenu zapažaju kratki mikrovili. U citoplazmi hepatocita uočava se jedro (N), brojne mitohondrije (M) i Goldži kompleks (G) a prema perisinusoidnim prostorima (PS) membrana hepatocita formira brojne mikrovile. Uočava se i endotelna ćelija (E) koja oblaže lumen sinusoida (S). **(b)** skening elektronski mikroskop (SEM)- žučni kapilar (BC) koji se pruža po površini ćelije (3).

Hepatociti su vrlo polarizovane ćelije tako da razlikujemo *sinusoidalni (bazalni, bazolateralni) odeljak plazmaleme*, sa brojnim mikrovilima, okrenut prema sinusoidima i koji je u kontaktu sa plazmom iz sinusoida; *bilijarni (kanalikularni) odeljak plazmaleme*, koji čine naspramno postavljena udubljena plazmaleme susednih hepatocita formirajući kanalić (2 μ m) u koje se sekretuje žuč. Ovi kanali zovu se *žučni kapilari (canaliculi biliferi)* i predstavljaju početne puteve bilijarnog sistema (Slika 3, Slika 4).

Oko kapilara, membrane dva susedna hepatocita su čvrsto povezane okludentnim i adherentnim ćelijskim vezama, koje sprečavaju isticanje žuči iz žučnih kapilara. Kanalikularni domen plazmaleme takođe obrazuje mikrovile koji prominiraju u žučne kapilare radi povećanja površine sa koje se sekretuje žuč. Citoplazma hepatocita u kontaktu sa plazmalemom koja učestvuje u formiranju žučnih kapilara, sadrži veliku količinu aktinskih i intermedijernih filamenata, čijom kontrakcijom se žuč potiskuje ka periferiji lobulusa (1,2).



Slika 4. Žučni putevi lobulusa jetre (3).

Pojedini autori pored termina kanalikularni i bilijarni odeljak (domen) plazmaleme, koriste i termin *apikalni pol hepatocita* (4) ili lateralni odeljak (2). Polarizacija hepatocita i plazmaleme, omogućena je: 1) okludentnim vezama koje zatvaraju žučni kapilar; 2) specifičnom distribucijom elemenata citoskeleta hepatocita; 3) različitom distribucijom

transportnih proteina u tom odeljku membrane i 4) različitom distribucijom raznih molekula i vezikula (4).

U nivou granične ploče žučni kapilari se ulivaju u žučne kanaliće (*ductuli biliferi*) poznate pod nazivom Heringovi kanali, koji su ujedno prvi bilijarni putevi koji imaju sopstveni zid, obložen kubičnim epitelom. Heringovi kanali spajaju žučne kapilare sa žučnim putem portnog prostora, interlobularnim žučnim kanalom (*ductus biliferus*) (1) (Slika 4).

1.2. Žučne kiseline

Žučne kiseline (ŽK) su strukturno raznoliki molekuli sintetisani u jetri. Pored uloge u digestivnom sistemu koju ostvaruju putem žuči, postalo je jasno da imaju i druga dejstva koja ostvaruju kao signalni molekuli, pre svega putem receptora ŽK. Nakon sinteze u hepatocitima, žučne kiseline (ŽK) se ekskretuju kao konjugati glicina i taurina, što ih čini rastvorljivijim u crevnom lumenu. Na fiziološkom pH žuči i krvi, ovi konjugati su prisutni u formi anjonskih soli, i nazivaju se žučnim solima (ŽS) (5).

1.2.1. Sinteza i metabolizam žučnih kiselina

Hepatociti su mesto sinteze ŽK, a holesterol predstavlja polazno jedinjenje. Nizom hemijskih reakcija nastaju polarna jedinjenja, tj osnovne žučne kiseline, holna i henodeoksiholna koje se potom sekretuju u žuč (6, 7). Mehanizam transformacije holesterola u primarne ŽK, klasičnim putem, odvija se u više etapa. Prva u nizu reakcija je reakcija hidroksilacije na C7 u α položaju koju katalizuje enzim holesterol-7- α -hidroksilaza (CYP7A1). Ovaj enzim inicira prvi i ograničavajući (*rate-limiting*) proces u sintezi ŽK klasičnim putem, čiji je krajnji proizvod primarna ŽK, holna kiselina (7,8, 9).

Značajna je i reakcija hidroksilacije na C12 α položaju (regulisana enzimom CYP8B1) koja kontroliše odnos sinteze holne i henodeoksiholne kiseline (7,8,9) Alternativni put sinteze inicira sterol 27-hidroksilaza (CYP27A1), i vodi produkciji henodeoksiholne kiseline (10).

Druga faza u metabolizmu ŽK je konjugacija karboksilne grupe aminokiselinama glicinom i taurinom pre sekrecije u žučne kanaliće, što znatno povećava polaritet i rastvorljivost ŽK u vodi (7, 9).

Sledeća etapa metabolizma ŽK odvija se tokom prolaska kroz tanko crevo i kolon, gde se ŽK menjaju (dekonjugacija i 7 α -dehidroksilacija) pod dejstvom enzima koje proizvodi stalna

bakterijska flora, i pri čemu prelaze u sekundarne ŽK – deoksiholnu i litholnu. Mešavina primarnih i sekundarnih ŽK se apsorbuje u ileumu.

U krvi, ŽK se prenose do hepatocita u vidu kompleksa sa albuminima (9), pri transportu u hepatocit oslobađaju se albumina, da bi u hepatocitima ponovo došlo do konjugacije ŽK i njihove re-ekskrecije u žučnu kesu (6, 7). Ovaj kontinuirani proces ekskrecije ŽK u žuč, njihova cirkulacija i transformacija u tankom crevu i povratak u jetru u vidu mešavine žučnih soli i kiselina, naziva se enterohepatična cirkulacija (EHC) (6, 9).

1.2.2. Membranski sistemi transporta žučnih kiselina i žučnih soli u hepatocitima

U jetri se ŽK preuzimaju na sinusoidnom odeljku membrane hepatocita, a potom opet izlučuju iz hepatocita na kanalikularnom odeljku membrane, što se označava nazivom transhepatični fluks ŽK (*trans-hepatic bile acid flux*) (11,12). Promet tj. sekrecija i apsorpcija ŽK i ŽS kroz ćelijske membrane omogućena je postojanjem transportera, specijalizovanih proteina ćelijske membrane (Slika 5).

1.2.2.1. Membranski sistemi transporta na kanalikularnom odeljku membrane hepatocita

Na kanalikularnom odeljku membrane hepatocita se izlučuju komponente žuči kao što su ŽK i ŽS, fosfolipidi i holesterol.

Pumpa za ekskreciju žučnih soli (*bile salt export pump* - BSEP) je glavni ekskretorni transporter prisutan isključivo na kanalikularnoj membrani hepatocita. BSEP primarno transportuje konjugovane ŽK (osim holne) na ATP-zavistan način (5,13). BSEP je takodje uključen u transport farmaceutika (13, 14). Njegova ekspresija je pod kontrolom nuklearnih receptora, a ekspresija može biti smanjena u prisustvu inflamatornih medijatora i estrogena (12).

Kanalikularna membrana hepatocita poseduje i druge transportne sisteme kao što su:

- MDR (*multidrug resistance protein*) transporteri za ekskreciju fosfolipida žuči (MDR1 transporter je uključen u ekskreciju lipofilnih katjona u koje spadaju brojni lekovi i karcinogene supstance),
- ABCG5/8 za transport holesterola,
- MRP (*multi resistance protein*) transporteri su specifičniji za ekskreciju konjugovanog bilirubina, nekih oblika ŽK i drugih organskih anjona (hemoterapeutika, antibiotika,

leukotriena, glutationa, toksina i teških metala), čime utiču na farmakokinetiku lekova. Poznato je da je u holestatskoj bolesti jetre, smanjena ekspresija jednog člana ove grupe transportera (MRP2) (5).

- BCRP (*breast cancer resistance protein*) olakšava prenos potencijalno toksičnih ksenobiotika i karcinogena iz ishrane,

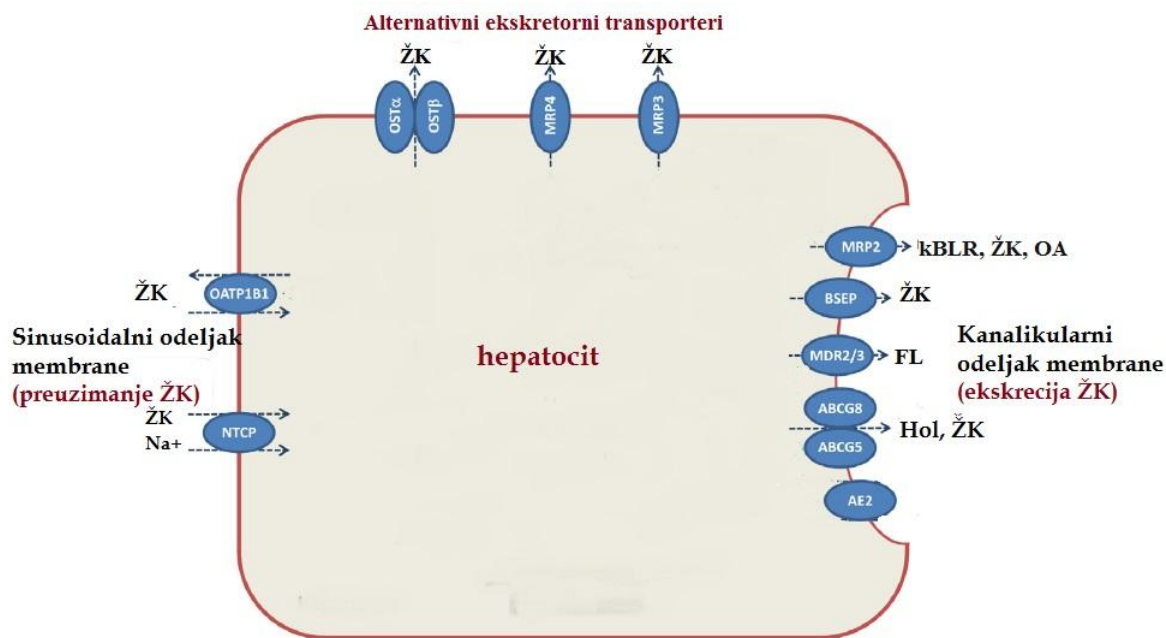
- MATE (*multidrug and toxin extrusion transporters*) i

- ABC transportera (*adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporter*) (5, 12).

1.2.2.2. Membranski sistemi transporta na sinusoidnom odeljku membrane hepatocita

Na sinusoidnom odeljku membrane hepatocita vrši se apsorpcija ŽK koje su putem portnog krvotoka stigle u Diseove prostore. U Diseovom prostoru ŽK su vezane za nosače (albumin i lipoproteine poput HDL), od kojih se odvajaju nakon kontakta sa sinusoidalnom membranom. Više od 80% konjugovanih ŽS se reapsorbuje u jetru tokom prvog prolaza, dominantno putem natrijum-zavisnog transportnog sistema (Na^+ -*taurocholate cotransporting polypeptide* -NTCP) ali i natrijum-nezavisnog transporta (5, 12, 15, 16). Najveći deo ekstrakcije iz krvi obavlja se NTCP transporterima na sinusoidalnom odeljku membrane hepatocita zone I. Hepatociti zone III (oko centralne vene) u nešto većoj meri uključeni su tek u momentima preopterećenja sa ŽK, kao npr uolestazi. NTCP genska ekspresija je suprimirana visokim koncentracijama ŽK u samim hepatocitima, što doprinosi smanjenom preuzimanju ŽK iz krvi, a samim tim smanjenjem koncentracije ŽK u hepatocitima i hepatotoksičnosti. ŽK svoj uticaj na transkripciju NTCP sprovode putem nuklearnih receptora i njihovih sistema. Osim ŽK, na ekspresiju i funkciju NTCP utiču i hormoni (estrogen, prolaktin) i proinflamatorni citokini. Ekspresija NTCP je smanjena u holestatskim bolestima ljudi i animalnim modelimaolestaze, kada smanjena ekspresija NTCP smanjuje preuzimanje ŽK iz krvi i deluje hepatoprotektivno (5,12, 13, 17, 18,19). Pored natrijum-zavisnog transporta NTCP, natrijum-nezavisno hepatično preuzimanje vrši se multispecifičnim transporterima organskih anjona (*organic anion transporting polypeptides*

(*Oatps/OATPs*) (5, 13). Osim transportera uključenih u preuzimanje ŽK i ŽS iz krvi, na sinusoidnoj membrani hepatocita postoje i alternativni ekskretorni transporteri.



Slika 5. Glavni transportni proteini na sinusoidnom i kanalikularnom odeljku membrane hepatocita (12).

Ovi alternativni ekskretorni transporteri se aktiviraju u uslovima preopterećenosti hepatocita sa ŽK. ŽK se tako izlučuju u krv i putem sinusoidalne krvi stižu do bubrega i izlučuju urinom iz organizma. Ovi alternativni efluksni transporteri obuhvataju MRP3, MRP4 i OSTα/OSTβ (*organic solute transporters*) (12).

1.2.3. Poremećaji metabolizma ŽK

Poremećaji metabolizma ŽK mogu se javiti kao posledica a) urođenih ili stečenih poremećaja sinteze, b) poremećaja u transportu do žučne kese, c) poremećaja enterohepatične cirkulacije i d) holestaze.

1.2.3.1. Holestaza

Termin holestaza, etimološki označava zastoj žuči, i najkraće se može definisati kao poremećaj izlučivanja žuči iz jetre. U funkcionalnom smislu, holestaza podrazumeva insuficijenciju bilijarne sekrecije hepatocita sa sledstvenim nakupljanjem u krvi i tkivu jetre onih materija koje se normalno izlučuju putem žuči (20, 21).

U kliničkom i biohemijskom aspektu, holestaza se odnosi na grupu simptoma i znakova u koje spadaju žutica, pruritus, povišene vrednosti konjugovanog bilirubina u krvi kao i alkalne fosfataze, žučnih kiselina i dr. Holestaza može biti akutna ili hronična, a prema primarnoj lokalizaciji uzroka holestaze (a i iz praktičnih razloga), holestaza se deli na intrahepatičnu i ekstrahepatičnu (22,23).

Uzroci intrahepatične holestaze su brojni, te je u upotrebi podela na

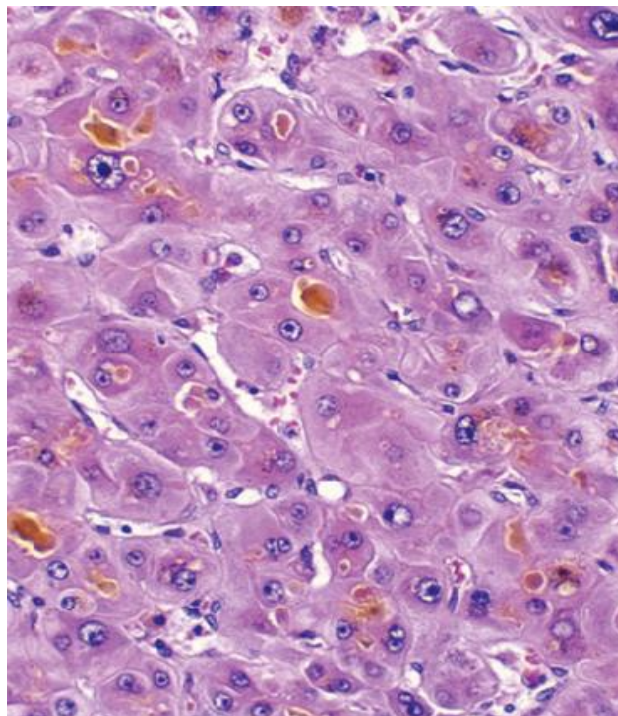
a) intralobularnu intrahepatičnu holestazu (kongenitalni uzroci, oštećenje hepatocita hepatotoksičnim virusima i supstancama, sepsa, paraneoplastični sindromi, oštećenje bilijarnog domena membrane, holestazni sindromi i drugo), i

b) ekstralobularnu intrahepatičnu holestazu (uzroci na nivou intrahepatičnih bilijarnih vodova: primarna bilijarna ciroza, primarni sklerozirajući holangitis, mukoviscidoza, parazitoze, Carolieva bolest i drugo) (20,22,23).

Sa morfološkog stanovišta, definicija holestaze zavisi od pristupa: makroskopski, označava zelenu ili mestimičnu zeleno-smeđu prebojenost jetre; svetlosnomikroskopski posmatrano, označava prisustvo žučnog pigmenta u tkivu jetre; na elektronskom mikroskopu uočljive su promene na sekretornom aparatu hepatocita. Često klinički jasna holestaza nije evidentna na histološkom materijalu, pošto može doći do ispiranja pigmenta tokom tehničke obrade materijala ili pak, da je holestaza u ranom stadijumu i da nije došlo do formiranja svetlosnomikroskopski uočljivih elemenata holestaze (20,22).

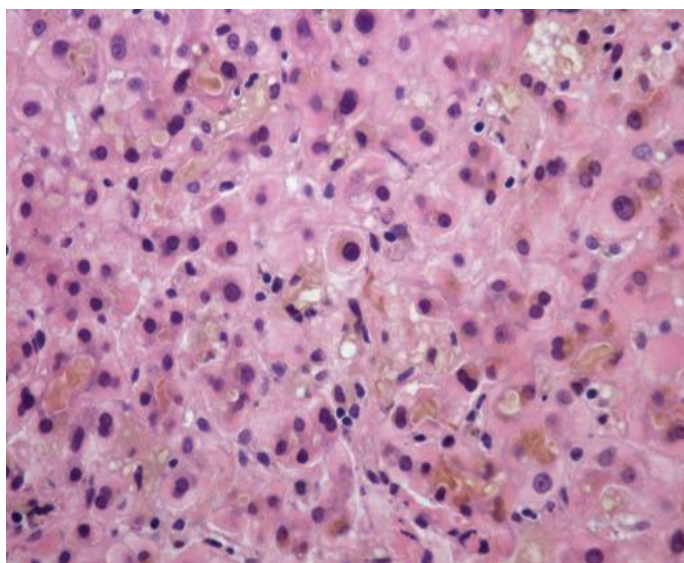
Svetlosnomikroskopski intra- i ekstrahepatična holestaza imaju više zajedničkih odlika kao što su: prisustvo žučnog pigmenta u ćelijama i izvan ćelija (bilirubinostaza), oštećenje hepatocita, proliferacija žučnih duktusa i zapaljenje. Žučni pigment je stalno obeležje holestaze, i može se videti u hepatocitima i Kupferovim ćelijama (20). U ekstra- i intrahepatičnoj holestazi, u početku je prisutna predominantno centrolobularna lokalizacija pigmenta. Periportalni hepatociti sekretuju najveći deo ŽK, sa sobom povlače vodu, tako da je sadržaj tečnosti koji se sekretuje u periportalnoj zoni veći nego centrilobularno. Ova činjenica i deterdžentsko dejstvo ŽK u periportalnoj zoni, rastvaraju agregate bilirubina u ovoj zoni. Nasuprot tome, u centrolobularnoj zoni hepatociti imaju izraženiju mikrozomalnu aktivnost, što ih čini podložnijim oštećenju toksičnim supstancama, i favorizuje deponovanje pigmenta u holestatskom oštećenju jetre (21,22).

Oštećenje hepatocita dešava se relativno rano u holestazi, i može biti uzrokovano zadržavanjem ŽK ili usled pritiska proširenih žučnih kanalića na okolne hepatocite.

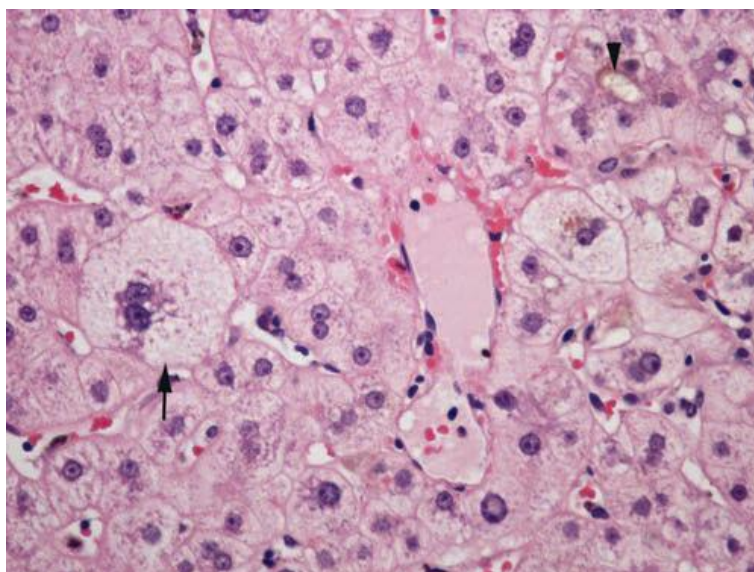


Slika 6. Prisustvo pigmenta u žučnim kapilarima (tzv. kanalikularna holestaza) pri holestatskom oštećenju jetre usled dugotrajne primene oralnih kontraceptiva (HE, x200) (24).

Hepatociti najpre u centralnoj zoni, pokazuju karakterističnu promenu koja se ogleda u pojavi „paperjaste“ (*feathery*), tj retikularne degeneracije i kasnije smrti hepatocita. Retikularno degenerisani hepatocit je hidropsno promenjene citoplazme („otečene“), sa pretežno perinukleusnim retikularnim ili granularnim ostacima citoplazme koji mogu biti zelenkasto ili žućkastrobraonkasto prebojeni (20,21,22). Sa trajanjem holestaze, ove promene se javljaju i u srednjoj i periportnoj zoni lobulusa. Istovremeno sa nakupljanjem žučnog pigmenta u hepatocitima, žuč se akumulira i u žučnim kanalićima koji se dilatiraju, te dolazi do formiranja bilijarnih „tromba“. U žučnim duktusima mogu da se vide veće strukture poznate kao žučni „cilindri“, koji u slučaju prskanja formiraju žučna „jezerca“ i žučne „infarkte“ (20,21,22).



Slika 7. Prisustvo pigmenta u hepatocitima (tzv. hepatocelularna holestaza) kod holestatskog oštećenja jetre usled primene lekova (HE, x400) (24).



Slika 8. Paperjasta degeneracija hepatocita (strelica) i kanalikularna holestaza (trougao) kod oštećenja jetre lekovima (HE, x400) (24).

Elektromikroskopska obeležja holestaze su 1) promene na bazolateralnoj membrani hepatocita u vidu proširenosti intercelularnog prostora sa razvojem mikroresica na lateralnoj membrani; 2) izduženost i iskrivljenost kristi mitohondrija; 3) povećan broj peroksizoma; 4) dilatacija i hipertrofija glatkog (agranulisanog) endoplazmatskog retikuluma, i smanjenje i degranulacija granulisanog endoplazmatskog retikuluma; 5) povećan broj vezikula i vakuola

u citoplazmi, kao znako poremećenog vezikularnog transporta; 6) uvećanje broja i volumana sekundarnih lizozoma i autofagnih vakuola, koji sadrže inkluzije bilijarnog pigmenta (konjugovani bilirubin); 7) pseudobilijarne inkluzije (vakuole okružene membranom koje sadrže osmifilnu, lamelarnu do spiralnu materiju) koje daju izgled koji se prepoznaje kao paperjasta degeneracija; 8) promene citoskeleta, u vidu hipertrofije mikrofilamenata, stvarnje Mallory hijalina od intermedijernih filamenata, poremećaja mikrotubula, što ujedno vodi poemećaju funkcije međjućelijskih veza i povećanoj proprustljivosti membrane hepatocita (22,25).

1.2.3.1.1. Oštećenje jetre i holestaza izazvana lekovima i toksinima

Jetra je centralni organ u procesima selektivnog preuzimanja, metabolizma i ekskrecije lekova, ksenobiotika i toksina iz spoljašnje sredine (26).

Mnogi hemijski agensi mogu da oštete tkivo jetre. Prema načinu na koji to postižu, delimo ih na a) prave, suštinske hepatotoksine (*intrinsic*) koji izazivaju dozno zavisno oštećenje kod svih izloženih osoba ili eksperimentalnih životinja, i b) idiosinkrazijske, čije dejstvo je nepredvidivo i deluju na ograničen broj ljudi, često u maloj dozi, i predstavlja urođenu povećanu osetljivost na određene materije (20). Pravi hepatotoksini se dele na dve grupe: direktne i indirektne prave hepatotoksine.

Direktni (*metabolic category*) deluju tako što oni sami ili produkti njihovog metabolizma direktno oštećuju hepatocite i njihove organele (npr. peroksidacijom membranskog sistema ćelije) uzrokujući promene ili destrukciju membrane kako hepatocita tako i drugih ćelija tkiva jetre. Efekti su dozno zavisni, a mehanizam oštećenja jednak kod svih vrsta. Oštećenje je zonalno, najčešće ali ne isključivo centrilobularno. Poznati direktni pravi hepatotoksini su ugljen-tetrahlorid, hloroform, fosfor, acetaminofen, toksini gljiva (21, 27).

Indirektni pravi hepatotoksini prvo dovode do promene nekih funkcija ili selektivnih struktura hepatocita, a potom nastaje oštećenje i smrt ćelije. Prema mehanizmu dele se na:

- Citotoksične indirektne prave hepatotoksine i
- Holestazne indirektne prave hepatotoksine.

Holestazni indirektni toksini deluju selektivno na mehanizme sinteze i sekrecije elemenata žuči ili na mehanizme njihovog preuzimanja iz krvi. Primeri holestaznih indirektnih hepatotoksina su anabolni i kontraceptivni steroidi (20,22).

Prema konsenzusu Veća za Internacionalne Organizacije medicinskih Nauka (Council of International Organizations of Medical Sciences - CIOMS), hepatotoksičnost izazvana lekovima može se podeliti na holestatsku, hepatocelularnu i mešovitog tipa (27, 28).

Oštećenja mogu biti akutna i hronična, a akutna toksična oštećenja jetre holestaznog tipa mogu se grupisati u dve kategorije: 1) akutno holestatsko oštećenje sa hepatitisom (holestatski hepatitis), 2) akutno holestatsko oštećenje bez hepatitisa (*pure, bland cholestasis*) (27) dok po nekima postoji i treća kategorija: holestaza sa duktopenijom/ povredom žučnih kanala (*cholangiodestructive cholestasis*) (26, 28).

Holestaza bez hepatitisa ili „čista“ holestaza (u daljem tekstu za ovaj entitet će se koristiti termin holestaza) je najčešće posledica estrogena, oralnih kontraceptivnih steroida i 17 α -alkiliranih androgenih steroida, a ređe kod upotrebe ciklosporina A, tamoksifena, griseofulvina, glibenklamida i dr. (17)(28). Histološki, žučni pigment se vidi u hepatocitima i/ili kanalikulima i najizraženiji su u zoni III acinusa. Inflamacija i hepatocelularno oštećenje se retko viđaju ili su odsutni (27).

Osim formiranja toksičnih metabolita i direktnog oštećenje hepatocita i žučnih puteva, veliki značaj u potencijalnom mehanizmu nastanka holestaze daje se poremećajima ekskrecije komponenti žuči. Poslednji pomenuti mehanizam je možda i najznačajniji pošto veliki broj lekova i toksina predstavlja supstrat za transportne proteine lokalizovane na bazolateralnom i kanalikularnom odeljku membrane hepatocita. Ovaj mehanizam nastanka holestaze, naziva se ponekad i „steroidna žutica“, obzirom da su najčešći kauzalni agensi C17-alkilirani i kontraceptivni steroidi (28).

1.2.3.1.2. Holestaza izazvana primenom etinilestradiola

Ustanovljeno je nekoliko modela izazivanja intrahepatične holestaze koja odgovara promenama kod holestaze kod ljudi (endotoksini, primena lekova, primena toksina biljaka i gljiva i dr) ali ipak jedan od najčešće primenjivanih modela je holestaza izazvana primenom etinilestradiola (EE) i njegovih metabolita (18)(29). Poznato je da estrogeni uzrokuju reverzibilnu intrahepatičnu holestazu kako kod ljudi, tako i kod glodara(19). Kod pacova, aplikacija sintetskog estrogena, uzrokuje smanjen protok žuči i narušava nekoliko transportnih mehanizama kako na bazolateralnoj tako i na kanalikularnoj membrani hepatocita (30). Šta više, pokazalo se da EE dovodi do blagog porasta ŽK u serumu, ali ne i

unutar hepatocita i dovodi do manjih morfoloških promena hepatocita (31,32,33). Po istraživanju El-Sisi i saradnika, oštećenju hepatocita i njihove funkcije putem EE doprinosi i oksidativno oštećenje (34,35). EE smanjuje nivo antioksidanata (glutaciona) i ekskreciju bikarbonata (36,37,38). Osim toga, može doći do „curenja“ komponenti žuči, s obzirom da je još ranije ustanovljena povećana propustljivost međućelijskih tesnih veza indukovana farmakološkim dozama EE (39).

Dejstvo EE ostvaruje se i putem receptora estrogena tipa alfa ($ER\alpha$) za koje je dokazano da učestvuju u nastanku EE-indukovane holestaze (31,40). Henriquez-Hernandez LA i saradnici, pokazali su da je EE-indukovana holestaza udružena sa rapidnim promenama nekoliko bioloških puteva, uključujući transport ŽK, aktivaciju nuklearnih receptora ŽK i interakciju sa hormonima epifize (31). Oštećenje jetre pod uticajem EE odgovaraju oštećenjima po tipu intrahepatične holestaze bez hepatitisa (*bland*, tj “čiste” holestaze). U zoni III acinusa jetre prisutni su znaci nakupljanja pigmenta kako u hepatocitima tako i u žučnim kapilarima (41), a ustanovljeno je i da hepatociti pod uticajem EE pokazuju povećanu mitotsku aktivnost (31).

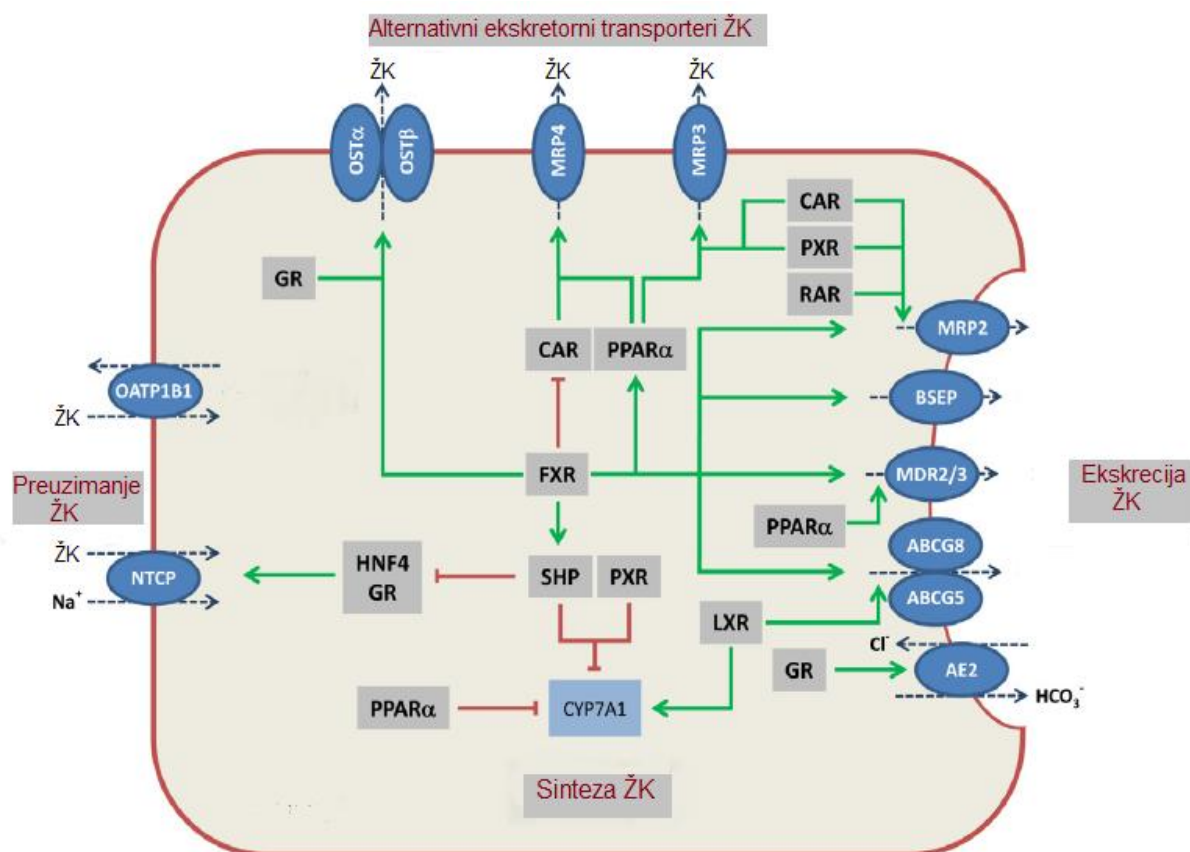
1.2.4. Funkcije žučnih kiselina i nuklearni receptori žučnih kiselina

1.2.4.1. Funkcije žučnih kiselina

Žučne kiseline su konačni produkt katabolizma holesterola u ljudskom organizmu. S obzirom da tkiva ne mogu razgraditi steroidno jezgro, te da je nerastvorljiv u vodi, holesterol ulazi u sastav agregata sa fosfolipidima i ŽK tj ŽS, što im daje ulogu jednog od glavnih načina eliminacije holesterola (7). Poznato je da je intenzitet sekrecije ŽK determinišući faktor za sekreciju drugih sastojaka žuči (9).

Druga važna uloga ŽK je proces emulgovanja lipida i liposolubilnih vitamina (A, D E i K), kako bi se omogućio njihov transport, i/ili priprema za razgradnju od strane pankreasnih enzima (8). Odnos hidrofobnih i hidrofilnih svojstava svake pojedinačne ŽK utiče na njena fizičko-hemijska svojstva i fiziološku ulogu (7)(4). *In vivo* studijama, prema opadajućem stepenu hidrofilnosti ŽK i njihovih konjugata, dobijen je sledeći poredak: ursodeoksiholna (UDK) > holna > henodeoksiholna > deoksiholna > litholna > konjugati taurina > konjugati glicina > slobodne kiseline (6). Od same ukupne koncentracije ŽK u žuči, moguće je da

sastav ŽK još u većoj meri determiniše ekskreciju holesterola i drugih lipidnih materija putem žuči (9)(21).



Slika 9. Uticaj nuklearnih receptora ŽK na transportere na sinusoidnom i kanalikularnom odeljku membrane hepatocita (12).

Danas je poznato da ŽK deluju i kao signalni molekuli i ostvaruju kako endokrina tako i parakrina dejstva, vezano za sintezu i homeostazu ŽK, metabolizam lipida i glukoze, energetski metabolizam ćelije, modulaciju imunog sistema i odgovora, aktivaciju apoptoze, antibakterijski efekat, mikrocirkulaciju i regeneraciju jetre i drugo (42,43). Tri, a po nekima četiri signalna mehanizma su odgovorna za navedene uloge ŽK, a to su: aktivacija puta MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), vezivanje za membranske receptore ŽK, aktivacija nuklearnih receptora i modulacija jonskog protoka (flux) što dovodi do aktivacije NADPH oksidaze, smanjenja volumena ćelije i apoptoze (11, 42, 44).

1.2.4.2. Nuklearni receptori ŽK

1.2.4.2.1. Farnesoid X receptor

Porast koncentracije ŽK može voditi teškim oštećenjima jetre pa i razvoju tumora, te je neophodno da koncentracija ŽK (bile acid pool size?) bude dobro regulisana. Poznato je da ŽK regulišu sopstvenu biosintezu, detoksikaciju i transport u jetri i crevima, a FXR ima esencijalnu ulogu u održavanju homeostaze ŽK i zaštiti od akumulacije potencijalno toksičnih ŽK. FXR je jedan od receptora ŽK aktiviranih ligandom koji svoje efekte ostvaruje modulacijom ekspresije ciljanih gena. FXR je klasifikovan kao nuklearni receptor ŽK obzirom da su u fiziološkim koncentracijama, one najpotentniji endogeni ligandi. FXR je u najvećoj meri prisutan u tkivu jetre, bilijarnog epitela, enterocita tankog creva, epitelu bubrežnih tubula i nadbubrežnih žlezdi (42, 44). Vezivanje liganda dovodi do konformacijskih promena FXR proteina, otpuštanja ko-represornih proteina i mobilizacije ko-aktivirajućih proteina, što pospešuje remodelovanje hromatina i aktivaciju i transkripciju ciljanog gena (23)(45).

U jetri, ŽK putem FXR-zavisnih mehanizama suprimiraju transkripciju enzima CYP7A1 i CYP8B1, čime kontrolišu nivo sinteze ŽK i hidrofobnost ukupnog sadržaja ŽK (42,44). Od posebnog značaja je FXR α -posredovana indukcija ekspresije atipičnog nuklearnog hormonskog receptora (*short heterodimer partner* - SHP), koji interaguje sa više transkripcionih faktora (*hepatocyte nuclear factor 4 α* (HNF-4 α), *liver receptor homolog-1* (LHR-1)), koji se vezuju za promotorne regione gena enzima odgovornih za sintezu ŽK, inhibira njihovu transkripciju i omogućava negativnu povratnu spregu u kontroli biosinteze ŽK (11,42,44). ŽK regulišu i menjaju sekreciju žuči kako dugoročno, na transkripcionom nivou, tako i kratkoročno, na posttranskripcionom nivou, izmenom ekspresije transportnih proteina na membrani. Tako ŽK putem FXR (bez koaktivnosti SHP), indukuju transkripciju BSEP, MDR3 i MRP2 transportera, pospešujući sopstvenu ekskreciju i sprečavanje akumulacije toksičnih ŽK (42). Kratkoročna regulacija kanalikularne sekrecije žuči odigrava se putem internalizacije i endocitoznog vraćanja transportnih proteina iz i u ćelijsku membranu i različito je regulisana hidrofiličnim i hidrofobnim ŽK (46,47).

Preuzimanje ŽK iz portnog krvotoka odigrava se preko sinusoidalne membrane, najvećim delom (oko 80%) putem NTCP. ŽK putem FXR-SHP zavisnih mehanizama mogu da

suprimiraju aktivnost i ekspresiju NTCP i drugih transportera zaduženih za preuzimanje ŽK (na primer OATPs), čime štite hepatocite od akumulacije toksičnih ŽK (42).

Povezanost ŽK i regulacije glikemije uočena je kada je kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2, radi regulisanja dislipidemije primenjen holestiramin, derivat ŽK, koji je osim snižavanja vrednosti ukupnog i LDL- holesterola, snizio glikemiju za 13%. Uticaj FXR na metabolizam glukoze i dalje je predmet diskusije (11,48,49). Po istraživanju Duran-Sandoval i saradnika, ekspresija FXR je bila snižena kod pacova sa streptazocin-indukovanim dijabetesom i hiperglikemijom, i normalizovala se nakon primene insulina (50). Prema Zhang i saradnicima, u gladovanju je povećana ekspresija FXR (51). Aktivacija FXR ligandima ili povećana ekspresija konstitutivnih FXR, snižava nivo glukoze kod životinjskih modela gojaznosti i dijabetesa (52,53), a FXR-deficijentni miševi pokazivali su hiperglikemiju. Navedena istraživanja upućuje da su ŽK uključene u metabolizam glukoze preko FXR-zavisnog puta. Neki od drugih signalnih puteva kojim ŽK mogu uticati na metabolizam glukoze (nezavistan od FXR) uključuje membranski receptor ŽK, TGR5 i uticaj ŽK na hidratisanost ćelije (54,55).

S obzirom na amfifilnost molekula, ŽK imaju ulogu promotora transporta i stimulatora apsorpcije različitih terapijskih agenasa. ŽK povećavaju propustljivost membrane za molekule različite molekulske težine, uključujući i insulin, i potenciraju dejstvo hipoglikemijskih i hipolipemijskih lekova. Da se pretpostavi, da se efekat ŽK u homeostazi glukoze može postići hipoglikemijskim dejstvom (putem FXR-zavisnog i nezavisnog puta) i poboljšanjem apsorpcije lekova (56,57,58). Modifikacija količine ili sastava ŽK u žuči, manipulacija intestinalnom florom i manipulacija receptorima ŽK (FXR, TGR5) zanimljivi su i obećavajući putevi istraživanja u cilju razvoja novih anti-dijabetesnih lekova. Upotreba sekvestranata ŽK (holestiramin, holestipol, holesevelam) u hiper- i dislipidemijama je od ranije prihvaćena, a takođe snižavaju nivo glukoze kod pacijenata sa dijabetesom tip 2, najverovatnije putem FXR-zavisnih puteva. Na teritoriji Sjedinjenih Američkih Država, FDA (*Food and Drug Administration*) je 2009. dozvolila upotrebu leka pod generičkim nazivom *colesevelam*, za poboljšanje kontrole glikemije u dijabetesu tip 2, kao dodatak promenama životnih navika. I pored pozitivne regulacije koncentracije LDL i HDL holesterola, ovaj preparat je dovodio do porasta triglicerida za 11-22% (59).

1.2.4.2.2. Pregnan X receptor i Konstitutivni receptor androgena

Pregnan X receptor (*pregnane X receptor- PXR*) i konstitutivni receptor androgena (*constitutive androgen receptor- CAR*) su glavni regulatori procesa detoksifikacije, s obzirom da su promotori ekspresije neophodnih enzima za fazu I detoksifikacije u hepatocitima. ligandi koji ih aktiviraju su lekovi, lekovite supstance biljnog porekla, sastojci hrane i endogene supstance uključujući ŽK (60). Njihova funkcija i ciljani geni se većim delom podudaraju, a i ligandi su im uglavnom zajednički (61). Na fazu II detoksifikacije utiču i drugi receptori (FXR, vitamin D receptor), ali je uloga PXR i CAR kompletnija i kompleksnija, s obzirom da stimulišu bazolateralnu ekskreciju produkata detoksifikacije (MRP3 i MRP4) i kanalikularnu ekskreciju (MRP2) (10). Primena sintetskih liganada PXR i CAR počela je dok još njihova uloga u holestazi nije bila razjašnjena. Naime, rifampicin (ligand PXR) i fenobarbital (ligand CAR) koristili su se za kupiranje pruritusa kod holestaze ali i poboljšanje biohemijskih pokazatelja jetrene funkcije. Ipak ovi lekovi imaju i ozbiljne neželjene efekte, te je poželjna sinteza efikasnijih farmakoloških liganada. Uloga PXR u supresiji sinteze ŽK je diskutabilna, s obzirom da je utvrđena u *in vitro* uslovima, ali u *in vivo* primeni nije dala očekivane rezultate (10).

1.2.4.2.3. Receptor vitamina D

Receptor vitamina D (*vitamin D receptor - VDR*) je slabo izražen u hepatocitima, a znatno više u enterocitima. Pokazuje efekte u regulaciji transporta ŽK u crevu, ali u i procesu detoksifikacije (10). Ligandi VDR, tj aktivacija VDR suprimiraju jetreni SHP, i time pospešuju aktivnost CYP7A1 u sintezi ŽK i snižavanju nivoa holesterola ali s obzirom na negativnu interakciju sa FXR, njihovi efekti su diskutabilni (62).

1.2.4.2.4. Receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma

Receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma (*Peroxisome proliferator-activated receptors- PPARs*) su familija receptora koja se aktivira vezivanjem liganda, koji u ovom slučaju mogu biti fiziološki prisutne masne kiseline i njihovi derivati, a njihova aktivacija dovodi do ekspresije gena uključenih u energetska homeostazu, metabolizam glukoze, lipida, ŽK, lekova. PPAR α je uključen u process supresije sinteze ŽK i detoksifikacije, gde postoji veza između FXR i PPAR α transkripcionih puteva. U uslovima opstruktivne holestaze,

PPAR α deluje protektivno povećanjem sekrecije fosfolipida u žučne puteve čime štiti bilijarni epitel od toksičnih ŽK, a pojačava resorpciju ŽK iz creva i žučnih puteva preko transportera za preuzimanje ŽK na enterocitima i hepatocitima (10,12,30). Primenom fenofibrata (prirodni ligandi) u animalnom modelu opstruktivne holestaze, redukuju se serumski markeri holestaze, a klinička ispitivanja primene fibrata u primarnoj bilijarnoj cirozi dovela su do umerenih poboljšanja biohemijskih parametara i delimično do poboljšanja patohistološkig nalaza (10). Uočeno je polno-različito delovanje PPAR α , tj aktivacija receptora je kod ženki miševa imala izraženo protektivno dejstvo u estrogen-indukovanoj intrahepatičnoj holestazi, što daje mogućnost za ispitivanje primene u holestazi tokom trudnoće (63).

PPAR γ je prisutan većinom u masnom tkivu i imunom sistemu, i njegova uloga je dominantna u diferencijaciji adipocita i deponovanju energije, dok još nije uočeno delovanje na regulaciju metabolizma ŽK. Ipak, u modelu inflamatorne holestaze izazvane lipopolisaharidima (LPS) primena glitazona (sintetički PPAR γ ligand i antidijabetesni lek), PPAR γ reguliše transportne proteine (NTCP, BSEP). U toku oštećenja jetre, stelatne ćelije se aktiviraju i počinju da sekretuju pro-fibrogene i pro-inflamatorne supstance, što je suprimirano koordinisanom i udruženom reakcijom većeg broja nukelarnih receptora uključujući i PPAR γ (12).

1.2.4.2.5. Jetrin X receptor

Jetrin X receptor (*liver X receptor*- LXR) subfamiliju čine LXR α i LXR β . LXR α reguliše nivo holesterola i homeostazu lipida, te u uslovim hiperholesterolemije kod glodara, aktivira CYP7A1 i sintezu ŽK, dok kod ljudi suprimira isti enzim (10). Uloga LXR α u odbrani od holestaze, otkrivena je skoro i pripisuje se aktiviranju mehanizama koji povećavaju urinarnu ekskreciju ŽK, gde donekle pokazuje polno-zavisno delovanje slično PPAR (10, 63).

1.2.4.2.6. Glukokortikoidni receptori

Glukokortikoidni receptori (*glucocorticoid receptors*- GR) su prisutni u mnogim tkivima i imaju višestruke funkcije. U metabolizmu ŽK utiču na ekspresiju transportnih proteina i modifikuju funkciju i aktivnost drugih nuklearnih receptora (CAR, PXR) (6)(12).

1.2.4.2.7. Homolog-1 jetrenog receptora

Homolog-1 jetrenog receptora (*liver receptor homolog-1*, LHR-1) priustan je u tkivima koja vode poreklo od endoderma, u kojima ima zapaženu ulogu u diferencijaciji, rastu, steroidogenezi, metabolizmu holesterola i ŽK. Iako su vezujuća mesta prisutna u promotroskim regionima enzima odgovornih za sintezu ŽK, LHR-1 se pripisuje i inhibicija sinteze putem FXR-SHP-zavisnih mehanizama. Selektivnim dejstvom na CYP8B1 utiče na sastav ŽK, a LHR-1 deficijentni miševi pokazuju dramatično smanjenu ekspresiju transportera (Ntcp, Bsep, Mrp3, Mrp2, Mdr2) (10).

1.2.5. Ursodeoksiholna i monoketoholna i kiselina

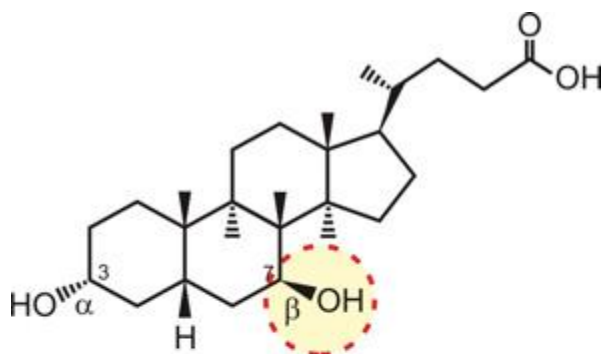
Početak primene ŽK u terapijske svrhe počeo je '70-ih godina dvadesetog veka, primenom henodeoksiholne kiseline (*chenodeoxycholic acid* – CDCA) za rastvaranje žučnih kamenaca (3)(6). Nakon uočenih hepatotoksičnih svojstava ove kiseline, primena je obustavljena ali je ubrzo usledila primena ursodeoksiholne kiseline koja je imala slične efekte, bez sporednih pojava (64).

1.2.5.1. Ursodeoksiholna kiselina (UDK)

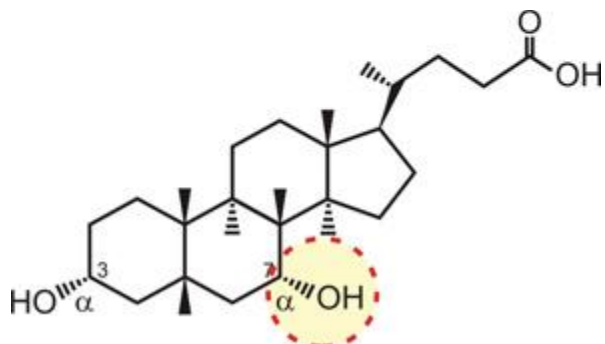
Ursodeoksiholna kiselina (*3 α ,7 β -dihidroksi-5 β -holna kiselina*) se formira u jetri i crevima, i čini oko 3-5% od svih ŽK u ljudskom organizmu. Interesantno je da je u većem procentu prisutna u žuči mrkih medveda koju su u tradicionalnoj medicini još od VII veka nove ere koristili za lečenje bolesti jetre, odakle i potiče naziv (lat. *Urso-* medved) (64, 65, 66).

Hemijski gledano, C-7 β -orijentacija hidroksi grupe povećava hidrofilnost UDK u poredjenju sa strukturnim analogom CDCA, gde je C-7 hidroksi grupa u α položaju (Slika 10). Na taj način kod UDK je smanjena toksičnost za ćelijsku membranu, a zadržava većinu povoljnih regulatornih svojstava endogenih ŽK, kao što su aktivacija signalnih puteva i adaptivnih mehanizama kod preopterećenosti žučnim kiselinama. Kod medikamentozne primene UDK njena koncentracija u žuči ide do 19% što govori u prilog zaštite holangiocita od toksičnih ŽK u holestazi (65). UDK se uspešno koristi u terapiji primarne bilijarne ciroze,

holestatskih oboljenja, holestazi tokom trudnoće, transplantacije jetre, ali i nekih oboljenja van hepatobilijarnog trakta (10,67).



UDCA (3 α ,7 β -dihidroksi-5 β -holna kiselina)



CDCA (3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -holna kiselina)

Slika 10. Hemijska struktura UDK i njenog strukturnog izomera CDCA, sa označenom različitom orijentacijom hidroksi grupa (-OH). (65)

Ipak, efikasnost UDK dovođena je u pitanje u nekoliko meta studija. UDK je kontraproduktivna u opstruktivnoj holestazi, jer dovodi do povećanja pritiska u bilijarnom stablu i rupturu holangiola. Takođe, UDK dovodi do usporavanja oboljenja samo ukoliko se sa primenom počne u ranim stadijumima, i iako primena poboljšava rezultate biohemijskih testova jetrene funkcije, efekat UDK na preživljavanje i dalje je upitan, što dovodi do zaključka da su neophodna dalja ispitivanja novih, potencijalno boljih terapeutika, sa akcentom na supstance koje aktiviraju nuklearne receptore (44, 64, 68). Postavlja se pitanje, koje mehanzme bi trebao da aktivira potencijalni novi terapeutik? Pre svega, smanjenje akumulacije toksičnih ŽK (smanjenjem preuzimanja kiselina, stimulacijom alternativnih mehanizama sekrecije hidrosolubilnih komponenti žuči, stimulacijom ekskrecije i represijom sinteze ŽK) (64).

Osim što UDK u holestazi stimuliše hepatocelularnu ekskreciju ŽK i inhibira apsorpciju endogenih ŽK u crevima, pokazuje i druga citoprotektivna svojstva (64,69). Citoprotekcija se zasniva na: stabilizaciji membrane hepatocita i ekspresiji sinusoidalnih i bazolateralnih transportera (Mrp3 i Mrp4); pojačanju antioksidativnih mehanizama i neutralizaciji kiseoničnih radikala; stabilizaciji i smanjenom formiranju kompleksa mitohondrijalnih prelaznih pora zbog kiseoničnih radikala; inhibiciji apoptoze (69, 70, 71). Oralna primena UDK u holestazi povećava ekspresiju BSEP na posttranskripcijskom nivou kod pacova i ljudi, kao i inserciju BSEP transportera na kanalikularnu membranu hepatocita MAPK-zavisnim putem (30)(71).

Hepatoprotektivno dejstvo aktivacije FXR u uslovima intrahepatične holestaze je već izloženo. Dok su toksične ŽK potentni ligandi FXR, UDK nije u stanju da aktivira FXR, ali se smatra da bi kombinacija novih netoksičnih FXR-agonista i UDK mogla biti efikasna u lečenju holestatskih ali i inflamatornih bilijarnih oboljenja (64,72,73). UDK interaguje sa drugim nuklearnim receptorima: aktivira glukokortikoidne receptore ali osim toga aktivira korepresorski gen za nuklearne receptore (*small heterodimer partnet interacting leucine zipper protein- SMILE*), čime između ostalog suprimira dejstvo LXR (74,75). U uslovima povećanog oksidativnog stresa usled primene doksorubicina, UDK je sniženjem oksidativnog stresa inhibirala ekspresiju MDR1 (76). U novije vreme ispituju se različiti preparati UDK koji bi poboljšali farmakološke i farmakokinetičke mogućnosti, od kojih su neki dali znatan doprinos u antiapoptotskom delovanju (77).

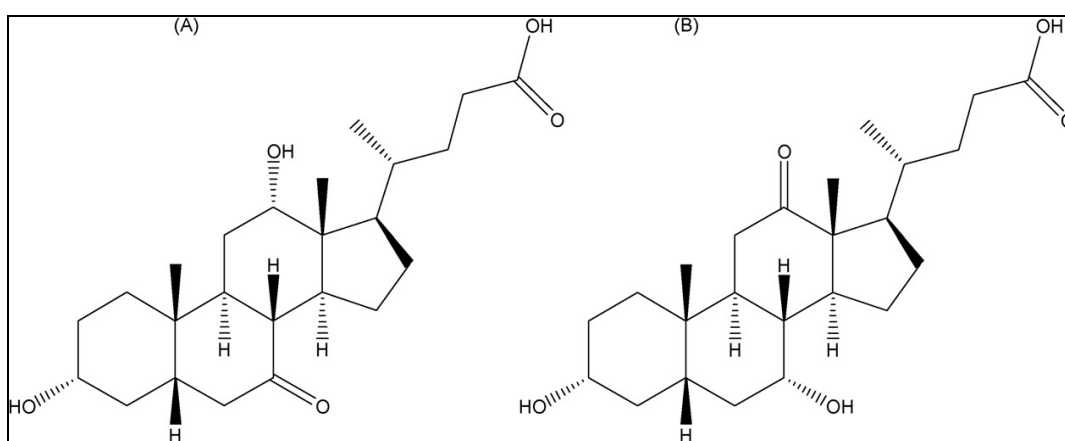
Ispitivanjima hepatotoksičnosti uslovljene glikohenodeoksiholnom kiselinom (GCDCA), prvi put je i potvrđeno da smrt hepatocita nastupa procesom apoptoze, na šta je upućivalo prisustvo karakterističnih znakova apoptoze (78). Toksičnost GCDCA i drugih ŽK koje doprinose stvaranju kiseoničnih radikala može se kupirati i primenom UDK, za koju je utvrđeno da sprečava formiranje prelaznih pora na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani Mth (79, 80). Uloga UDK u inhibiciji apoptoze, osim očuvanja integriteta i funkcije mitohondrija, uključuje i redukciju OS porekla endoplazmatskog retikuluma i interakciju sa signalnim putevima uključenim u regulaciju preživljavanja ćelije (cAMP, *nuclear factor kappa-B*, *mitogen activated protein kinases (MAPK)*, *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)*)(64). Znan je i uticaj UDK u sprečavanju apoptoze putem p53 proteina. Veruje se da UDK zadržava p53 u citoplazmi stvaranjem *p53/Mdm-2* kompleksa, i na taj način smanjuje

translokaciju p53 u jedro i transkripciju ciljanih gena, kao i ekspresiju i translokaciju Bax i drugih članova Bcl-2 familije u Mth, smanjujući apoptozu hepatocita (64, 81). Prema Amaral i saradnicima, inkubacija hepatocita sa UDK smanjuje transkripciju Bax proteina za približno 50%, i smanjuje nuklearnu lokalizaciju p53 (81). UDK sprečava apoptozu i zaštitom mitohondrija od formiranja pora usled ROS (65). Pacovi hranjeni hidrofobnim ŽK imaju povišen sadržaj Bcl-2 proapoptotskih proteina kao što je Bax, dok je primena UDK u stanju da inhibira taj efekat (82).

Osim uloge u hepatobilijarnom sistemu, uočena su i potencijalno neuroprotektivna svojstva UDK u Hantingtonovoj i Alchajmerovoj bolesti, mogućnost primene za lečenje metaboličkih poremećaja pa čak i u terapiji carcinoma (43).

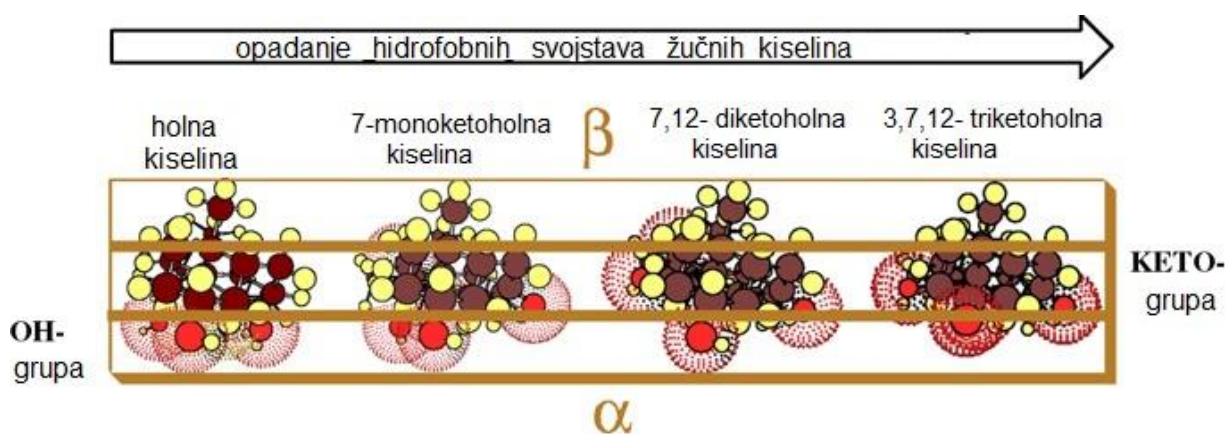
1.2.5.2. Monoketoholna kiselina (MK)

Monoketoholna kiselina ($3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanoat) je stabilna polusintetska ŽK niske toksičnosti. ŽK i ŽS poboljšavaju prolaznost bioloških membrana (gastrointestinalnog zida, bukalne i nazalne sluznice, rožnjače i krvno-moždane barijere) za molekule male molekulske mase ali i za veće molekule poput insulina. Svojstva koja im to omogućavaju (solubilnost, hidrofobnost, formiranje micela i dr) variraju u zavisnosti od građe i konfiguracije molekula.



Slika 11. Keto- derivati holne kiseline: (A) 7-MK ($3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-keto-5 β -holna kiselina); (B) 12-MK ($3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-keto-5 β -holna kiselina) (83).

Kao promoteri transporta ispitivani su brojni keto- derivati ŽK, a među njima se ističu keto derivati holne kiseline 7-MK i 12-MK, gde je na poziciji 7 tj 12, OH- grupa zamenjena keto-grupom što smanjuje hidrofobnost α strane molekula MK (Slika 12) (83, 84). Pri niskim (submicelarnim) koncentracijama, veruje se da molekuli ŽS zalaze između fosfolipidnih dvosloja u sklopu ćelijske membrane, menjajući im propustljivost. Pri višim koncentracijama stvaraju se mešovite micelle ŽS i komponenti ćelijske membrane što narušava integritet mebrane (86,87). MK, kao i ostale ŽK/ŽS olakšava prolaznost membrana. Pokazano je da primena same MK ima hipoglikemijsko dejstvo u dijabetesu tipa 1 (88), ali i da se postižu bolji efekti kada se istovremeno primenjuje sa hipoglikemikom gliklazidom ili preparatom steviozida, nego kada se bilo koja od ovih supstanci daje pojedinačno (89, 90).



Slika 12. Efekat keto grupe na smanjenje hidrofobnosti ŽK (85).

Najbolji efekti u regulaciji glikemije postignuti su kada su pacovi sa dijabetesom tipa 1 pretretirani probioticima, a potom istovremenom primenom MK i gliklazida (91). AL Salami i saradnici, utvrdili su da je funkcija transportera poremećena ili suprimirana u dijabetesu. Nasuprot rezultatima ovog *in vivo* istraživanja, u *in vitro* ispitivanjima dobijeni su protivrečni rezultati. Utvrđeno je da MK deluje kao inhibitor efluksnih transportera i prenosa supstanci u smeru od mukoze ka serozi posredstvom inhibicije Mpr3 transportera. Veruje se da je do ovog razmimoilaženja sa rezultatima *in vivo* studija, došlo usled *in vivo* biotransformacije (metaboličkih transformacija) MK u derivate koji *in vivo* pospešuju apsorpciju gliklazida u ileumu (92). U prilog tome govori podatak da pri intravenskoj primeni (ne zavisno od primene gliklazida ili probiotskog pretretmana) farmakokinetiska svojstva MK ostaju

nepromenjena, ali se znatno menjaju u slučaju oralne primene (93). Gliklazid nije jedina supstanca na čiji prolaz utiče MK; prolazak podamina 123 kroz krvno moždanu barijeru (povećanjem fluidnosti membrane i uticajem na transportere); apsorpciju metotreksata (efektom na BCRP, mrp2, Mrp3); nazalna apsorpcija insulina i drugo (94).

Prema Yang i saradnici, MK pokazuje drugačija fizičko-hemijska i biološka svojstva u odnosu na prirodne ŽK. Zamena hidroksi- sa keto-grupom, daje veću kritičnu micelarnu koncentraciju ŽK ali i manju citotoksičnost (84, 94). MK ne pokazuje izraženo deterđentsko dejstvo na ćelijske membrane, ali donekle menja mehanička svojstva fosfolipidnih slojeva, što bi moglo da pojača pasivnu difuziju i indirektno utiče na transportne mehanizme. Pokazala se kao manje toksična od drugih ŽK, ne dovodeći do razaranja ćelijskih membrana i narušavanja okludentnih ćelijskih veza (84).

Do sada nisu vršena ispitivanja MK u aktivaciji ili inhibiciji apoptoze i uticaj na ekspresiju gena bcl-2 familije, ali prema studiji Kuhajda i saradnici, etil-estri 12-MK pokazali su antiproliferativni efekat na kolonije tumorskih ćelija karcinoma dojke i grlića materice (95).

1.3. Oksidativni stres

Ćelije su aktivni učesnici zbivanja u svom okruženju i u stanju su da svoju građu i funkciju prilagođavaju promenljivim zahtevima okoline. Sve dok uticaji ne postanu prejak, ćelije održavaju stanje homeostaze, a sa intenziviranjem uticaja ili trajanjem, ćelije podležu procesu adaptacije, zatim reverzibilnog oštećenja, i na kraju ireverzibilnog oštećenja i smrti (96).

Saznanja o razlozima toksičnih efekata kiseonika, postojanju slobodnih radikala i postavljanje koncepta slobodnih radikala kao činilaca procesa koji narušavaju homeostazu ćelije datiraju iz '60. godina XX veka (97).

Slobodni radikal je bilo koja hemijska vrsta (molekul, atom, jon) koja može nezavisno da postoji, a sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Slobodni radikali se odlikuju velikom hemijskom reaktivnosti i niskom specifičnošću za reaktante (97). U biološkim sistemima nastaju spontano, a koncentracija im se drastično povećava usled neadekvatne antioksidantne zaštite. Po nastanku, dolazi do brze reakcije slobodnih radikala sa primarnim biomolekulima, kao što su proteini, nukleinske kiseline, lipidi i ugljeni hidrati, a efekti mogu biti povoljni ili nepovoljni po organizam (98). Oštećenje izazvano slobodnim radikalima, zavisno od intenziteta i obima, može voditi ka adaptaciji (indukcija antioksidativnih mehanizama odbrane) ili ozbiljnom remećenju metabolizma ćelije (prekid DNK lanca, povećanje intracelularnog slobodnog Ca^{2+} , oštećenja membranskih jonskih transportera i/ili drugih specifičnih proteina i lipidne peroksidacije) i sledstvene aktivacije signalnih puteva koji vode do ćelijske smrti, bilo mehanizmom apoptoze ili nekroze (99, 100). U ćeliji, reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS) se stvaraju nepotpunom redukcijom kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija i odbrambenim sistemima organizma domaćina, ali mitohondrije nisu jedini izvor ROS. Znatna uloga pripisuje se i endoplazmatskom retikulumu i peroksizomima, pogotovo u jetri (101).

Ako se stepen oštećenja poveća preko neke određene granice, da li zbog neadekvatne antioksidantne zaštite ili povećane produkcije slobodnih radikala dolazi do oksidativnog stresa (OS). Tokom OS povećano je prisustvo reaktivnih vrsta, pre svega ROS, i smanjen je nivo antioksidativnih mehanizama (102).

Uzroci OS mogu biti raznoliki, od genetskih poremećaja, endogenih supstanci do faktora spoljašnje sredine (97, 99). Jedan od uzroka oksidativnog stresa u hepatocitima je i holestaza. U eksperimentalne svrhe (na životinjskim modelima) za izazivanje OS često se koristi aloksan (102, 103). Aloksan indukuje produkciju ROS čime, između ostalog, dovodi i do propadanja β -ćelija pankreasa, te istovremeno predstavlja i model za istraživanje dijabetesa. Aloksan je toksični analog glukoze koji u β -ćelijama pankreasa podleže cikličnoj redoks reakciji čiji je krajnji produkt dialurična kiselina i ROS koji su naposljetku odgovorni za smrt β -ćelija. Stanje koje nastaje naziva se “aloksanski dijabetes”. Aloksanom indukovana hiperglikemija i OS, glavni su mehanizmi oštećenja jetre u dijabetesu (104, 105). Stvaranje ROS u hiperglikemijom-indukovanom OS (u aloksanskom modelu ili humanom dijabetesu) odigrava se u mitohondrijama i putem NAD(P)H oksidaze, ali i u ćelijama kojima nedostaju ovi mehanizmi (eritrociti), što sugerise i druge načine nastanka ROS (97). Hiperglikemija koja vodi generisanju ROS, takodje utiče i na opadanje antioksidativnih mehanizama (deplecija vit C, vit E) kao i formiranje MDA. Prema Osorio i saradnicima, dijabetes je indukovao ROS-indukovano oštećenje bubrega, a primena UDK smanjila je hiperglikemiju, ekspresiju transportera glukoze na membrani tubularnih ćelija bubrega, uz normalizaciju vrednosti katalaze i glutathion peroksidaze, u odnosu na ne tretiranu grupu (106). Takođe, u modelu aloksanskog dijabetesa, UDK je korigovala morfologiju endokrinog pankreasa, povećala nivo insulina, normalizovala vrednosti glikemije i sadržaj produkata lipidne peroksidacije i redukovala oštećenje mitohondrija u aloksanskom dijabetesu što sugerise snažno antioksidativno dejstvo (107, 108). Tauro-konjugat UDK (*Tauroursodexychoic acid*, *TUDCA*) je pokazao protektivno dejstvo i na bipolarne neurone retine izložene hiperglikemiji (109).

1.3.1. Odabrane vrste ROSa

❖ *Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$)* – nastaje najvećim delom u mitohondrijama, jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika. Smatra se da toksičnost kiseonika u velikoj meri potiče od ovog radikala i objašnjava se tkz. superoksid teorijom o toksičnosti kiseonika. Ova teorija ističe da izloženost kiseoniku dovodi do prekomerne produkcije $O_2^{\bullet-}$ koji dalje narušava biološki aktivne molekule. U ćelijama je vrlo toksičan za membranski sistem, jer oštećuju estarske veze između masnih kiselina i glicerola, vodeći oštećenju

fosfolipida membrane. Superoksid anjon radikal podleže reakciji dismutacije u kojoj se stvaraju kiseonik i vodonik peroksid, dok u reakciji sa vodonik peroksidom uz prisustvo gvožđa, indirektno produkuje hidroksi radikal (Fentonova reakcija). U *in vivo* sistemima se uglavnom uklanja enzimski pomoću enzima superoksid dizmutaze (SOD) (97, 98, 110).

❖ *Vodonik peroksid (H_2O_2)* - je najstabilniji, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Ima sposobnost da direktno oksidiše intraćelijske komponente, a ima i mogućnost interakcije sa superoksid anjon radikalom, uz stvaranje visoko reaktivnog hidroksi radikala. Inkubacija ćelija sa H_2O_2 izaziva oštećenje DNK, ćelijske membrane i mobilisanje kalcijuma, a predstavlja i glavni oksidans koji može da penetrira u jedro uzrokujući oštećenje DNK. Aktivnost vodonik peroksida se u peroksizomima i u citosolu neutrališe enzimskim antioksidativnim mehanizmima (katalaze, peroksidaze) (111).

❖ *Hidroksi radikal (HO^*)* – je najreaktivniji oblik ROS i u velikoj meri odgovoran za citotoksične efekte oksidativnog stresa. Vršeći oksidacijupolinezasićenih masnih kiselina u biološkim membranama, inicira lančani proces lipidne peroksidacije, koji dalje vodi nastanku velikog broja slobodnih radikala. Jedan hidroksi radikal može izazvati konverziju više stotina molekula masnih kiselina u lipidne hidroperoksidge, koji dalje vode ka nastankureaktivnijih produkata sa posledičnom destrukcijom bioloških membrana, membranskih proteina, receptora i enzima. Katalaza i helatori gvožđa inhibiraju produkciju hidroksi radikala, pa samim tim i oštećenje membrane (111, 112). Lipidna peroksidacija predstavlja završni stadijum oštećenja ćelijske membrane i dovodi do narušavanja strukture ćelije što može dovesti do ispuštanja ćelijskog sadržaja (113). Proces lipidne peroksidacije se odigrava u tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Jedan od pokazatelja lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA) koji je jedan od produkata peroksidacije lipida i njegova detekcija se veoma često koristi u eksperimentalne svrhe za određivanja nivoa lipidne peroksidacije. U fiziološkim uslovima interreaguje sa proteinima, interakcijom sa DNA dovodi do mutagenih oštećenja, a njegov metabolit malonatna kiselina je kompetitivni inhibitor mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze (113).

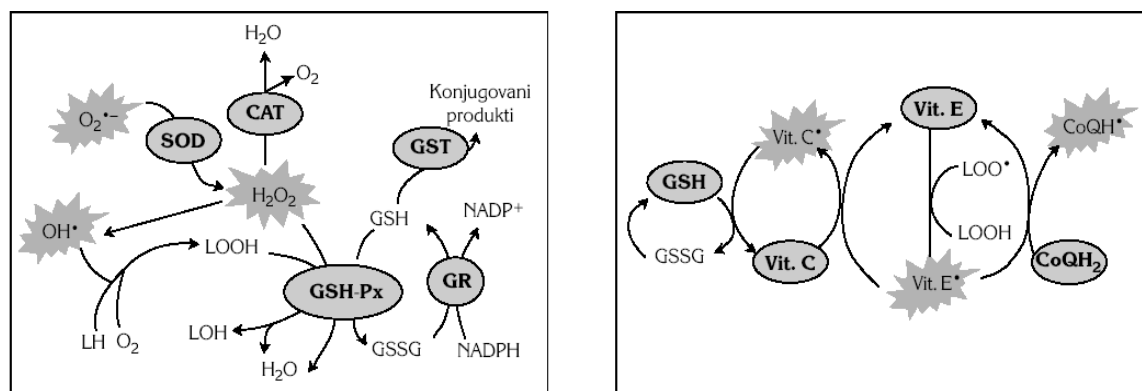
1.3.2. Antioksidativna zaštita

Da bi se sprečilo prekomerno stvaranje ROSa, priroda je uspostavila zaštitni sistem, gde skup svih antioksidanasa u organizmu čoveka čini antioksidativni sistem. Prema prirodi i načinu delovanja, antioksidansi se mogu podeliti na:

- *enzimske*, koji čine prvu liniju antioksidativne zaštite (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza, glutathion S-transferaza) i
 - *neenzimske*, koji predstavljaju sekundarnu liniju odbrane (glutathion (GSH), vitamini E i C, β -karoteni, polifenoli, tiolova jedinjenja, albumin, metalotionein, ubikvinon...)
- (Slika 13.) (101, 114).

1.3.2.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

- *Superoksid dismutaza (SOD)* - katalizuje uklanjanje superoksid anjon radikala, pri čemu nastaju vodonik peroksid i molekularni kiseonik. Dalje se vodonik peroksid pod dejstvom katalaze i glutathion peroksidaze razlaže do vode i molekularnog kiseonika. Ovim mehanizmima zaštite sprečavaju se oksidativna oštećenja ćelije (112). Kod sisara su najprisutnije dve izoenzimске forme superoksid dismutaze: 1) bakar/cink zavisna SOD (Zn/Cu SOD ili SOD1), najprisutnija u citosolu, 2) mangan zavisna SOD (Mn SOD ili SOD2), prisutna isključivo u mitohondrijama (99, 114).
- *Katalaza, (CAT)* - antioksidantna aktivnost katalaze zasnovana je na uklanjanju toksičnog vodonik peroksida. Katalaza je prisutna pretežno u peroksidomima i mitohondrijama, u svim tkivima sisara, pri čemu se visokom aktivnošću posebno ističu jetra i eritrociti. Katalaza razgrađuje vodonik peroksid do vode i molekularnog kiseonika (99).
- *Glutathion peroksidaza (GSH-Px)* - katalizuje reakciju redukcije vodonik peroksida ili organskih peroksida do molekula vode uz prisustvo redukovane glutathiona kao davaoca elektrona. Enzim redukuje i lipidne peroksidge. GSH-Px razlaže vodonik peroksid koji može u prisustvu metala da inicira proces lipidne peroksidacije, pa ima značajnu ulogu u inhibiciji inicijalnog stadijuma peroksidacije lipida ćelijskih membrana, pokrenutog difuzibilnim H_2O_2 (99).



Slika 13. Prikaz enzimskog antioksidativnog zaštitnog sistema organizma i najznačajniji neenzimski antioksidansi i njihova povezanost u ostvarivanju antioksidativne zaštite organizma (100).

➤ *Glutation reduktaza (GSH-R)* - katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovanog glutationa (GSH), održavajući adekvatnu koncentraciju redukovanog oblika glutationa u ćeliji. Visok odnos GSH/GSSG je esencijalan za zaštitu od oksidativnog stresa (100).

1.3.2.2. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Najznačajniji, neenzimski mehanizam antioksidativne zaštite je tripeptid glutation (GSH; γ -glutamyl-L-cysteinyl glycine). GSH je odlično redukciono sredstvo i samim tim štiti organizam od slobodnih radikala tako što ih neutrališe, odnosno redukuje.. Reakciju ponovne redukcije GSSG u GSH katalizuje enzim glutation reduktaza. *De novo* sinteza GSH najintenzivnija je u jetri, i koncentracije GSH su u jetri znatno više u poređenju sa drugim organima. Oko 20% GSH sintetisanog u jetri izlučuje se u žuč, dok su serumske vrednosti dosta niske (99).

1.3.3. OS i holestaza

Po istraživanju El-Sisi i saradnika. (2013), u holestazi izazvanoj primenom EE, osim drugih mehanizama, uključene su i komponente OS (30). Ovaj nalaz je u skladu sa drugim istraživanjima koja su ustanovila da oksidativni stres doprinosi oštećenju hepatocita kod primene EE stvaranjem ROS ili smanjenjem antioksidativnih mehanizama i rezervi hepatocita (SOD, glutation peroksidaze, glutation reduktaze) (34, 35). Retencija i akumulacija hidrofobnih ŽK i indukovani OS u hepatocitima, od ranije su prepoznati kao uzrok oštećenja

hepatocita rano u toku holestaze, što može voditi kasnijem ireverzibilnom oštećenju i smrti ćelija. Antherieu i saradnici su detektovali generisanje ROS već 15 minuta nakon izazivanja holestaze (115). Citotoksičnost ŽK u holestazi se objašnjava delom deterdžentskim dejstvom ŽK na membranu ćelija i organela, a delom indukcijom oksidativnog oštećenja (102). Nakupljanje hidrofobnih ŽK u holestazi bilo koje geneze, vodi nastanku OS u hepatocitima, za šta postoje različiti pretpostavljeni mehanizmi. Pre svega, dolazi do oštećenja respiratornog lanca u Mth, nakupljanja ROS (uglavnom superoksidnih anjona i peroksida), formiranja pora na mitohondrijalnoj membrani i oslobađanja citohroma c (65, 66). Nomoto i saradnici, ustanovili su da kod FXR-deficijentnih miševa dolazi do holestaze, spontanog generisanja ROS, nastanka OS i pojačane ekspresije gena povezanih sa OS (116). Ovaj podatak može voditi zaključku da bi stimulacija nuklearnih receptora u holestatskim oboljenjima popravljala oksidativni status, tj snižavala OS u hepatocitima. Sokolović *et al*, došli su do zaključka da podvezivanje žučnih vodova povećava OS u hepatocitima, a da se ti štetni efekti mogu kupirati primenom UDK, koja je poboljšala status antioksidativnih mehanizama hepatocita (70). UDK je takodje u stanju da poboljša antioksidativne mehanizme hepatocita, direktnim neutralisanjem ROS, i indukcijom ekspresije transkripcionih faktora koji regulišu nivoe antioksidativnih enzima: katalaze, peroksidaze i superoksid dismutase (SOD) i redukovano glutationa (GSH) (65, 66).

1.4. Ćelijska smrt

Ćelijska smrt se može klasifikovati na osnovu:

- morfologije (apoptoza, nekroza, autofagija, i smrt udružena sa mitozom),
- funkcionalnog aspekta (programirana ili nasumična, fiziološka ili patološka),
- enzimoloških kriterijuma ili
- imunoloških karakteristika (117).

S obzirom na sve veći broj istraživanja u ovoj oblasti, 2005. su prvi put date preporuke vezane za terminologiju u ovoj oblasti, od strane komiteta za nomenklaturu ćelijske smrti (*The Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD*). Iako nije postignuta saglasnost o momentu kada ćelija zaista definitivno umire ili stiže do “tačke sa koje nema povratka”, dat je predlog da se ćelija može smatrati mrtvom (tj razlikovati od umiruće ćelije) u slučaju da pokazuje bilo koji od navedenih biohemijskih ili morfoloških kriterijuma: a) gubitak integriteta plazmaleme, b) fragmentacija jedra i čitave ćelije i formiranje diskretnih (apoptotskih) telašaca, i/ili c) da je telo ili fragmenti ćelije u *in vivo* sistemu, obuhvaćeno susednom ćelijom (118).

1.4.1. Terminologija ćelijske smrti

Termin “apoptoza” prvi put je upotrebljen 1972.godine kako bi se opisala smrt ćelije specifičnih morfoloških karakteristika, u koje se danas ubrajaju: smanjenje ćelije (piknoza, *pyknosis*), bubrenje membrane (*blebbing*), kondenzacija hromatina i fragmentacija jedra (*karyopyknosis*, *karyorrhexis*) i obuhvatanje ćelije ili fragmenata (*engulfing*) od strane susedne ćelije, *in vivo* (119). Termin “apoptoza” često se izjednačava sa pojmom “programirana ćelijska smrt”, dok se smatra da je nekroza slučajni, nekontrolisani vid smrti ćelije. Danas međutim, postoje dokazi da i u procesu nekroze postoji fino regulisani sistem prenosa signala i kataboličkih mehanizama, koji regulišu nekrozu. Iako ne postoji jasan konsenzus, neki autori su predožili termin “nekroptoza” (*necroptosis*) za ovaj vid kontrolisane nekroze (118, 120). Autofagija je specifičan proces koji ujedno može predstavljati specifični oblik smrti ćelije, ali i adaptivni mehanizam tokom stresa koji omogućava preživljavanje ćelije (121). Tokom ovog procesa vrši se sekvencijalno i “odlaganje” citoplazmatskog sadržaja u fagofore koji sazrevaju u autofagozome, spajaju se sa

lizozomima i sadržaj podleže razgradnji. Morfološki, autofagija se odlikuje masovnom vakuolizacijom citoplazme, ali bez kondenzacije hromatina (118, 121). Autofagija je kontrolisana Atg genima (*autophagy-related genes*), ali postoje brojne veze sa unutrašnjim i spoljašnjim putem apoptoze (121).

Prema NCCD postoje tzv. uslovne definicije atipičnih modaliteta smrti ćelija.

“Mitotska katastrofa” (*mitotic catastrophe*), koja se dešava tokom ili neposredno nakon iregularne mitoze, a može voditi i u apoptozu i u nekrozu.

“Anoikis” (*anoikis*) tip smrti ćelije uzrokovane gubitkom veza sa drugim, okolnim ćelijama, koji ima identične molekularne mehanizme kao apoptoza.

“Ekscitotoksičnost” (*excitotoxicity*), specifičan za neurone, usled dejstva ekscitatornih aminokiselina i prepoterećenja citosola neurona jonima kalcijuma i aktivacije signalnih puteva smrti ćelije koji se poklapaju sa nekrozom ili apoptozom.

„Valerova degeneracija“ (*Wallerian degeneration*) koja u stvari predstavlja oblik katabolizma ćelija nervnog sistema, gde propada deo neurona, bez zahvatanja i umiranja ćelijskog tela.

„Entoza“, (*entosis*) oblik ćelijskog kanibalizma gde ćelija obuhvati susednu vitalnu ćeliju koja na kraju umire unutar fagozoma.

„Paraptoza“ (*paraptosis*), termin korišćen za vid programirane ćelijske smrti koja se morfološki i biohemijski razlikuje od apoptoze. Indukovana je aktivacijom IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor), a karakteriše ga izražena vakuolozacija citoplazme i otok ćelije, bez drugih odlika apoptoze (118).

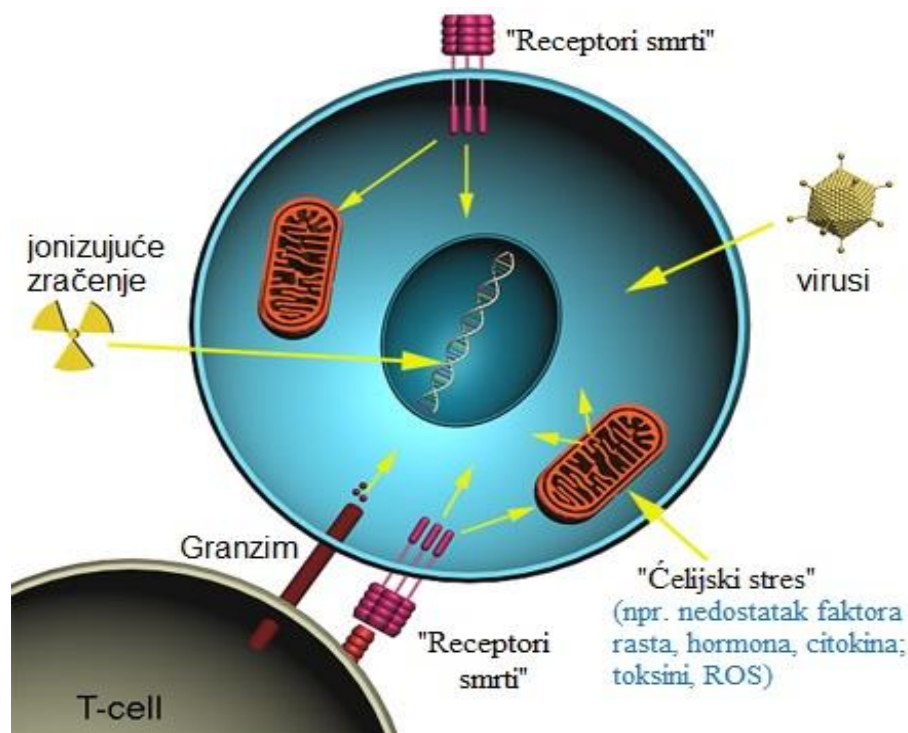
“Piroptoza” (*pyroptosis*) je termin skorašnjeg datuma, kojim se označio vid ćelijske smrti monocita, makrofaga i dendritičnih ćelija inficiranih različitim mikrobiološkim patogenima (122).

“Pironekroza” (*pyronecrosis*), nekrotična smrt makrofaga inficiranih sa *S. flexneri*, a razlikuje se od piroptoze po tome što ne zahteva aktivaciju kaspze 1 (117, 118).

1.4.2. Apoptoza

Genetski kod apoptoze je prisutan kod svih višecelijskih organizama, a povećanje propustljivosti spoljašnje membrane Mth (*mitochondrial outer membrane permeability, MOMP*) predstavlja “tačku bez povratka”. Apoptoza se može aktivirati unutrašnjim putem ili spoljašnjim putem, a osim toga opisuje se i treći put aktivacije apoptoze, koji uključuje T

limfocitima-posredovanu citotoksičnost (perforin/granzim-zavisnu smrt) kao i direktni uticaj radijacije i virusnih faktora (Slika 14) (123).



Slika 14. Putevi aktivacije apoptoze (123).

Spoljašnji put apoptoze pokreće se preko tzv. receptora smrti na površini ćelijske membrane, čijom se aktivacijom u ćeliji generiše signal indukcije smrti (*death-inducing signaling complex, DISC*) i aktivacija kaspaze-8, a potom efektornih kaspaza-3, -6 i -7 (117, 121).

Kod unutrašnjeg puta aktivacije stimuli su intracelularni (negativni: nedostatak faktora rasta, hormona, citokina i slično; ili pozitivni: prisustvo radijacije, toksina, virusa, kiseoničnih radikala i drugo). Ovi faktori indukuju MOMP što je pod kontrolom proteina iz Bcl-2 familije. MOMP omogućava da citohrom c, iz Mth, prelazi u citoplazmu i aktivira ili olakšava aktivaciju kaspaza, kao efektoru apoptotske smrti (117, 119, 121, 123).

Iniciranje apoptoze je u više navrata povezano sa padom nivoa GSH u ćeliji i istovremenim nakupljanjem ROS (114), kao i sa redistribucijom GSH u samoj ćeliji. Iako se GSH sintetiše u citosolu, transportuje se u organele, prvenstveno u jedro i mitohondrije gde

može biti kofaktor GSH-Px. Nuklearni sadržaj GSH je rezistentniji na depleciju u odnosu na citosolni kompartman, što govori u prilog naglašene zaštite genetskog materijala od strane GSH pod uticajem ROS, a izražena ekspresija antiapoptotskog Bcl-2 pospešuje prenos GSH u jedro (124). U Mth je prisutno 10-15% ćelijskog GSH, dok manja zastupljenost pospešuje produkciju ROS prekidom transporta elektrona. Ipak, da li pad nivoa GSH prethodi ili prati inicijaciju apoptoze, nije jasno utvrđeno. Smatra se da izolovani pad GSH nije dovoljan za okidanje procesa apoptoze (114, 125). Takođe, postoje pretpostavke da je odnos Bcl-2 i GSH, kao i OS i antioksidativnih mehanizama tkivno- i organ-specifičan (99).

1.4.2.1. Bcl-2 familija

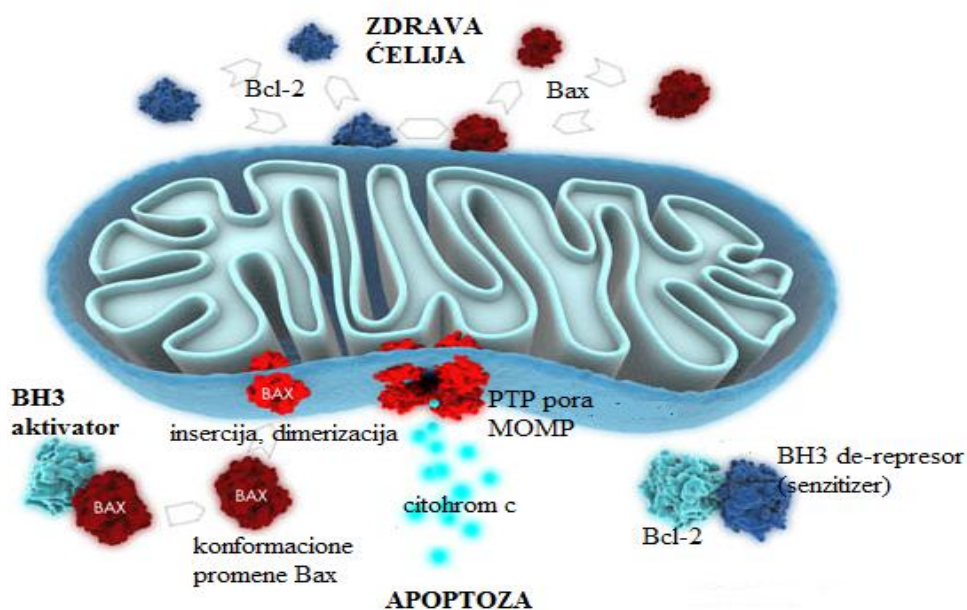
Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) protein je prvi protein ove familije koji je otkriven, da bi do danas bilo poznato preko 20 članova. Svi članovi Bcl-2 familije protein sadrže bar jedan od 4 visoko konzervirana Bcl-2 homologa domena (BH domeni). Ovi domeni odgovorni su za procese međusobne interakcije članova familije kao i homo- i heterodimerizacije, čak i članova sa suprotnim dejstvom na process apoptoze (119).

Tabela 1. Podela članova Bcl-2 familije proteina, u zavisnosti od funkcije (119).

Bcl-2 porodica gena			
Anti-apoptotski	Pro-apoptotski (multidomenski)	Pro-apoptotski BH3-only	
		<u>Aktivatori</u>	<u>De-represori</u> (<i>sensitizer BH3-only</i>)
Bcl-2	Bax	Bid	Puma
Bcl-Xl	Bak	Bim	Bad
Bcl-w	Bok/Mtd		Noxa
Mcl-1			Bmf
A1			Bik/Bik

Bcl-2 familija deli se na anti-apoptotske i pro-apoptotske članove. Proapoptotski mogu biti multidomenski ili sadržati samo BH3 domen, tzv *BH3-only* proteini. BH3-only grupa deli se na aktivatore i de-represore (senzitizer) (Tabela 1) (119, 121).

U fiziološkim uslovima, anti-apoptotski članovi vezani su za spoljašnju membranu Mth, održavaju stabilnost i nepropustnost spoljašnje Mth membrane. Anti-apoptotski proteini neutrališu proapoptotske vezivanjem za BH3 domene antiapoptotskih Bcl-2 proteina.



Slika 15. Proteini Bcl-2 familije u zdravoj i apoptotski izmenjenoj ćeliji (127)

Da bi došlo do MOMP i apoptoze, moraju se istovremeno odigrati dva procesa: (1) svi anti-apoptotski proteini moraju biti inhibirani i (2) Bax i Bak moraju biti aktivirani BH3-only aktivatorima. De-represorski BH3-only inhibiraju antiapoptotske Bcl-2 proteine ali ne mogu da aktiviraju Bax/Bak, dok aktivatorski BH3-only mogu i jedno i drugo (119).

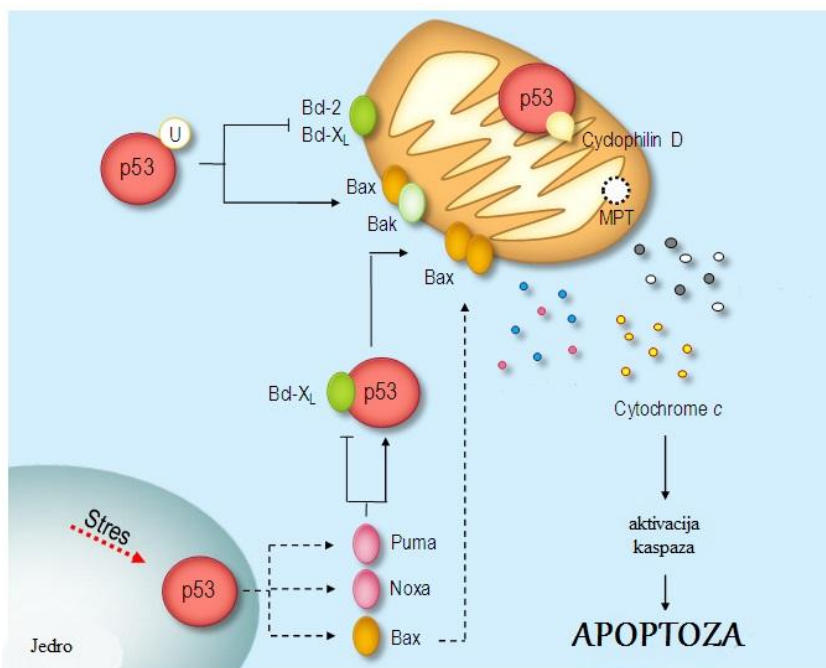
Tokom ćelijskog stresa, aktivni oblici *BH3-only* aktivatora (Bid, Bim) direktnom interakcijom (*“hit and run”*) izazivaju konformacione promene, dimerizaciju i inserciju Bax i Bak u Mth membranu dovodeći do formiranja delikatnih pora (*permeability transition pore, PTP*) i MOMP (Slika 15) (117, 126).

Veruje se da se anti-apoptotski članovi Bcl-2 vezuju i za proteine koji ulaze u sastav PTP i time dodatno sprečavaju MOMP. Kroz PTP, citohrom c izlazi u citosol, vezuje se za Apaf-1

(*apoptotic protein activating factor 1*) i ATP, formirajući apoptozom, tj platformu za detektovanje i aktivaciju prokaspaze-9 u kaspazu-9, koja potom dovodi do aktivacije kaspaze-3 i time promoviše sprovođenje apoptoze (117, 121, 126).

1.4.2.2. p53

Iako Bcl-2 familija proteina kontroliše stabilnost Mth i inicijaciju apoptoze, p53 tumor supresorski gen i tzv. čuvar ljudskog genoma, ima sposobnost da utiče na apoptozu indukovanu uglavnom unutrašnjim, ali i spoljašnjim putem (128). Protein p53 deluje kao transkripcioni faktor, i kao takav uključen je u brojne važne ćelijske odgovore od regulacije i zaustavljanja ćelijskog ciklusa radi zaštite celovitosti genoma do indukcije apoptoze, regulacije autofagije i promocije ćelijske diferencijacije.



Slika 16. Uloga p53 u indukciji apoptoze i interakcija sa Bcl-2 familijom (128)

U normalnim uslovima, ili uslovima blagog stresa, p53 u ćeliji indukuje gene uključene u antioksidativne procese i štiti ćelijsku DNK. Ipak, ovaj efekat je verovatno zavistan od koncentracije p53 proteina i osim njega sigurno postoje i drugi faktori koji odlučuju o sudbini ćelije. U uslovima težeg ćelijskog stresa, povećana je razgradnja *Mdm-2/p53* kompleksa što produžava život *p53* i omogućava mu ulazak u jedro i Mth (97, 128, 129).

Ostvarenje funkcije gena p53 zavisi od stabilnosti p53 proteina, koja je većim delom regulisana proteinom Mdm-2. Mdm-2 inhibira ili smanjuje aktivnost p53 proteina kontrolom celularne lokalizacije p53, tj p53 protein vezan za *Mdm-2*, ostaje u citoplazmi, i na ovaj način je sprečena indukcija i aktivacija Bax na membrani Mth. Naime, u citosolu i Mth p53 pospešuje oligomerizaciju proapoptotskih Bax i Bak (antagonizujući antiapoptotski efekat Bcl-2 i Bcl-xL) i pojavu MOMP (128).

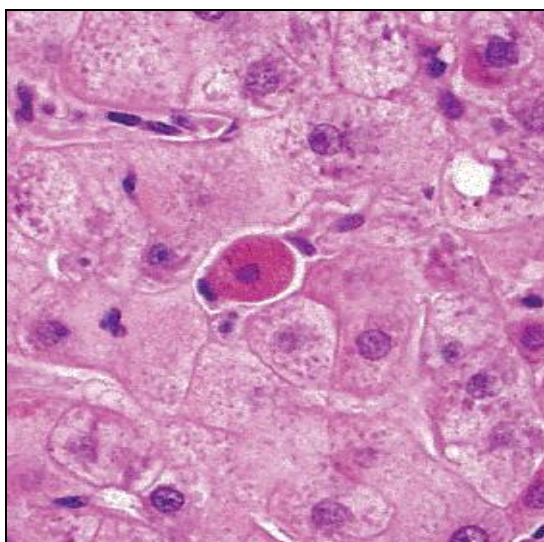
Još jedan od mehanizama kojim p53 može da deluje na Mth i indukuje apoptozu je indukcija ROS i proteina Puma i Noxa (119, 128, 130). U jedru, p53 deluje kao aktivator transkripcije proapoptotskih gena Puma i Noxa i njihovih proteinskih produkata. Konkretnije, Noxa inhibira ili onesposobljava antiapoptotski bcl-2, dok Puma indukuje ekspresiju, konformacione promene i translokaciju unutar Mth proapoptotskog Bax (128).

U uslovima OS, slobodni p53 u većoj koncentraciji stimuliše bar dva proteina uključena u ROS-indukovanu apoptozu, kao i ekspresiju p85 za koji se veruje da deluje kao signalni molekul tokom ROS-zavisne p53-indukovane apoptoze (97, 128, 129).

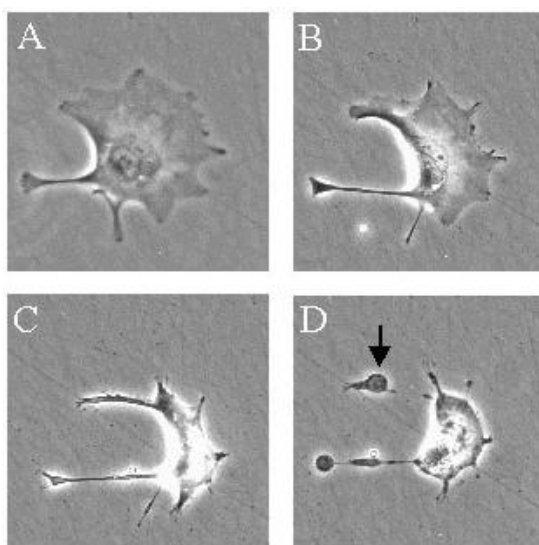
1.4.2.3. Morfološke odlike apoptoze

Svetlosna (Slika 17) i elektronska (Slika 18) mikroskopija identifikovale su veći broj promena koje se dešavaju u procesu apoptoze. U ranoj fazi piknoza je vidljiva svetlosnim mikroskopom; ćelija se smanjuje, citoplazma postaje gušća i ispunjena organelama, hromatin je kondenzovan. Proces zahvata pojedinačne ćelije ili manje grupe ćelija koje imaju izgled okruglih do ovalnih masa eozinofilne citoplazme i bazofilnih jedara (Slika 17). U njima se nalazi deo citoplazme i organela, sa ili bez dela jedra. Apoptotska tela bivaju fagocitovana od strane makrofaga ili parenhimskih ćelija.

Zapaljenska reakcija nije uobičajena posledica apoptoze jer nema oslobađanja inflamatornih citokina ili sadržaja ćelija u medjućeliski prostor, a ostaci se brzo fagocituju. Svetlosnim mikroskopom nije uvek jednostavno izdiferencirati nekrozu manjeg obima i apoptozu. Nekrotično izmenjene ćelije se odlikuju bubrenjem i uvećanjem ćelije, vakuolizacijom citoplazme i bubrenjem organela i na kraju rupturom ćelijske membrane. Oslobađanje sadržaja ćelije inicira inflamatornu reakciju u okolnom tkivu. Takođe, nekroza za razliku od apoptoze, obično zahvata veće grupe ćelija (123).

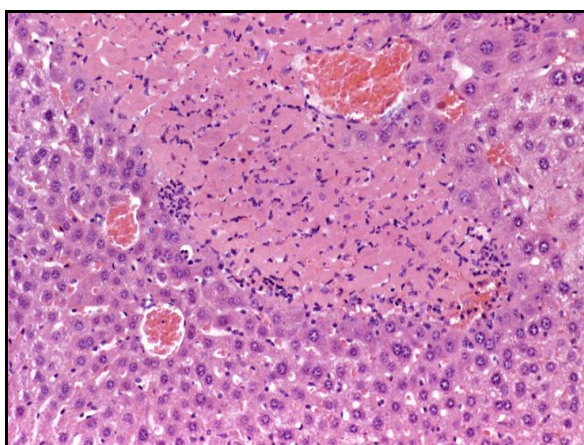


Slika 17. Tkivo jetre sa apoptotski izmenjenom ćelijom (131)

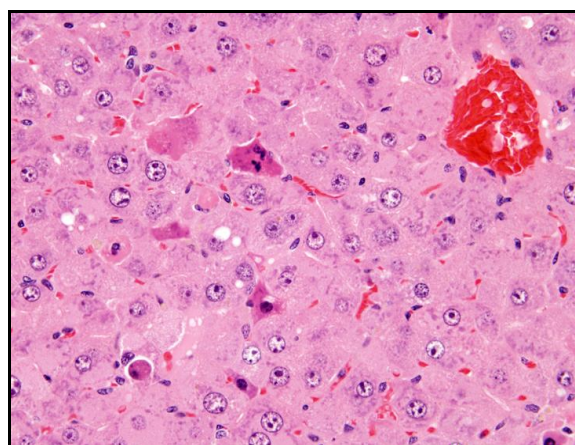


Slika 18. Elektromikrografski prikaz procesa apoptoze ćelije (131).

(ćelija se smanjuje (A); kariopiknoza (B); membrane formira nabore, vakuole i ekstenzije (C); odvajanje apoptotskih telašaca (D, strelica).



Slika 19. Tkivo jetre sa pojedinačno raspoređenim apoptotski izmenjenim ćelijama, bez prisustva inflamatornog infiltrata (131).



Slika 20. Tkivo jetre sa bestrukturnim fokusom nekroze i blagom inflamatornom reakcijom na rubu nekrotičnog žarišta (131).

2. Ciljevi istraživanja

Planirano istraživanje uticaja primene ursodeoksiholne kiseline i monoketoholne kiseline obuhvatiće proveru više relevantnih parametara, te su fermirani dole navedeni ciljevi:

1. Ispitati uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na telesnu masu, glikemiju i parametre jetrene funkcije u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
2. Ispitati uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na proliferaciju hepatocita u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
3. Ispitati uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na ekspresiju proteinskih produkata gena uključenih u process apoptoze u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
4. Ispitati uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na ekspresiju nuklearnog farnesoid X receptora u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
5. Ispitati uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na antioksidativni status hepatocita u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.

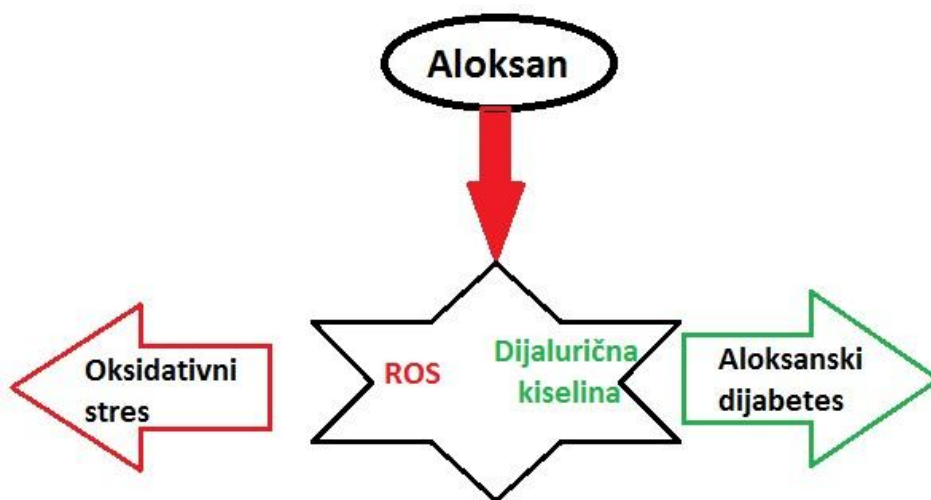
3. Materijal i metode

3.1. Primenjene hemijske supstance

3.1.1. Aloksan

U istraživanju je korišćen rastvor aloksan monohidrata (alloxan monohydrate, Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA). Rastvaranje aloksana izvršeno je u fiziološkom rastvoru i odmah nakon pripreme apliciran je životinjama jednokratno, intraperitonealnim (i.p.) putem, u dozi od 150mg/kg telesne mase.

Aloksan je pirimidinski derivat čija strukturna formula u velikoj meri liči na molekul glukoze, a u organizmu se ponaša kao analog glukoze. Veoma je nestabilno hemijsko jedinjenje, tako da je poluživot aloksana veoma kratak i u vodenom rastvoru se kroz par minuta spontano pretvara u nedijabetogenu aloksansku kiselinu. Zbog ovoga on mora biti brzo primenjen nakon pripreme (132, 133). On je ustvari protoksin, koji putem GLUT2 receptora ulazi u beta-ćelije pankreasa gde stvara ROS i toksičnu dialuričnu kiselinu (tokom <1h) (Slika 21).



Slika 21. Efekti primene aloksana.

Nakon primene aloksana razlikujemo četiri faze:

a) I **faza** (*prolazna hipoglikemijska faza*) – počinje od primene aloksana i traje oko 30 minuta, a predstavlja kratkotrajni hipoglikemijski odgovor koji nastaje usled prolazne stimulacije sekrecije insulina (134).

b) **II faza** (*prva hiperglikemijska faza*) - obično traje 2-4 sata i nastaje kao posledica blokade insulinske sekrecije sa pratećom hipoinsulinemijom (134).

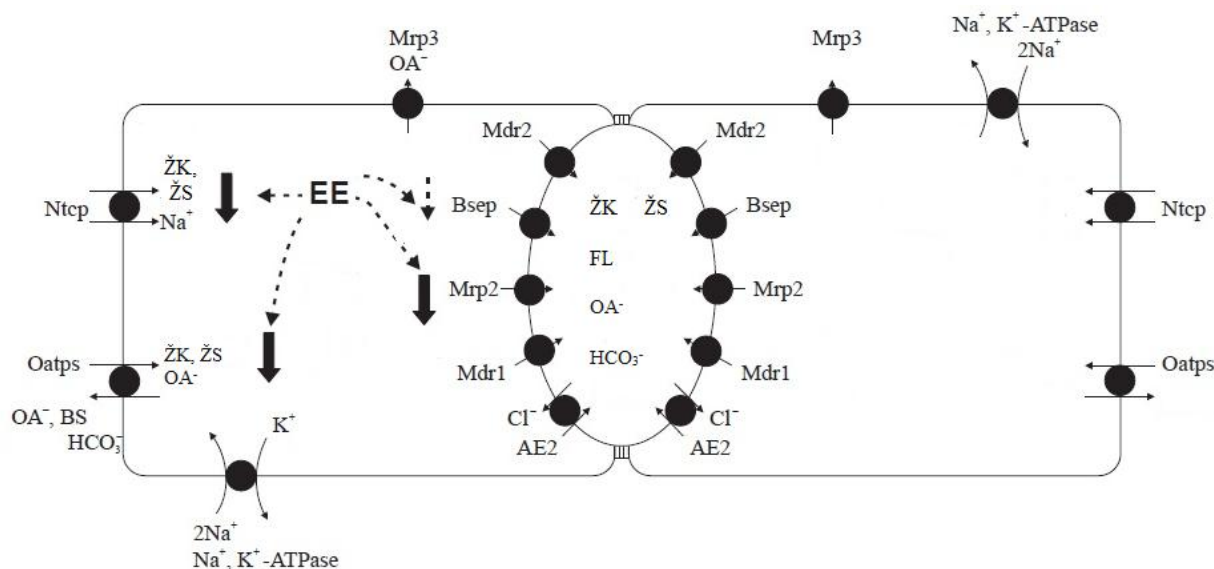
c) **III faza** (*druga hipoglikemijska faza*) - tipično se javlja 4 do 8 časova nakon injekcije aloksana i traje tokom nekoliko časova. Kao rezultat toksinom uzrokovane rupture sekretornih granula i ćelijske membrane beta ćelija dolazi do preplavljenja cirkulacije insulinom dovodeći do ozbiljne prolazne hipoglikemije. Promene na beta ćelijama pankreasa su ireverzibilne (134).

d) **IV faza** (*faza permanentne dijabetične hiperglikemije*) – razvija se unutar 12 do 24 časa nakon primene aloksana i predstavlja permanentnu dijabetičnu hiperglikemijsku fazu (134).

3.1.2. Etinil-estradiol

U cilju izazivanja holestaze i oksidativnog oštećenja korišćen je etinilestradiol (EE). Primenjivan je subkutano (s.c.), u dozi od 5 mg/kg telesne mase životinje. Aplikovan je jednom dnevno, tokom 5 dana.

EE deluje putem smanjenja toka žuči, odnosno veoma brzo dovodi do poremećaja funkcionisanja ćelijske membrane, ATP-azne aktivnosti membrane i ekspresije i funkcije transportera ŽK na sinusoidnoj membrani (Natcp i Na-nezavisni transport) (32). Takodje, EE smanjuje sposobnost ekskrecije ŽK na kanalikularnoj membrani putem BSE, *Mdr-associated 2* i *Mrp2* transportera (18, 135), a krajnji efekat je narušena ekskrecija ŽK, holesterola, fosfolipida, bikarbonata i drugih molekula koji koriste ove transportne sisteme. Dugotrajna primena EE na pacovima ima hepatotoksičan efekat i voditi do brojnih histomorfoloških i finkcionalnih poremećaja jetre (136). Toksični efekat EE je posledica metabolita, estradiol-17 β -D-glukuronida (E_2 17G) koji pripada grupi konjugata estrogenskog-D prstena koji kod pacova imaju dozno i vremenski zavistan holestatski efekat. Ovaj metabolit izaziva kako smanjenje funkcije *Mrp2* tako i internalizaciju *Mrp2* i BSEP transportera. Tako utiče na transport ŽK i ŽS (BSEP) i na transport glutaciona (*Mrp2*). Osim toga, EE i E_2 17G povećavaju propustljivost međjućelijskih veza i omogućavaju paracelularno isticanje komponenti žuči (29).



Slika 22. Šematski prikaz regulacije transportera na hepatocitnoj membrani u intrahepatičnoj holestazi izazvanoj etinilestradiolom (EE) (29).

Legenda: EE- etinilestradiol, ŽS- žučne soli, ŽK- žučne kiseline, OA⁻ – organski anjoni, FL – fosfolipidi. Isprekidane linije pokazuju promene u transportnom sistemu, (isprekidani vertikalni deo strelice = blage varijacije, tanak vertikalni deo strelice = umerena varijacija, širok vertikalni deo strelice = izražena varijacija, strelica usmerena na dole = nishodna regulacija, strelica usmerena na gore = ushodna regulacija).

Primena E₂ 17G intravenskim putem uzrokuje skoro trenutni nastanak holestaze, za razliku od nekonjugovanih estrogena poput EE kome je potrebna metabolička obrada, što nosi određene prednosti i mane u zavisnosti od cilja istraživanja (137).

3.1.3. Žučne kiseline

Struktura, osobine, potencijalna i dokazana dejstva ursodeoksiholne (UDK) i 12-monoketoholne (MK) kiseline izložena su u prethodnim poglavljima (1. Uvod).

Primenjena UDK je kupljena kao komercijalni preparat (Sigma), dok je 12-MK sintetisana na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, po metodi Milkovic i saradnika.

3.1.4. Ostale supstance

Za rastvaranje EE koristio se propilen glikol, u dozi od 0,5 ml/kg telesne mase životinje.

3.2. Ogledne životinje i ogledne grupe, protokol ispitivanja i žrtvovanje

3.2.1 Ogledne životinje

U ogledu su korišćeni zdravi, beli laboratorijski pacovi, muškog pola, soja *Wistar*, telesne mase 200-300g. Pacovi su odabrani metodom slučajnog odabira iz okota Vojno-tehničkog instituta u Beogradu. Laboratorijske životinje su boravile u Uni-Protect (Ehret, Emendingen, Nemačka) ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja sa filterskim sistemom za protok vazduha, u Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. U ormarima je temperatura vazduha održavana između 20 i 25⁰C, uz kontrolu vlažnosti vazduha (50-60%) i održavanje cirkadijalnog ritma (smene dana i noći u trajanju od po 12 časova). Životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje (Veterinarski institut Zemun, Srbija). U jednom kavezu nalazile su se sve životinje odgovarajuće ogledne grupe.

Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje ogleda odobrila je Etička komisija za rad sa oglednim životinjama Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost sa planom ovog ispitivanja.

3.2.2. Ogledne grupe

Ogledne grupe koje nisu primale aloksan, formirane su nasumičnim odabirom. Oformljeno je pet grupa od po 4 jedinke. Kontrolnu grupu (K1) činile su jedinke tretirane samo fiziološkim rastvorom. Da bi se izvršila provera eventualnog delovanja rastvarača za etinilestradiol, formirana je grupa K2, gde su jedinke primale propilen glikol.

Preostale oformljene grupe označene su sa EE (primena samo etinilestradiola), E-UDK (etinilestradiol i ursodeoksiholna kiselina) i E-MK (etinilestradiol i monoketoholna kiselina). Nakon 24h od prijema životinja, izmerena je telesna masa svake jedinke, i počelo se sa primenom protokola istraživanja predviđenog za životinje u navedenim grupama. Detaljan protokol tretmana jedinki za svaku grupu prikazan je u Tabeli 2.

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni status i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

Tabela 2. Ogladne grupe i protokol ispitivanja

Naziv grupe	Broj životinja	Primenjene supstance	Doza	Primena	Dnevno doza	Trajanje (dani)
K1	4	Fiziološki rastvor	0.5 ml/kg	i.p.	1	5
K2	4	Propilen-glikol	0,5 ml/kg	s.c.	1	5
EE	4	Propilen-glikol	0.5 ml/kg	s.c.	1	5
		Etinilestradiol	0.5 mg/kg	s.c.	1	5
E-MK	4	monoketoholna kiselina	4 mg/kg	i.p.	2 (07 i 19h)	5
		propilen-glikol	0.5 ml/kg	s.c.	1	5
		Etinilestradiol	0.5 mg/kg	s.c.	1	5
E-UDK	4	Ursodeoksiholna kiselina	25 mg/kg	i.p.	1	5
		propilen-glikol	0.5 ml/kg	s.c.	1	5
		Etinilestradiol	0.5 mg/kg	s.c.	1	5
K-A	5	Aloksan	150 mg/kg	i.p.	1	1
K-AE	5	Aloksan	150 mg/kg	i.p.	1	1
		propilen-glikol	0.5 ml/kg	s.c.	1	5
		Etinilestradiol	0.5 mg/kg	s.c.	1	5
AE-MK	5	Aloksan	150 mg/kg	i.p.	1	1
		propilen-glikol	0.5 ml/kg	s.c.	1	5
		Etinilestradiol	0.5 mg/kg	s.c.	1	5
		Monoketoholna kiselina	4 mg/kg	i.p.	2 (07 i 19h)	5
AE-UDK	5	Aloksan	150 mg/kg	i.p.	1	1
		propilen-glikol	0.5 ml/kg	s.c.	1	5
		Etinilestradiol	0.5 mg/kg	s.c.	1	5
		Ursodeoksiholna kiselina	25 mg/kg	i.p.	1	5

Legenda: MK – monoketoholna kiselina, UDK – ursodeoksiholna kiselina

Grupe koje će biti tretirane aloksanom, oformljene su od preostalih jedinki, na sledeći način. Nakon 24h od prijema, izmerena je telesna masa jedinki, i aplikovana je prva doza aloksana (sveže pripremljen rastvor u dozi od 150mg/kg).

a) Nakon 24 časa od primene aloksana merena je glikemija (iz repne vene, aparatom Gluco Sure Plus Blood Monitoring System (Apex Biotechnology Corp)). Ukoliko je iznosila \geq

15.0 mmol/l, smatrali smo da je došlo do razvoja aloksanskog dijabetesa. Jedinama kojima je registrovana glikemija niža od 15.0 mmol/l, aplikovana je još jedna doza aloksana.

b) Nakon 48 časova od prve primene aloksana kod svih životinja još jednom je proverena glikemija a sve jedinice sa glikemijom nižom od 15 mmol/l su isključene iz daljeg toka ogleđa.

Tako je 48 časova od prve primene aloksana preostalo 20 životinja kod kojih je izazvan aloksanski dijabetes, i one su slučajnim izborom grupisane u grupe A, AE, AE-MK i AE-UDK, tako da je u svakoj navedenoj grupi bilo po 5 životinja.

3.2.3. Protokol ispitivanja

Nakon ovako formiranih oglednih grupa započelo se sa predviđenim eksperimentalnim protokolom (Tabela 2).

Dan nakon poslednjeg dana ogleđa i približno nakon 12 časova od primene poslednje doze žučne kiseline, životinjama je merena glikemija u kapilarnoj krvi iz repne vene. Nakon merenja glikemije, pristupalo se žrtvovanju životinja.

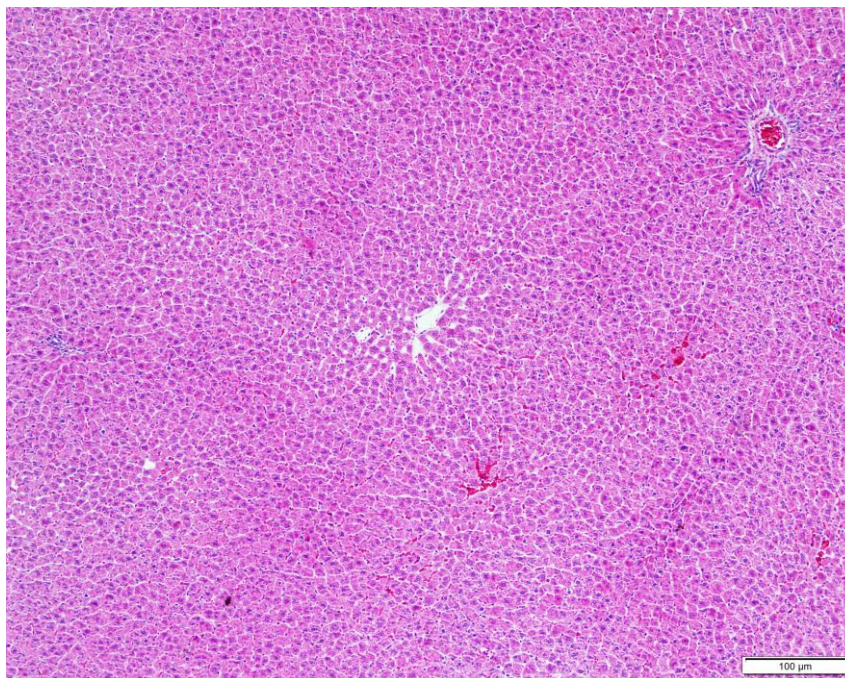
3.2.4. Žrtvovanje životinja

Životinje su uvedene u opštu anesteziju uz pomoć 25% rastvora uretana (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA) u koncentraciji od 5ml/kg telesne težine intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane eksangvinacijom (kardiopunkcijom) u cilju uzimanja uzoraka krvi. Nakon žrtvovanja od svake jedinice je uzet isečak tkiva jetre, oslobođen vezivnog tkiva, osušen filter papirom, izmeren i čuvan na -70°C do homogenizacije. Nakon toga, uzet je još jedan isečak tkiva jetre i fiksiran u puferisanom 4% rastvoru formalina u cilju dalje histološke obrade.

3.3. Histološka i imunohistohemijska obrada tkiva

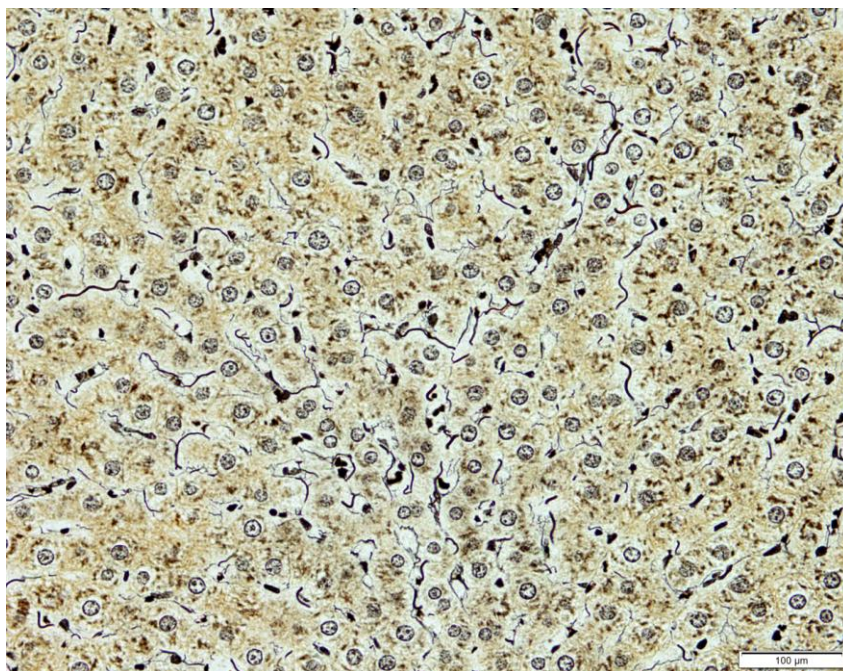
Isečci tkiva jetre fiksirani u 10% formalinu, dehidratirani su rastućim koncentracijama etanola, ukalupljeni u parafin i sečeni na kliznom mikrotomu marke Leica pri debljini histoloških rezova od 5 μ m. Od svakog kalupa isečen je odgovarajući broj susednih preseka tkiva, koji su bojeni sledećim metodama.

➤ **Klasičnim hematoksilin-eozin (HE) bojenjem** (2) (Slika 23)

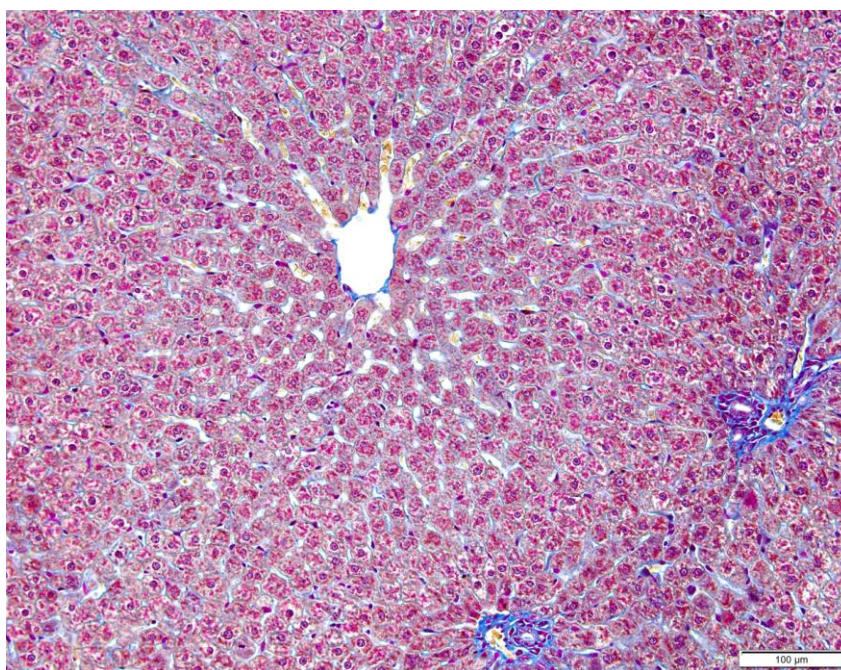


Slika 23. Tkivo jetre zdravih jedinki pacova (HE, 10x).

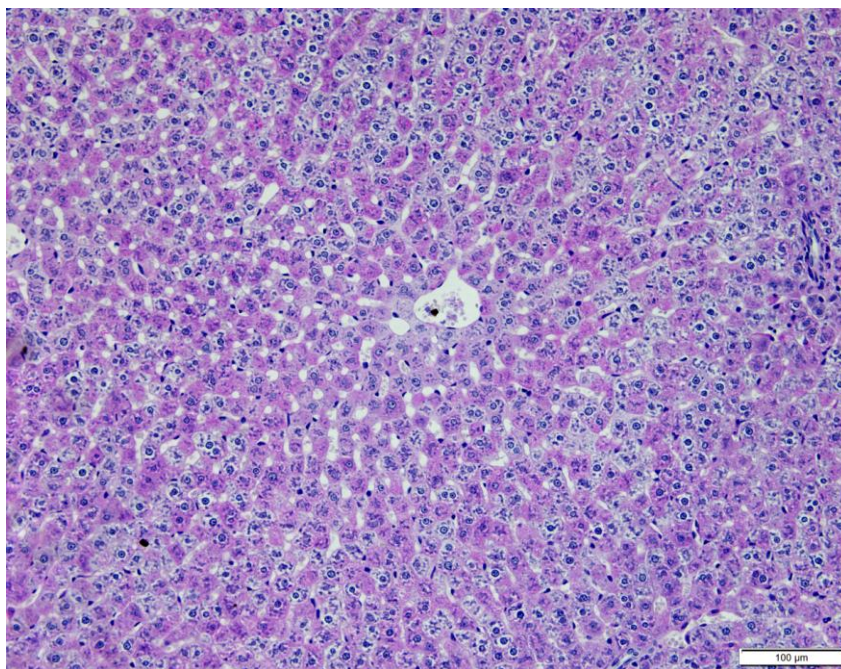
➤ **Histohemijskim metodama bojenja** (2) za prikazivanje retikulinske potke hepatocita (retikulin), vezivnog tkiva (*Mallory*), retikulinske potke hepatocita (retikulin) i glikogena (*Periodic Acid Schiff* (PAS) i/ili *Periodic Acid Schiff- Alcian Blue* (PAS/AB). Histohemijska bojenja normalnog tkiva jetre pacova prikazana su na slikama 24, 25 i 26.



Slika 24. Tkivo jetre zdravih jedinki pacova (retikulin, 40x)



Slika 25. Tkivo jetre zdravih jedinki pacova (Mallory, 20x)



Slika 26. Tkivo jetre zdravih jedinki pacova (PAS, 20x)

➤ **Imunohistohemijском metodom bojenja tkiva**, kada su primenjena sledeća primarna antitela:

- Ki67 antibody [SP6] - Proliferation Marker (Abcam)
- p53 (FL-393), rabbit polyclonal IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology)
- Bax (P-19), rabbit polyclonal IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology)
- Bcl-2 (C 21), rabbit polyclonal IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology)
- Bcl-X Ab-1 , mouse monoclonal IgG antibody (Lab Vision - Thermo scientific)
- FXR (H-130), rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology)

Korišćen je sistem za vizuelizaciju - *UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Chromogen* (Lab Vision – Thermo scientific), a metod bojenja bio je istovetan za sva antitela, po protokolu propisanom od strane proizvođača: po rehidraciji isečaka ("dovođenja do vode") isti su podvrgnuti pretretmanu zagrevanjem isečaka u citratnom puferu (pH 6.0) u Thermo Scientific PT Linku 20 minuta nakon čega je usledilo hlađenje preparata u trajanju od 30 minuta. Po završetku hlađenja isecci su isprani četiri puta u puferu (PBS, pH7.4) i potom u cilju otklanjanja nespecifičnog pozadinskog bojenja inkubirani 5 minuta u *Ultra V Block* (Lab Vision TA-015-UB). Po ispiranju u puferu aplikovano je odgovarajuće primarno

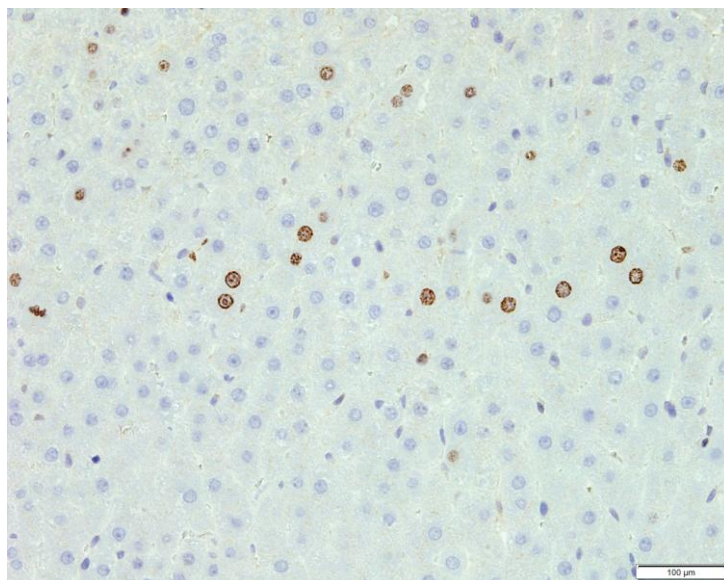
antitelo (Bcl2, BclX, Bax, FXR, P53-1:100, Ki-67-1:200) u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Isečci su potom tretirani sa *Primary Antibody Enhancer* (Lab Vision, TL-015-PB) u trajanju od 10 minuta. Nakon ispiranja puferom isečci su 15 minuta podvrgnuti *HRP Polymer-u* (Lab Vision, TL-015-PH). Vizuelizacija je izvršena primenom *DAB Chromogen-a* (Lab Vision, TA-015-HDX). Bojenje i kontrastiranje isečaka izvršeno je Majerovim hematoksilinom. Preparati su analizirani na mikroskopu marke Olympus BX43, sa uveličanjem objektiva od 10, 20, 40 i 60 puta i fotografisani kamerom marke Olymus DP73.

3.3.1. Interpretacija imunohistohemijskih bojenja

Na svim preparatima bojenim imunohistohemijskom metodom određivano je prisustvo ili odsustvo bojenja, tj ekspresije navedenih antitela. Za pojedine markere analizirana je i procentualna zastupljenost pozitivnih ćelija, intenzitet bojenja, što je detaljnije opisano u narednim poglavljima.

3.3.1.1. Proliferativni indeks hepatocita (ekspresija Ki-67)

Proliferativni indeks hepatocita interpretira se na osnovu ekspresije Ki-67 markera (Slika 27) (22).



Slika 27. Ekspresija Ki-67 u jedru hepatocita (40x).

3.3.1.2. Ekspresija Bcl-2, Bcl-x, Bax i p53 markera

Ekspresija Bcl-2, Bcl-x, Bax i p53 određivana je u hepatocitima semikvantitativno, po zajedničkom kriterijumu: (0) – nema ekspresije, (1) – slaba ekspresija (slab intenzitet bojenja u više od 5% ćelija ili jak intenzitet bojenja u manje od 5% ćelija), (2) – umereno izražena ekspresija (slab do umeren intenzitet bojenja u više od 15% ćelija ili jak intenzite bojenja u 5-15% ćelija) i (3) – izražena ekspresija (umeren ili jak intenzitet bojenja u više od 15% ćelija) (124, 127, 128).

Za Bcl-2, Bcl-X i Bax ispitivana je citoplazmatska ekspresija, a za p53 i nuklearna i citoplazmatska ekspresija.

3.3.1.3. Ekspresija nuklearnog FXR receptora

Ekspresija FXR određivana je na osnovu zbira ocena za intenzitet bojenja (FXRint) i procenat (FXR%) ćelija koje pokazuju bojenje (Tabela 3.) (138). Na ovaj način dolazi se do vrednosti FXRscore.

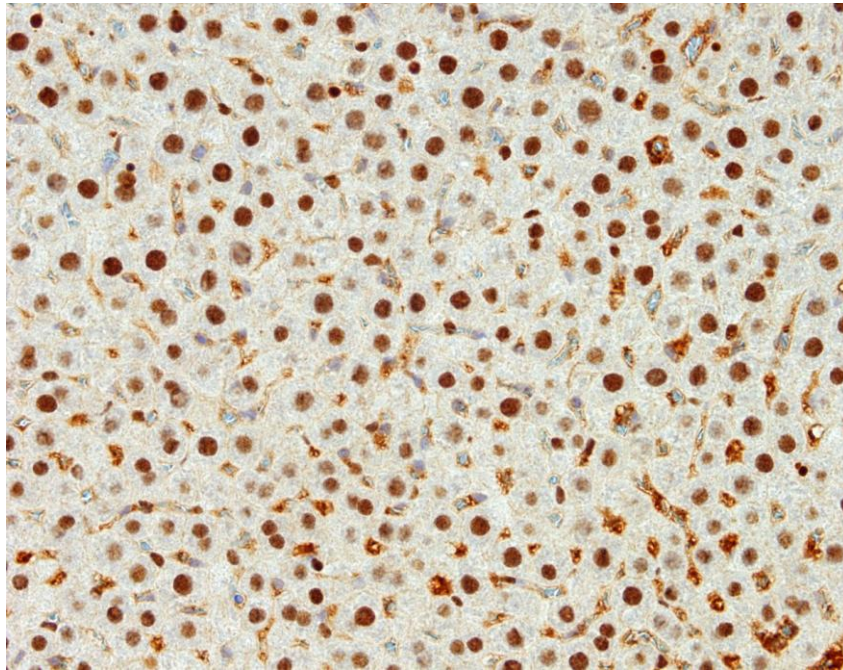
Tabela 3. Kriterijum za ocenjivanje FXRint i FXR% u hepatocitima

ocena	Intenzitet bojenja (FXRint)	Procenat obojenih ćelija (FXR%)
1	Slab	1-25%
2	Umeren	26-50%
3	Jak	51-75%
4	-----	76-100%

Kako bi se lakše interpretirala i poredila ekspresija FXR, za potrebe našeg istraživanja vrednosti FXRscore smo grupisali kao u Tabeli 4. Na osnovu toga, ekspresija FXR receptora u tkivu jetre ogleđnih životinja, opisivana je kao jaka, umerena ili slaba (Slika 28, Slika 29, Slika 30).

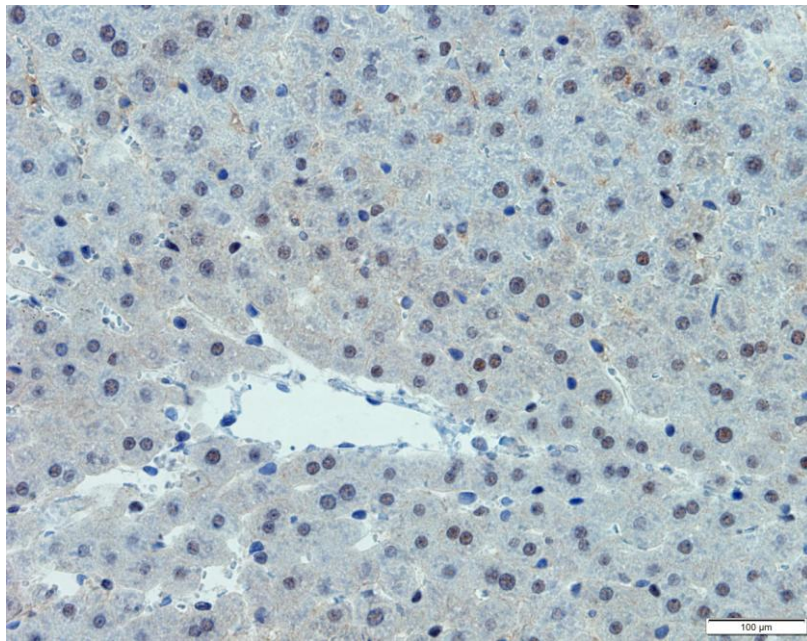
Tabela 4. Kategorije FXRscore na osnovu kojih je tumačena ekspresija FXR.

FXRscore	Ekspresija FXR
nizak (2 i 3)	slaba ekspresija
srednji (4 i 5)	umerena ekspresija
visok (6 i 7)	jaka ekspresija

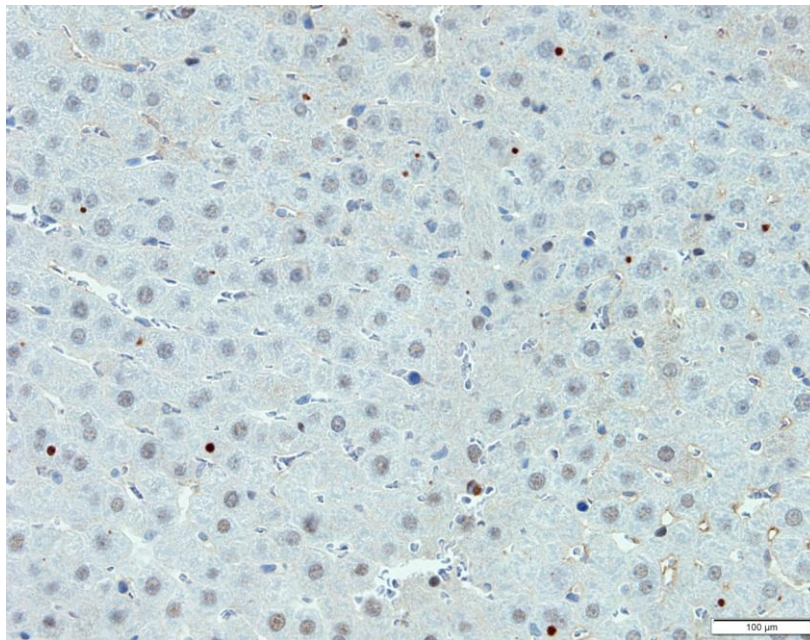


Slika 28. Jaka ekspresija FXR (40x).

(FXR score 7: jak intenzitet bojenja (3) u više od 75% ćelija (4))



Slika 29. Umerena ekspresija FXR (40x).
(FXR score 4: slab intenzitet bojenja (1) u više od 50% ćelija (3))



Slika 30. Slaba ekspresija FXR (40x).
(FXR score 3: slab intenzitet bojenja (1) u do 50% ćelija (2))

3.4. Biohemijske metode ispitivanja

3.4.1. Instrumenti

Za merenje mase organa korišćena je tehnička vaga, marke „Sartorius“, sa tačnošću od $\pm 0.001\text{g}$. Za homogenizaciju je korišćen Potter-Elvehjem homogenizator (Braun). Za određivanje enzimske aktivnosti korišćen je Agilent 8453 UV/VIS spektrofotometar sa termostatiranim multićelijskim sistemom za pozicioniranje uzoraka i softverom za ispitivanje enzimske kinetike.

3.4.2. Uzimanje uzoraka i priprema za analizu

Nakon eksangvinacije i žrtvovanja životinja, uzeti uzorci jetre su odmah nakon vađenja stavljeni u ledeni fiziološki rastvor, oslobođeni vezivnog tkiva, osušeni filter papirom, izmereni i čuvani na -70°C do homogenizacije.

3.4.3. Homogenizacija

Uzorci organa su, nakon odmrzavanja, u cilju dobijanja grubog homogenata (10% w/v), potopljeni u TRIS/KCl pufer za homogenizaciju (0.05M TRIS:1.15 % KCl=1:1, pH=7.4) u odnosu 1:10. U cilju olakšane homogenizacije uzorak je držan na ultrazvučnom kupatilu 2 min uz usitnjavanje organa hiruškim makazicama, a zatim homogenizovan pomoću Potter-Elvehjem homogenizatora na ledu.

Nakon završene homogenizacije:

- Odvojeni su delovi grubog homogenata, iz kojih je određivana koncentracija proteina i TBARS
- Frakcija grubog homogenata je centrifugirana 20 min na 40°C i 3600 obrtaja/min, nakon čega se izdvajao supernatant i dobila denukleirana frakcija (citosol). U citosolu su određivani proteini i enzimi: CAT, SOD, GSH-Px, GR i GST.

Uzorci tkivnog homogenata su do analiziranja čuvani na -70°C .

3.4.4. Određivanje parametara jetrene funkcije

Katalitička koncentracija aspartat aminotransferaze (AST) u serumu životinja je merena metodom IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). U reakciji transaminacije, između L-Aspartata i 2-ketoglutarata nastaje

oksalacetat. Oksalacetat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane malat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji AST.

Katalitička koncentracija alanin aminotransferaze (ALT) u serumu životinja je merena metodom IFCC. U reakciji transaminacije, između L-Alanina i 2-oksoglutarata nastaje piruvat. Piruvat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane laktat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji ALT (100).

3.4.5. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa u homogenatima tkiva

3.4.5.1. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Princip metode:

Spektrofotometrijsko određivanje proizvoda lipidne peroksidacije i tiobarbiturne kiseline (TBA) u kiseljoj sredini na 535 nm (139, 140).

Reagensi:

- 0.6% tiobarbiturna kiselina
- 1% fosforna kiselina
- 2-butanol

Reakciona smeša:

Smeša od 0.50 ml grubog homogenata tkiva, 1 ml 0.6% tiobarbiturne kiseline i 3 ml fosforne kiseline se izmeša na vortexu i zagreva na vodenom kupatilu 45 minuta na 90°C. Nakon zagrevanja epruvete se ohlade do sobne temperature i vrši ekstrakcija pomoću 3 ml 2-butanola uz mućkanje. Centrifugiranje se vrši na 3000 obrtaja /min u toku 5 minuta.

Koncentracija TBARS se određuje iz organskog sloja spektrofotometrijski na 535 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent je $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Izračunavanje:

$$C_{\text{TBARS}} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{asp}}) * V_{\text{rs}} * 10}{1.56 * V_{\text{uz}} * C_{\text{pr}}} \quad (\text{nmol/mg proteina})$$

ΔA_{asp} - srednja vrednost apsorbanije slepe probe

ΔA_{uz} - srednja vrednost apsorbanije uzorka

Cpr - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml]

Vrs - zapremina reakcione smeše [ml]

Vuz – zapremina uzorka [ml]

3.4.5.2. Određivanje pokazatelja antioksidativne zaštite

3.4.5.2.1. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Princip metode:

Vodonik peroksid pokazuje maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost katalaze se određuje praćenjem razlaganja H₂O₂ na datoj talasnoj dužini, pri čemu je pad apsorbcije proporcionalan aktivnosti katalaze (141).

Reagensi:

- 0.05 M fosfatni pufer pH=7.0
- 30 % H₂O₂

Pufer se podesi sa H₂O₂ tako da apsorbcija slepe probe na 240 nm bude 0.525-0.550.

Reakciona smeša:

U 1.5 ml podešenog rastvora H₂O₂ u fosfatnom puferu doda se uzorak (10-20 µl). Reakcija započinje dodavanjem uzorka. Pad apsorbcije se prati na 240 nm, u toku tri minuta na temperaturi od 25 0C.

Izračunavanje:

Aktivnost CAT se izražava u jedinicama aktivnosti na mg proteina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) * 1000 * V_{\text{rs}}}{43.6 * C_{\text{pr}} * V_{\text{uz}}} \quad (\text{U/mg proteina})$$

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbcije slepe probe

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbcije uzorka u minuti

Cpr - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml]

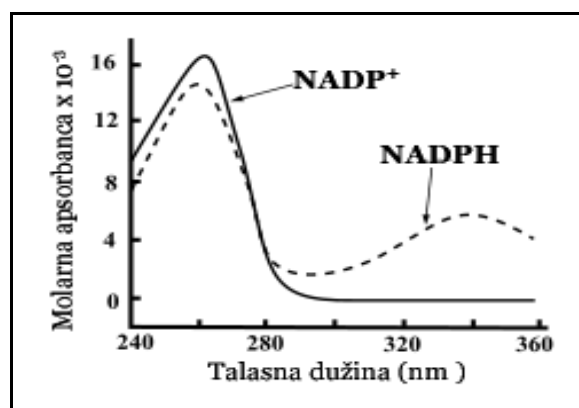
Vrs - zapremina reakcione smeše [ml]

Vuz – zapremina uzorka [ml]

3.4.5.2.2. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px)

Princip metode:

Glutation peroksidaza katališe redukciju organskog peroksida uz nastajanje oksidovanog glutationa, GSSG. GSSG se ponovo redukuje do GSH uz NADPH (kao donora redukcionih ekvivalenata), a reakciju katališe enzim glutation reduktaza (GR). Aktivnost GSH-Px se prati spektrofotometrijski, posredno, praćenjem pada apsorbanca na 340 nm koja potiče od NADPH (Slika 28) (142).



Slika 28. Apsorpcioni spektri NADP⁺ i NADPH (100).

Reagensi:

- 1M TRIS-HCl, 5mM EDTA; pH=8
- 0.1M GSH
- 2 mM NADPH
- 250 IU/mL GR
- 7mM t-butilhidroperoksid

Reakciona smeša:

	Slepa proba	Sistem
TRIS-HCl, EDTA	100 µL	100 µL
GSH, 0.1M	20 µL	20 µL
GR 10IU/mL	100 µL	100 µL
NADPH, 2 mM	100 µL	100 µL
Uzorak:citosol=1:20 (hemolizat)	10 µL	10 µL
Dest. H ₂ O	670 µL	660 µL
Inkubirati na 37°C 10 minuta		
t-Butilhidroperoksid	/	10 µL

Izračunavanje:

Aktivnost GSH-Px se može izraziti kao broj nmol NADPH oksidovanih po minuti po mg proteina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{asp}}) * 1000 * V_{\text{rs}}}{6.22 * C_{\text{pr}} * V_{\text{uz}}} \quad (\text{nmol NADPH/min/mg protein})$$

ΔA_{asp} - srednja promena apsorbance slepe probe

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml]

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml]

V_{uz} – zapremina uzorka [ml]

3.4.5.2.3. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GSH-R)

Princip metode:

Glutation reduktaza katališe redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) uz NADPH kao donora redukcionih ekvivalenata. Aktivnost GSH-R se određuje spektrofotometrijski, posredno, preko brzine oksidacije NADPH, čiji je maksimum apsorbancije meri na 340 nm (Slika 23) (142).

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni status i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

Reagensi:

- 1M TRIS-HCl, 5mM EDTA; pH=8
- 0.033 M GSSG
- 2 mM NADPH

Izračunavanje:

Aktivnost GSH-R se izražava u specifičnim jedinicama aktivnosti na mg proteina. Specifična jedinica aktivnosti je definisana kao broj nmol NADPH oksidovanih u minuti po mg proteina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) * 1000 * V_{rs}}{6.22 * C_{pr} * V_{uz}} \quad (\text{nmol NADPH/min/mg protein})$$

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]

Reakciona smeša:

	Slepa proba	Sistem
TRIS-HCl, EDTA	50 μ L	50 μ L
Uzorak	10 μ L	10 μ L
Dest. H ₂ O	890 μ L	790 μ L
FAD	/	/
Inkubirati na 37°C 10 minuta		
GSSG	/	100 μ L
Inkubirati na 37°C 10 minuta		
NADPH	50 μ L	50 μ L

3.4.5.2.3. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GSH-ST)

Princip metode:

Glutation-S-transferaza katalizuje reakciju 1-hlorodinitrobenzena (CDNB) sa –SH grupom glutationa. Konjugat CDNB-glutation, apsorbuje na 340 nm, pa se aktivnost enzima meri promenom optičke gustine na datoj talasnoj dužini (142).

Reagensi:

- 0.5M fosfatni pufer pH=6.5
- 25mM CDNB u 95% etanolu
- 20mM GSH

Reakciona smeša:

	Slepa proba	Sistem
Fosfatni puffer	200 µL	200 µL
CDNB	20 µL	20 µL
Dest. H ₂ O	730 µL	680 µL
Inkubirati na 37°C 10 minuta		
GSH	50 µL	50 µL
Promešati		
Uzorak	/	50 µL

Izračunavanje:

Aktivnost GSH-ST se izražava u specifičnim jedinicama aktivnosti na mg proteina [nmol/min/mg proteina].

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) * V_{rs} * 1000}{9.6 * V_{uz} * C_{pr}} \text{ (nmol konjugata /min /mg proteina)}$$

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml]

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml]

V_{uz} – zapremina uzorka [ml]

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka vršena je statističkim programom SPSS 16.0, dok su grafici kreirani pomoću programa Microsoft Office Excel 2007. Podaci su predstavljeni tekstualno, tabelarno i grafički.

Prvi korak u analizi podataka bila je primena deskriptivnih statističkih metoda, od kojih su u radu korišćene mere centralne tendencije i mere varijabiliteta. Od mera centralne tendencije izračunate su aritmetička sredina, minimum, maksimum i raspon vrednosti. Od mera varijabiliteta su korišćena izračunavanja standardne devijacije i varijanse. Zbog malog broja podataka, odnosno malog uzorka od po 4 do 5 životinja u svakoj grupi, izražena je varijabilnost podataka, te je uzorak tretiran kao heterogen. U ovakvom uzorku medijana može biti bolji pokazatelj srednje vrednosti uzorka od aritmetičke sredine, te je uvrštena u deskriptivne pokazatelje prikazane u rezultatima.

U statističkoj obradi podataka, korišćeni su neparametrijski testovi za testiranje statističkih hipoteza, jer nisu bili ispunjeni uslovi za primenu parametrijskih testova (poznata varijansa osnovnog skupa podataka i uzorci moraju biti veći od 30 jedinica, ukoliko osnovni skup nema normalnu raspodelu). Primenjeni su *Mann-Whitney U* test (MW) i *Kolmogorov-Smirnov Z (KS)* test za poređenja dve grupe nezavisnih podataka, a *Kruskal-Wallis* test za poređenje više od dve grupe nezavisnih podataka. Zbog specifičnosti ispitivanja kod parametara koji se mere pre i posle terapije (telesna masa i šećer u krvi), korišćeni su testovi za ispitivanje zavisnih uzoraka - *Wilcoxon signed Z* test za poređenje dve grupe zavisnih podataka, dok su *Friedman* i *Kendalls W* test korišćeni za poređenje više od dve grupe zavisnih podataka. U slučaju postojanja statističke značajnosti, sa posmatranim nivoom značajnosti od $p < 0.05$, navedene su vrednosti samog testa (oznake F, MW i KS), stepeni slobode (n), kao i dobijeni nivo značajnosti (p).

Povezanost određenih parametara ispitivana je *Spearman* testom korelacije za neparametrijske proračune. U tekstu su navedene vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije (R), nivo značajnosti (p) i koeficijent determinacije (KD).

4. Rezultati

4.1. Telesna masa

4.1.1. Telesna masa životinja koje nisu tretirane aloksanom

Pre tretmana, prosečna telesna masa životinja bila je najmanja u E-MK grupi, a najviša u K1 i K2 grupi. Takođe, vrednosti varijanse, raspona i standardne devijacije, najveće su u grupama K1 i K2, što govori u prilog većih varijacija telesne mase pojedinačnih životinja u odnosu na prosečnu vrednost (Tabela 5).

Tabela 5. Prosečna vrednost telesne mase životinja pre i posle predviđenog tretmana.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
	TM pre tretmana				
$\bar{x} \pm SD$	325,4±32,98	324,8±33,99	323,0±20,54	319,6±21,28	267,2±11,86 *
Minimum	298	300	290	288	257
Maximum	380	382	340	340	280
Medijana	31	307	330	330	262
Raspon	82	82	50	52	23
Varijansa	1087,80	1155,70	422,00	452,80	140,70
	TM posle tretmana				
$\bar{x} \pm SD$	333,4±32,94 >	332,0±30,69	304,8±18,18 <	310,4±45,09	276,6±16,55 * #
Minimum	305	307	278	264	256
Maximum	385	379	325	384	296
Medijana	317	317	302	303	270
Raspon	80	72	47	120	40
Varijansa	1084,80	942,00	330,70	2033,30	273,80

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupe K1, K2 i EE
< - statistički značajno smanjenje u odnosu na vrednost telesne mase pre tretmana
> - statistički značajno povećanje u odnosu na vrednost telesne mase pre tretmana

Prema *Kruskal-Wallis* testu, između vrednosti telesne mase životinja pre tretmana postoje statistički značajne razlike (KW=31.160, n= 8, p=0.000). Prema *Mann-Whitney U* i

Kolmogorov-Smirnov testovima značajna je uočena razlika između grupe E-MK i grupa K1, K2 i EE (MW=0.000, p=0.008, KS=1.581, p=0.013).

Posle tretmana, grupa K1 je imala najveću prosečnu telesnu masu, dok je i dalje najmanja bila telesna masa u grupi E-MK. Analizom vrednosti telesne mase životinja nakon tretmana, *Kruskal Wallis* test pokazuje da postoje statistički značajne razlike među grupama (KW=33.658, n= 8, p=0.000). Telesna masa životinja u grupi E-MK je, kao i na početku ogleda, statistički znatno manja u odnosu na telesnu masu životinja grupa K1 i K2 (MW=0.0, p=0.008, KS=1.581, p=0.013), kao i u odnosu na životinje grupe EE (MW=2, p=0.032).

Nakon tretmana, najveća standardna devijacija, raspon i varijansa javljaju se u grupi E-UDK, što govori da u ovoj grupi postoje najveća odstupanja pojedinačnih izmerenih telesnih masa životinja u odnosu na prosečne vrednosti. Ipak, nije uočena statistička značajnost u telesnoj masi posle tretmana ove grupe u odnosu na kontrolnu grupu i grupu EE (Tabela 5).

Poredeći telesnu masu pre i posle tretmana u okviru jedne grupe, *Wilcoxon Signed Rank Z* test dokazuje statistički značajno smanjenje telesne mase životinja izloženih etinilestradiolu u grupi EE (F=-2.032, p=0.042) za razliku od kontrolne grupe K1 gde je dokazan statistički značajan porast telesne mase (F=-2.032, p=0.042). Ovim testom utvrđeno je da promene u telesnoj masi grupa E-UDK i E-MK pre i posle tretmana ne pokazuju statističku značajnost.

4.1.2. Telesna masa životinja sa aloksanskim dijabetesom

Posmatrajući grupe jedinki sa aloksanskim dijabetesom, pre početka tretmana najmanju prosečnu telesnu masu imale su životinje grupe A, dok su najveću prosečnu TM imale životinje grupe AE-MK (Tabela 6). Najveće vrednosti varijanse, raspona i standardne devijacije takođe su prisutne u grupi AE-MK, što govori o velikom odstupanju pojedinih telesnih masa od izračunate aritmetičke sredine te grupe. Poredeći prosečne vrednosti telesne mase pre predviđenog tretmana za grupe jedinki sa aloksanskim dijabetesom, nisu verifikovane statistički značajne razlike.

Tabela 6. Vrednosti telesne mase životinja sa dijabetesom pre i posle predviđenog tretmana.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
	TM pre tretmana			
$\bar{x} \pm SD$	250,6±15,87	268,4±19,91	274,0±10,70	286,6±31,01
Minimum	237	242	262	264
Maximum	276	296	289	341
Medijana	248	265	272	274
Raspon	39	54	27	77
Varijansa	251,80	396,30	114,50	961,30
	TM posle tretmana			
$\bar{x} \pm SD$	246,6±18,53	214,4±16,79 <	242,0±27,35 <	260,8±39,09
Minimum	225	201	208	208
Maximum	271	241	273	294
Medijana	239	209	253	278
Raspon	46	40	65	86
Varijansa	343,30	281,80	748,00	1527,70

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na TM u K1 i K2 posle tretmana
< - statistički značajno smanjenje u odnosu na vrednost telesne mase pre tretmana
> - statistički značajno povećanje u odnosu na vrednost telesne mase pre tretmana

Nakon predviđenog tretmana, postoji statistički značajna razlika u prosečnim telesnim masama oglednih grupa ($F=33.658$, $n=8$, $p=0.000$). *Mann Whitney U* i *Kolmogorov-Smirnov* testovi pokazuju statistički značajno smanjenje telesne mase svih grupa sa aloksanskim dijabetesom u odnosu na grupu K1 i K2 ($MW=0.000$, $p=0.008$, $KS=1.581$, $p=0.013$) posle tretmana.

U svim grupama izloženim dejstvu aloksana, posle tretmana došlo je do smanjenja telesne mase u odnosu na vrednosti pre početka tretmana (Tabela 6). *Wilcoxon Signed Rank Z* test utvrdio je da je vrednost telesne mase na kraju u odnosu na početak tretmana statistički značajno manja u grupama aloksanskih jedinki AE i AE-UDK ($F=-2.032$, $p=0.042$).

4.2. Vrednosti šećera u krvi (ŠUK)

4.2.1. Vrednost šećera u krvi životinja koje nisu tretirane aloksanom

Pre odgovarajućeg tretmana, vrednosti šećera u krvi životinja kontrolnih grupa i životinja tretiranih etinilestradiolom kretale su se od 5,90 mmol/L u grupi E-MK do 6,26 mmol/L u grupi K1 (Tabela 7).

Tabela 7. Prosečna vrednost šećera u krvi pre (ŠUKstart –mmol/L, $\bar{x}\pm SD$) i posle predviđenog tretmana (ŠUKkraj - mmol/L, $\bar{x}\pm SD$).

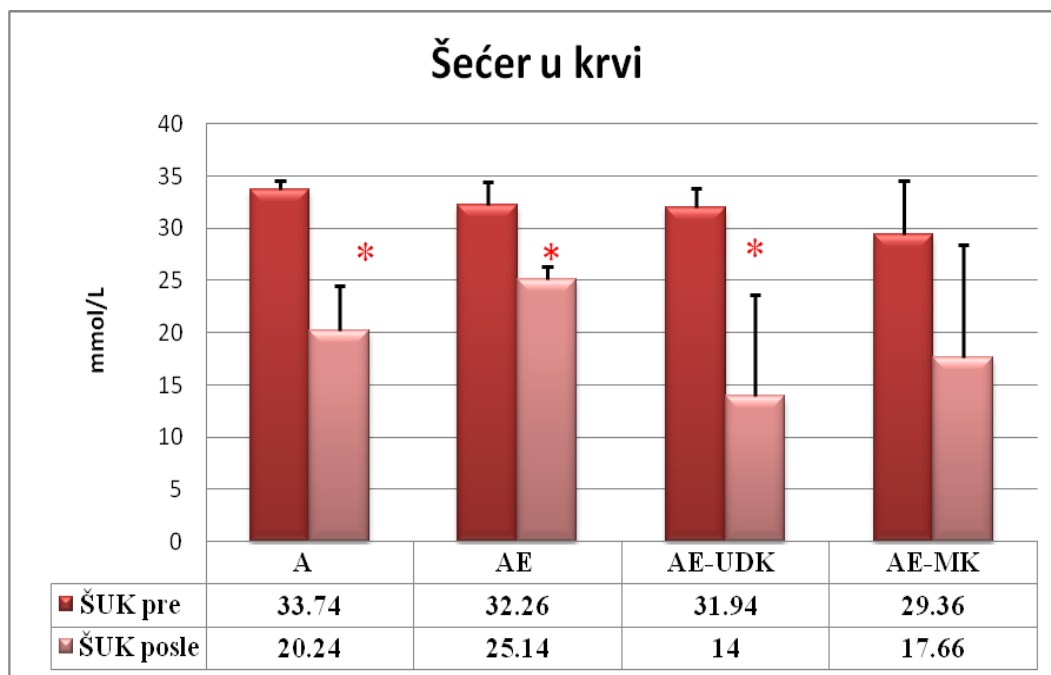
	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
	ŠUK start				
$\bar{x} \pm SD$	6,26±0,23	6,14±0,17	6,16±0,11	6,12±0,13	5,90±0,29
Minimum	6,0	5,9	6,0	6,0	5,5
Maximum	6,5	6,3	6,3	6,3	6,2
Medijana	6,2	6,1	6,2	6,1	6,0
Raspon	0,5	0,4	0,3	0,3	0,7
Varijansa	0,05	0,03	0,01	0,02	0,09
	ŠUK kraj				
$\bar{x} \pm SD$	6,36±0,15	6,36±0,22	6,10±0,20	6,08±0,35	5,80±0,19
Minimum	6,2	6,0	5,9	5,5	5,5
Maximum	6,6	6,5	6,4	6,4	6,0
Medijana	6,3	6,5	6,0	6,1	5,8
Raspon	0,4	0,5	0,5	0,9	0,5
Varijansa	0,02	0,05	0,04	0,12	0,03

Nakon tretmana, najniže izmerene vrednosti bile su takođe u grupi E-MK, a najviše vrednosti od 6,36 mmol/L izmerene su u grupama K1 i K2. Vrednosti varijanse, raspona i standardne devijacije su u svim grupama male (kako pre tako i nakon tretmana), te govore o malom odstupanju pojedinačnih izmerenih vrednosti od izračunate prosečne vrednosti.

Izmerene vrednosti šećera u krvi pre tretmana, kao ni posle tretmana, ne pokazuju statistički značajne razlike.

4.2.2. Vrednost šećera u krvi životinja sa aloksanskim dijabetesom

U svim grupama tretiranim aloksanom izazvan je aloksanski dijabetes, koji je potvrđen vrednostima šećera u krvi životinja od 15 mmol/L i višim (ŠUK pre) (Grafik 1).



Grafik 1. Prosečne vrednosti šećera u krvi (mmol/L, $\bar{x} \pm SD$) pre i posle tretmana, u grupama jedinki sa aloksanskim dijabetesom

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na prosečnu vrednost ŠUK u toj grupi na početku tretmana.

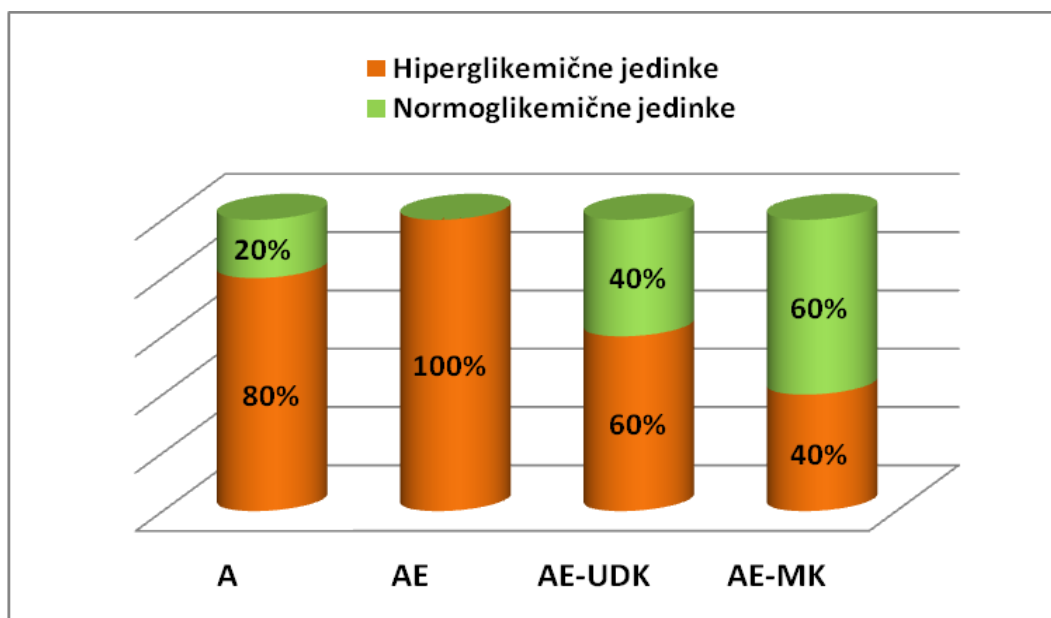
Odgovarajućim testovima, nisu utvrđene statistički značajne razlike između prosečnih vrednosti ŠUK pre tretmana među grupama sa aloksanskim dijabetesom.

Prosečna vrednost ŠUK nakon tretmana, samo u jednoj od grupa (AE-UDK) manja je od 15mmol/L. Nešto viša je prosečna vrednost ŠUK u grupi AE-MK, dok je najviša u grupi AE.

U grupama sa najnižim prosečnim vrednostima ŠUK nakon tretmana (AE-UDK i AE-MK), utvrđene su i najviše vrednosti varijanse (94.01 i 117.01), raspona (18.8 i 24.4) i standardne devijacije (9.7 i 10.82).

Prema *Friedman* testu za zavisne uzorke, utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike u vrednosti ŠUK pre i posle tretmana u okviru grupa tretiranih aloksanom ($F=5.000$, $n=1$, $p=0.025$). Daljom analizom, primenom *Wilcoxon Signed Test Z* za par zavisnih uzoraka, vidimo da je statistički značajno smanjenje prosečne vrednosti ŠUK u odnosu na vrednosti na početku tretmana, prisutno u grupama A, AE i AE-UDK ($Z=-2.023$, $p=0.043$) (Grafik 1).

U grupi AE-UDK je kod najvećeg broja životinja došlo do uspotavljanja normoglikemije (3 od 5 životinja). U nešto manjem broju normoglikemija je uspostavljena i kod jedinki iz AE-MK grupe (2 od 5 životinja) i A grupe (1 od 5 jedinki), dok u grupi AE na kraju tretmana nije bilo jedinki sa glikemijom nižom od 15mmol/L (Grafik 2).



Grafik 2. Zastupljenost normoglikemičnih jedinki na kraju tretmana u grupama izloženim aloksanu.

Kruskal-Wallis test za jednofaktorsku analizu višestrukih uzoraka pokazuje da postoji statistički značajna razlika u broju normoglikemičnih i hiperglikemičnih jedinki između grupa ($KW=41.671$, $n= 8$, $p=0.000$).

4.3. Parametri jetrene funkcije

4.3.1. Parametri jetrene funkcije kod životinja koje nisu tretirane aloksanom

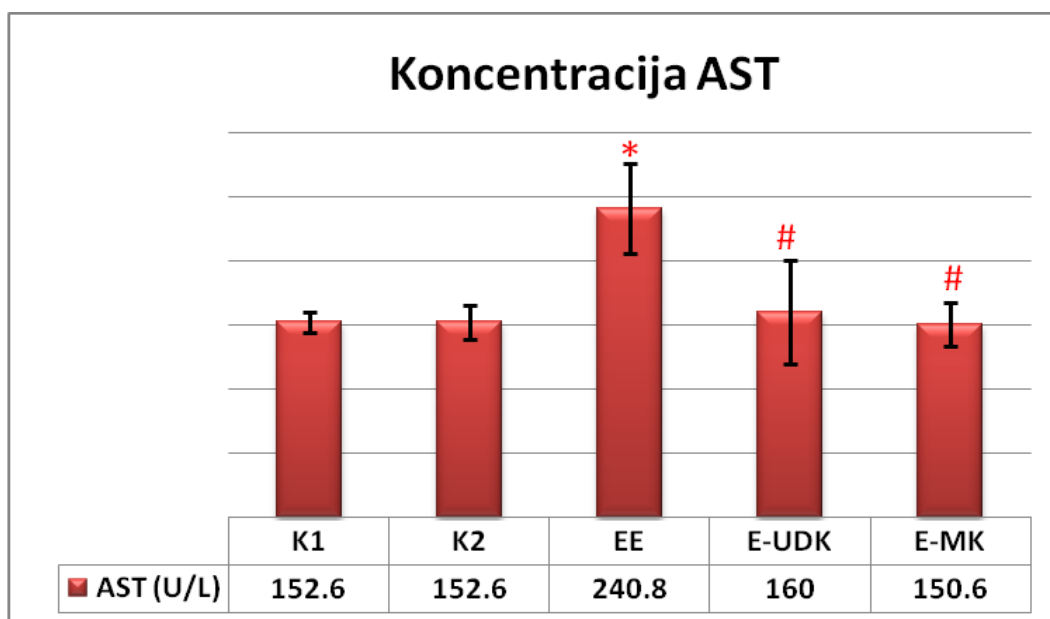
4.3.1.1. Koncentracija AST

Vrednosti raspona, varijanse i standardne devijacije za koncentraciju AST, najviše su u grupama E-UDK i EE, što govori u prilog heterogenosti podataka u tim grupama, tj da pojedini uzorci znatno odstupaju od aritmetičke sredine (Grafik 3, Tabela 8). Medijana, kao deskriptivni parametar koji izuzetno dobro reprezentuje uzorak u heterogenim grupama sa malim brojem slučajeva, poput posmatranih grupa, pokazuje najviše vrednosti u grupi EE, a najniže u grupi E-UDK (Tabela 8).

Tabela 8. Deskriptivni pokazatelji koncentracije AST.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
Minimum	140	133	189	117	125
Maximum	160	166	275	207	167
Medijana	153	155	257	143	148
Raspon	20	33	86	90	42
Varijansa	64,30	172,30	1219,20	1636,00	295,30

Prosečne vrednosti koncentracije AST najniže su u grupama K1 i K2. Najvišu vrednost ima grupa EE, dok su prosečne koncentracije u grupama tretiranim žučnim kiselinama, nešto više od vrednosti kontrolnih grupa, ali upadljivo niže od vrednosti u EE grupi (Grafik 3). *Kruskal-Wallis* testom za jednofaktorsku analizu višestrukih uzoraka, potvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika u vrednostima AST (KW=25.172; n=8; p=0.001). *Kruskal-Wallis* testom za jednofaktorsku analizu višestrukih uzoraka, potvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika u vrednostima AST (KW=25.172; n=8; p=0.001).



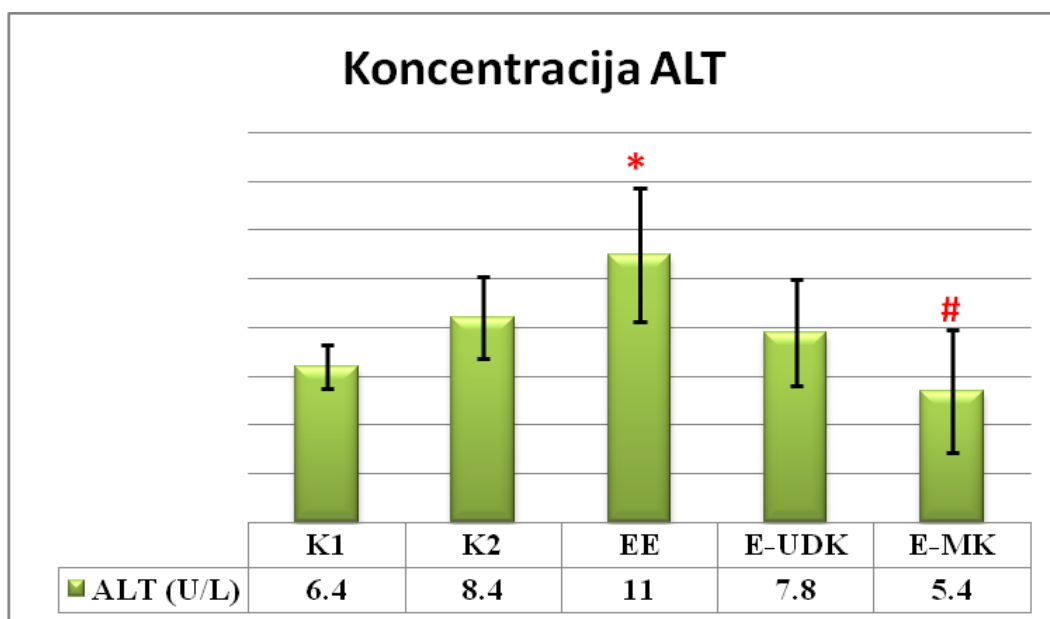
Grafik 3. Koncentracija AST ($\bar{x} \pm SD$).

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na K1 i K2
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu EE

Odgovarajućim testovima utvrđeno je da su vrednosti AST u grupi EE statistički značajno više u odnosu na vrednosti u grupama K1 i K2 (MW=0, p=0.008, KS=1.581, p=0.013). U odnosu na grupu EE, vrednosti AST su statistički značajno niže u grupama E-UDK (MW=2, p=0.032), i E-MK (MW=0, p=0.008; KS=1.581, p=0.013). Važno je napomenuti da primenjeni testovi nisu utvrdili statističku značajnost razlika vrednosti AST između kontrolnih grupa i grupa tretiranih žučnim kiselinama.

4.3.1.2. Koncentracija ALT

Vrednosti raspona, varijanse i standardne devijacije za koncentraciju ALT, najviše su u grupi EE (Grafik 4, Tabela 9). Medijana takođe pokazuje najviše vrednosti u grupi EE, a najniže u grupi K1 (Tabela 9). Razlike u koncentraciji ALT između posmatranih grupa pokazuju statističku značajnost (KW=34.141; n=8; p=0.000). Najviša prosečna vrednost koncentracije ALT zabeležena u grupi EE je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu K1 (MW=0, p=0.008, KS=1.581, p=0.013). Prosečna koncentracija ALT najniža je u grupi E-MK, i to statistički značajno niža u odnosu na grupu EE (MW=1.5; p=0.016) (Grafik 4).



Grafik 4. Koncentracija ALT ($\bar{x} \pm SD$).

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na K1

- statistički značajna razlika u odnosu na grupu EE

Primenjenim testovima, utvrdilo se da nema statistički značajnih razlika u koncentraciji ALT u grupama tretiranim žučnim kiselinama (E-MK i E-UDK) u odnosu na kontrolnu grupu (K1).

Tabela 9. Deskriptivni pokazatelji koncentracije ALT.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
Minimum	5,0	7,0	8,0	6,0	3,0
Maximum	7,0	11,0	15,0	11,0	9,0
Medijana	7,0	8,0	11,0	7,0	4,0
Raspon	2	4	7	5	6
Varijansa	0,8	2,8	7,5	4,7	6,3

4.3.1.3. Koncentracija γ -GT

Koncentracija enzima γ -glutamil transaminaze u jetri bila je najviša u grupi tretiranoj samo etinilestradiolom i etinilestradiolom i monoketoholnom kiselinom (Tabela 10). U grupi E-MK istovremeno su izračunate i najviše vrednosti raspona, varijanse i standardne devijacije, ukazujući na varijacije u pojedinačnim vrednostima. γ -GT je u najnižoj koncentraciji prisutna u grupama K1, zatim K2 i E-UDK.

Tabela 10. Koncentracija γ -GT (U/L, $\bar{x} \pm SD$).

γ -GT (U/L)	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
$\bar{x} \pm SD$	1,40 \pm 0,55	1,40 \pm 0,55	2,00 \pm 0,00	1,42 \pm 0,60 #	2,00 \pm 0,71
Minimum	1	1	2	1	1
Maximum	2	2	2	2	3
Medijana	1	1	2	1	2
Raspon	1	1	0	1	2
Varijansa	0,3	0,3	0,0	0,3	0,5

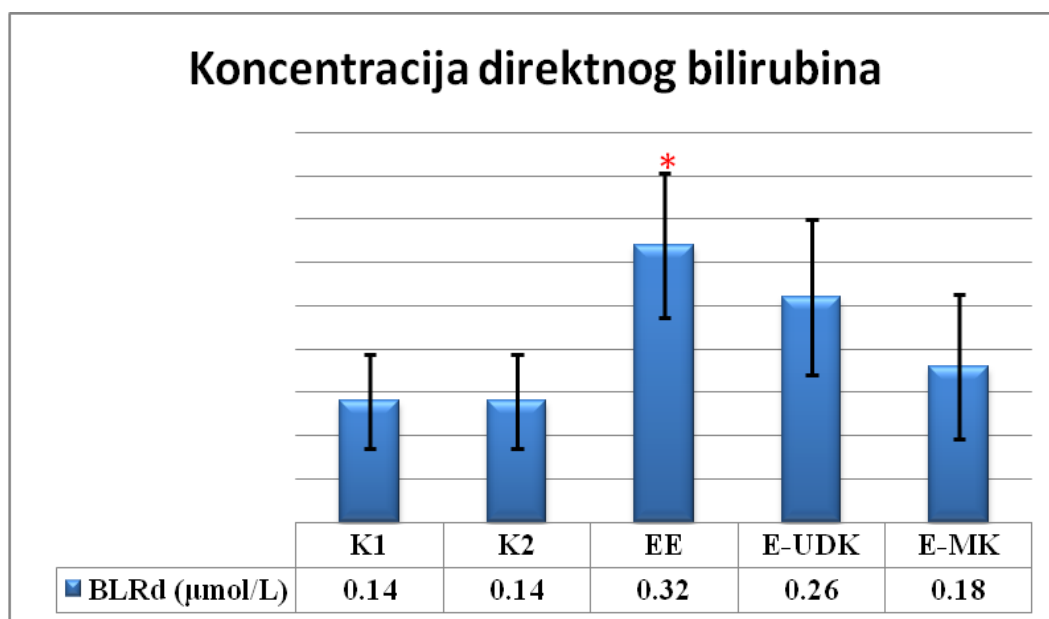
Legenda: # - statistički značajna razlika u odnosu na grupu EE

Statističkim testovima utvrđeno je da postoje značajne razlike u vrednosti γ -GT u ispitivanom uzorku (KW=15.827, n=8, p=0.045). Vrednosti γ -GT u E-UDK grupi su značajno niže nego u EE grupi (MW=0, p=0.008, KS=1.581, p=0.013), a ne razlikuje se značajno od nivoa γ GT u kontrolnoj grupi životinja.

4.3.1.4. Koncentracija direktnog bilirubina

Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih jedinki, bila je najviša u grupi tretiranoj samo etinilestradiolom (EE), a najniža u kontrolnim grupama K1 i K2 (Grafik 5).

Primenom *Kruskal-Wallis* testa ustanovljeno je da postoje statistički značajne razlike (F=27.06, n=8, p=0.001). Vrednosti direktnog bilirubina u grupi EE su statistički značajno više od vrednosti u kontrolnoj grupi K1 (MW=1.00, p=0.016). Prosečne vrednosti koncentracije direktnog bilirubina u grupama E-UDK i E-MK se statistički ne razlikuju od vrednosti u kontrolnoj grupi.



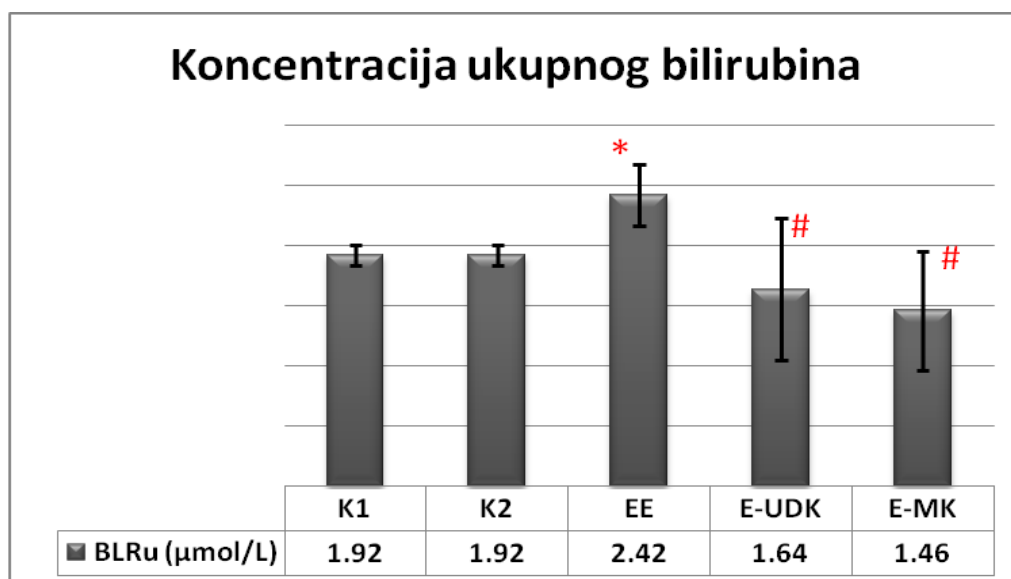
Grafik 5. Koncentracija direktnog bilirubina (BLRd, $\bar{x} \pm SD$).

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1

4.3.1.5. Koncentracija ukupnog bilirubina

Koncentracija ukupnog bilirubina u serumu ispitivanih jedinki, bila je najviša u grupi tretiranoj samo etinilestradiolom (EE), a najniža u grupi kojoj je aplikovana monoketoholna kiselina (E-MK). Grupa E-UDK imala je prosečnu koncentraciju ukupnog bilirubina višu od grupe E-MK, ali nižu od kontrolne grupe (Grafik 6).

Primenom *Kruskal-Wallis* testa ustanovljeno je da postoje statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnog bilirubina među posmatranim grupama ($F=29.628$, $n=8$, $p=0.000$). Prosečna koncentracija ukupnog bilirubina u grupi EE je statistički značajno viša od vrednosti u kontrolnoj grupi K1 i grupi K2 ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$). U odnosu na grupu tretiranu samo etinilestradiolom, grupe koje su imale kotretman žučnim kiselinama imale su statistički značajno niže vrednosti ukupnog bilirubina (E-MK: $MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$; E-UDK: $MW=1.000$, $p=0.016$). Nisu utvrđene razlike između grupa E-MK i E-UDK u poređenju sa kontrolnom grupom.



Grafik 6. Koncentracija ukupnog bilirubina (BLRu, $\bar{x} \pm SD$).

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1

- statistički značajna razlika u odnosu na grupu EE

4.3.2. Parametri jetrene funkcije životinja sa aloksanskim dijabetesom

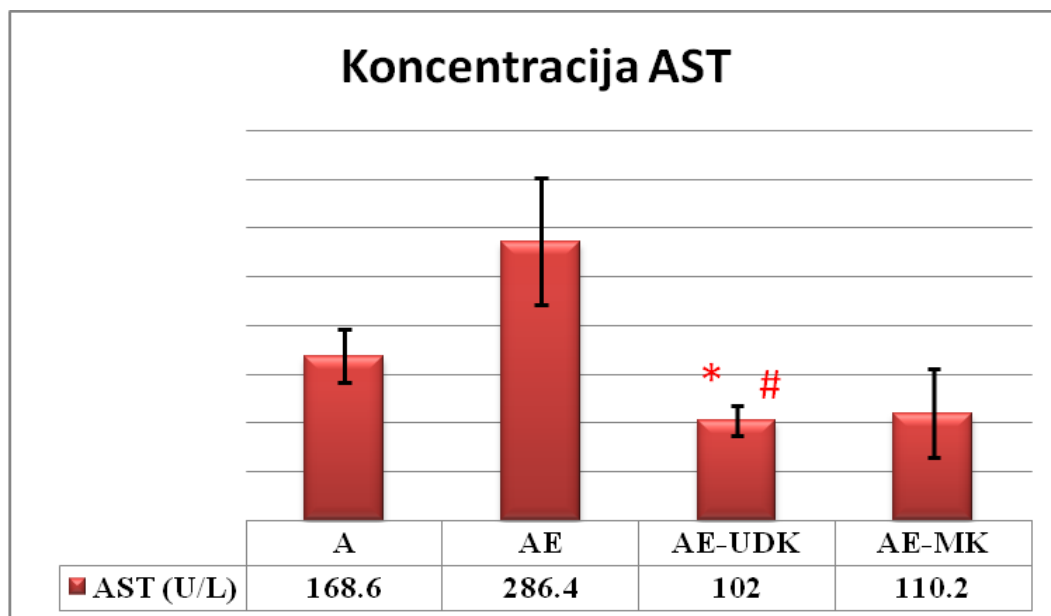
4.3.2.1. Koncentracija AST

Vrednosti raspona, varijanse i standardne devijacije za koncentraciju AST, najviše su u grupi AE, što govori o značajnim varijacijama pojedinih vrednosti (Grafik 7, Tabela 11). Medijana, kao parametar koji verno reprezentuje uzorak u heterogenim grupama poput posmatranih, pokazuje najviše vrednosti takođe u grupi AE, a najniže u grupi AE-MK (81.0) i AE-UDK (92.0) (Tabela 11).

Tabela 11. Deskriptivni pokazatelji koncentracije AST.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
Minimum	148	151	90	81
Maximum	217	759	120	189
Medijana	159	164	92	89
Raspon	69	608	30	108
Varijansa	759,30	70198,30	242,00	2050,00

Prosečne vrednosti koncentracije AST najniže su u grupama gde su jedinke tretirane žučnim kiselinama (AE-MK i AE-UDK). Najvišu vrednost koncentracija AST ima u grupi AE, (Grafik 7).



Grafik 7. Koncentracija AST ($\bar{x} \pm SD$).

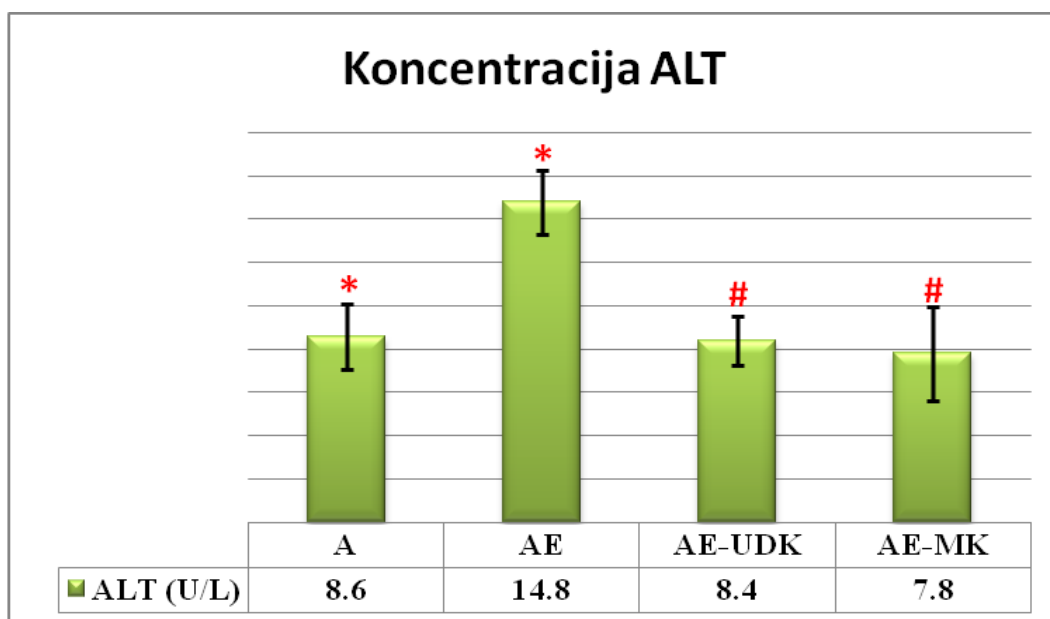
Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu A
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE

Mann-Whitney i *Kolmogorov-Smirnov* testovi pokazali su da su vrednosti AST u grupi AE-UDK statistički značajno niže u odnosu na vrednosti u grupama A i AE (MW=0, $p=0.008$; KS=1.581, $p=0.013$). Iako evidentno, sniženje vrednosti AST u grupi AE-MK ne pokazuju statisticku značajnost u odnosu na AE grupu. Nije utvrđena ni statistički značajna razlika vrednosti AST u grupama AE-MK i AE-UDK u odnosu na kontrolnu grupu K1.

4.3.2.2. Koncentracija ALT

Vrednosti raspona, varijanse i standardne devijacije za koncentraciju ALT, najviše su u grupi AE-MK (Grafik 8, Tabela 12). Prosečne vrednosti koncentracije ALT najniže su u grupi AE-UDK, iako je medijama najniža u grupi AE-MK. Najvišu vrednost koncentracija ALT izmerena je u grupi AE (Grafik 8).

Kruskal-Wallis testom za jednofaktorsku analizu višestrukih uzoraka, potvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika u vrednostima ALT (KW=25.301; $n=8$; $p=0.000$).



Grafik 8. Koncentracija ALT ($\bar{x} \pm SD$).

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu A
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE

Mann-Whitney U i *Kolmogorov-Smirnov* testovi utvrdili su da je vrednost ALT u grupama A i AE statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu K1 (A grupa: MW=1.500, p=0.016; AE grupa: MW=0.000, p=0.008, KS=1.581, p=0.013). Poređenjem prosečnih vrednosti ALT enzima, dokazano je da je ALT značajno viši u grupi AE u odnosu na grupu A (MW=0.000, p=0.008, KS=1.581, p=0.013). Vrednosti ALT u grupama tretiranim žučnim kiselinama značajno su niže od nivoa ALT jedinki tretiranih aloksanom i etinilestradiolom (AE) (MW=0.000, p=0.008, KS=1.581, p=0.013).

Tabela 12. Deskriptivni pokazatelji koncentracije ALT.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
Minimum	7	13	7	6
Maximum	11	17	10	11
Medijana	8	15	8	7
Raspon	4	4	3	5
Varijansa	2,30	2,20	1,30	4,70

4.3.2.3. Koncentracija γ -GT

Analizom prosečnih vrednosti koncentracije enzima γ -glutamil transaminaze u ispitivanom uzorku, ustanovljeno je da su postojeće razlike statistički značajne (KW=15.827, n=8, p=0.045).

U odnosu na grupu AE, do statistički značajnog pada koncentracije enzima γ -GT, došlo je samo kod jedinki tretiranih ursodeoksiholnom kiselinom (MW=1.500, p=0.016) (Tabela 13).

Tabela 13. Koncentracija γ -GT (U/L, $\bar{x} \pm SD$).

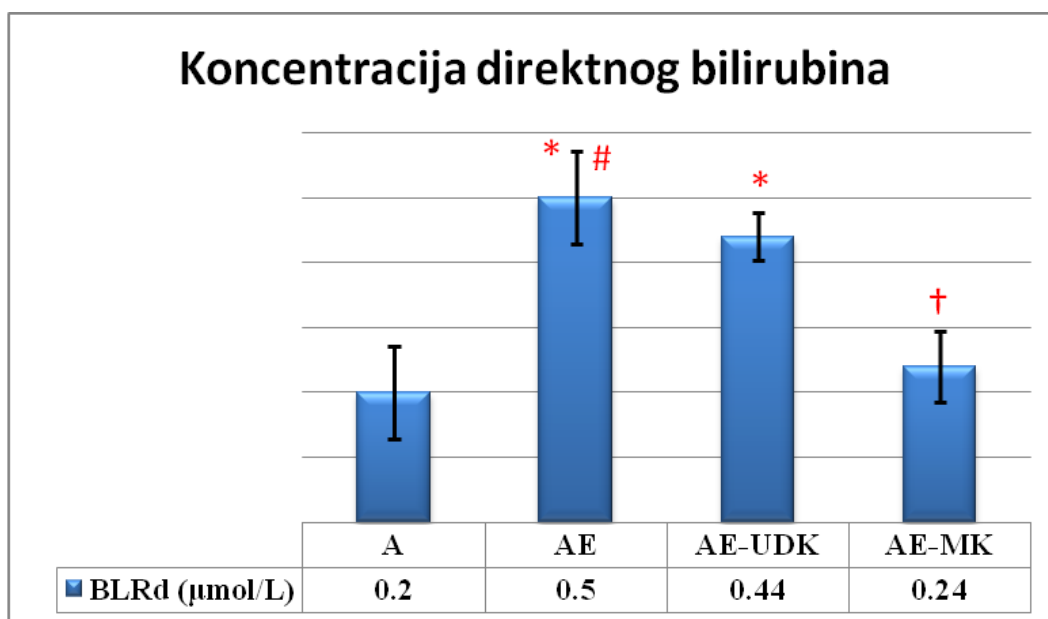
γ -GT (U/L)	A	AE	AE-UDK	AE-MK
$\bar{x} \pm SD$	1,60 \pm 0,894	2,40 \pm 0,548	1,20 \pm 0,447 #	1,40 \pm 0,548
Minimum	0	2	1	1
Maximum	2	3	2	2
Medijana	2	2	1	1
Raspon	2	1	1	1
Varijansa	0,80	0,30	0,20	0,30

Legenda: # - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE

4.3.2.4. Koncentracija direktnog bilirubina

Analizom prosečnih vrednosti koncentracije direktnog bilirubina u krvi životinja sa aloksanskim dijabetesom, da se primetiti da su najviše vrednosti prisutne kod jedinki tretiranih etinilestradiolom (AE). Od pomenutih vrednosti neznatno je niža koncentraciju u grupi AE-UDK, dok su najniže vrednosti izmereneu grupi A (Grafik 9).

Utvrđeno je da je koncentracija direktnog bilirubina u AE grupi statistički značajno viša u poređenju sa grupom K1 i A (MW=0.00, p=0.008; KS=1.581, p=0.013).



Grafik 9. Koncentracija direktnog bilirubina (BLRd, $\bar{x} \pm SD$).

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1

- statistički značajna razlika u odnosu na grupu A

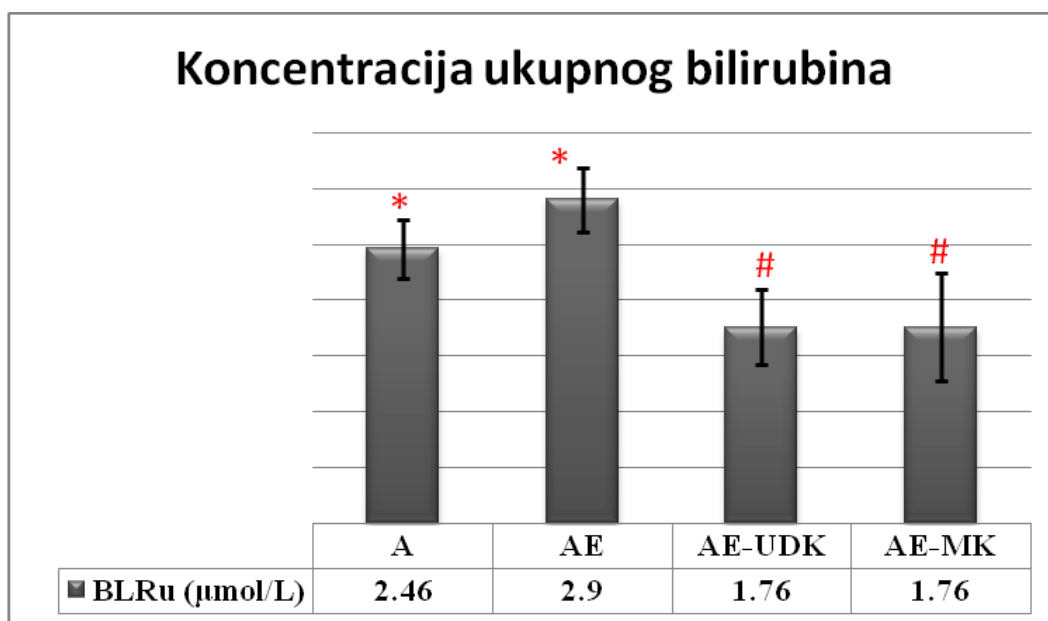
† - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE

Vrednosti u grupi AE-UDK su statistički znatno više od vrednosti koncentracije u kontrolnoj grupi (K1), ali se statistički ne razlikuju od vrednosti u AE grupi. Koncentracija direktnog bilirubina u AE-MK grupi je statistički značajno niža u poređenju sa AE grupom, i ne razlikuje se statistički od kontrolne grupe.

4.3.2.5. Koncentracija ukupnog bilirubina

Koncentracija ukupnog bilirubina u serumu dijabetičnih jedinki, bila je najviša u grupi tretiranoj etinilestradiolom (AE), a najniža u grupama kojima je uz etinilestradiol davana i neka od žučnih kiselina (AE-MK i AE-UDK) (Grafik 10).

Primenom *Kruskal-Wallis* testa ustanovljeno je da postoje statistički značajne razlike ($F=29.628$, $n=8$, $p=0.000$).



Grafik 10. Koncentracija ukupnog bilirubina (BLRu, $\bar{x} \pm SD$).

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE

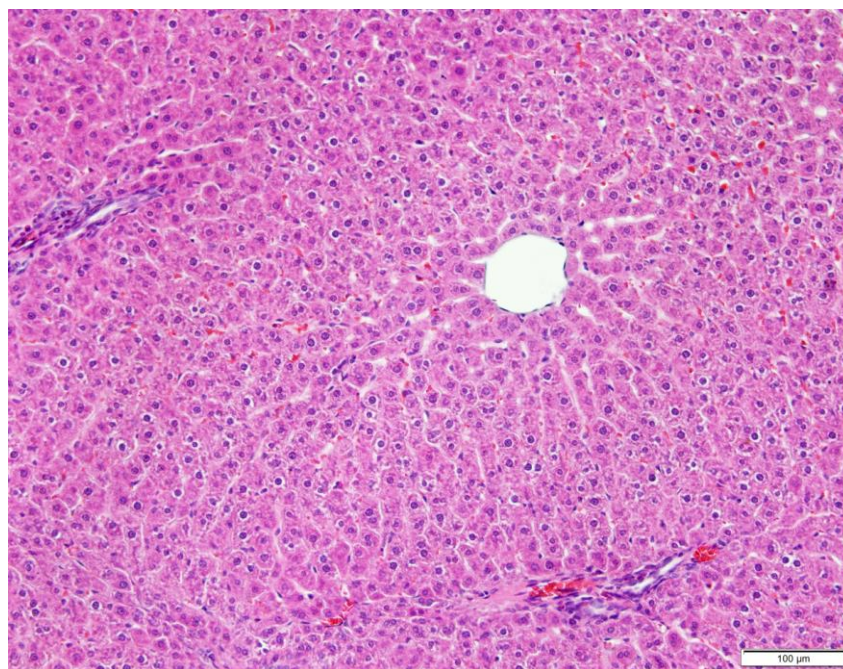
Vrednosti prosečne koncentracije ukupnog bilirubina u grupama A i AE su statistički značajno više od vrednosti u kontrolnoj grupi K1 (MW=0.000, $p=0.008$; KS=1.581, $p=0.013$). U odnosu na grupu dijabetičnih jedinki tretiranih samo etinilestradiolom, grupe koje su imale kotretman žučnim kiselinama imale su statistički značajno niže vrednosti ukupnog bilirubina (grupa AE-MK: MW=2.000, $p=0.0328$; grupa E-UDK: MW=1.000, $p=0.016$), i ne pokazuju statističku različitost u poređenju sa kontrolnom grupom jedinki (K1).

4.4. Kvalitativna histološka analiza tkiva jetre

4.4.1. Kvalitativna histološka analiza tkiva jetre životinja koje nisu tretirane aloksanom

4.4.1.1. Grupa K1 i K2

U pregledanim histološkim rezovima tkiva pacova bojenim HE metodom (Slika 31), nalazi se tkivo jetre, građeno od lobulusa međusobno odvojenih oskudnim vezivnim tkivom. Lobulusi su izgrađeni hepatocita u vidu Remakovih gredica, radijarno raspoređenih u odnosu na centralno postavljenu *v.centralis*. Remakove gredice su međusobno razdvojene sinusoidima. Hepatociti su poligonalnog oblika, centralno ili paracentralno postavljenog krupnog jedra i uočljivog jedarca. Citoplazma je ružičasta, obilna, homogena.

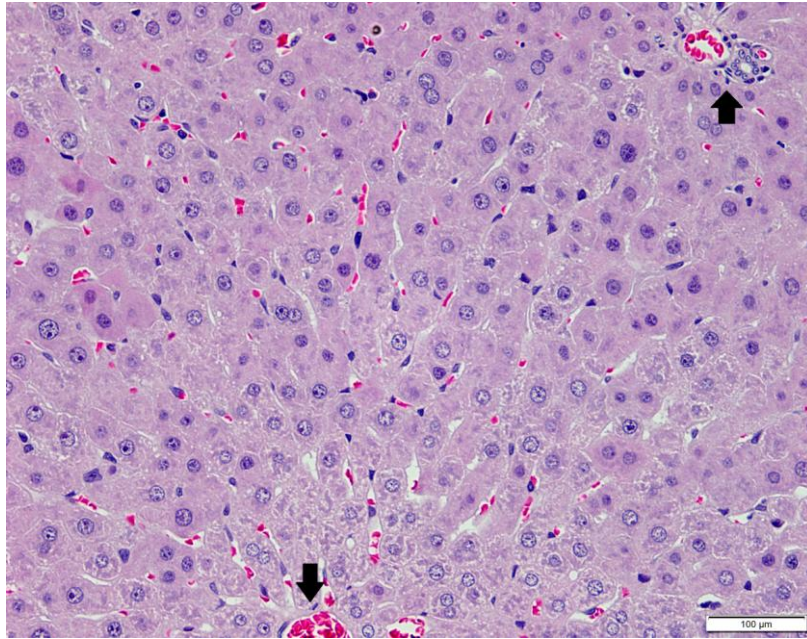


Slika 31. Tkivo jetre (HE, 20x).

Razlika u građi zone 1, 2 i 3 jetrinog acinusa nije uočljiva. Portni prostori su sačinjeni od vezivnog tkiva u kome se raspoznaju klasični elementi portne trijade: interlobularna arterija i vena, kao i jedan ili više žučnih duktusa, uobičajenih histoloških karakteristika. Retikulinska potka je očuvana, a u hepatocitima su prisutne uobičajene količine PAS-pozitivnih granula.

4.4.1.3. Grupa EE

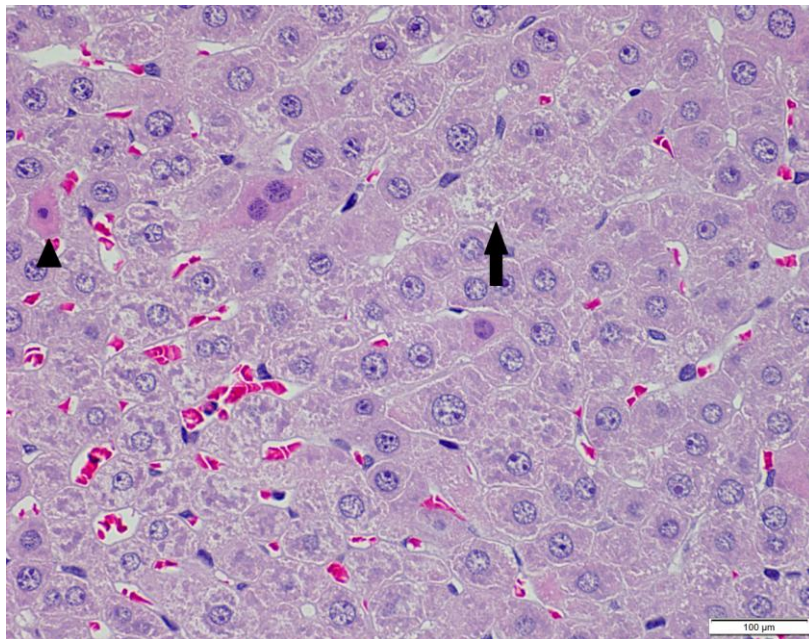
U tkivu jetre životinja tretiranih etinilestradiolom uočava se jasna lobularna građa tkiva jetre, sa centralno postavljenom centralnom venom. Hepatociti imaju trabekularni raspored u vidu ploča, zrakasto raspoređenih u odnosu na centralnu venu sa sinusoidalnim kapilarima između njih (Slika 32).



Slika 32. Tkivo jetre pacova tretiranih etinilestradiolom (HE, 40x).

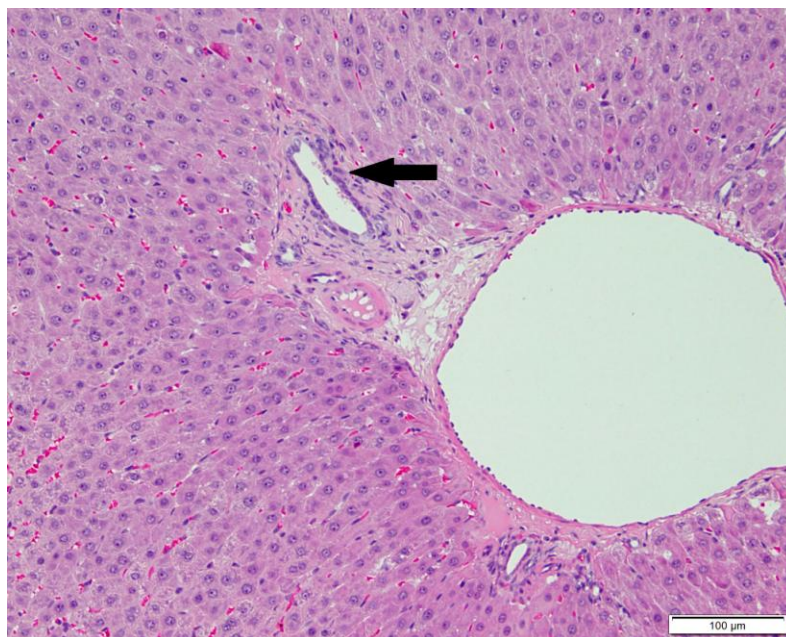
Legenda: ↑ - portni prostor sa portnom trijadom; ↓ - centralna vena.

Hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra. Fokalno se uočavaju manje grupe nešto većih hepatocita okruglastog do ovalnog oblika, obilne, svetle citoplazme homogene do paperjastog izgleda, i pojedinačni hepatociti acidofilne citoplazme i sitnijeg, tamnijeg jedra (Slika 33). Navedene promene bi mogle odgovarati paperjastoj degeneraciji hepatocita, tipičnoj za holestazu. Ovakvi hepatociti nisu dominantno prisutni u nekoj određenoj zoni acinusa, već pokazuju difuzni raspored.



Slika 33. Tkivo jetre pacova tretiranih etinilestradiolom (HE, 60x).

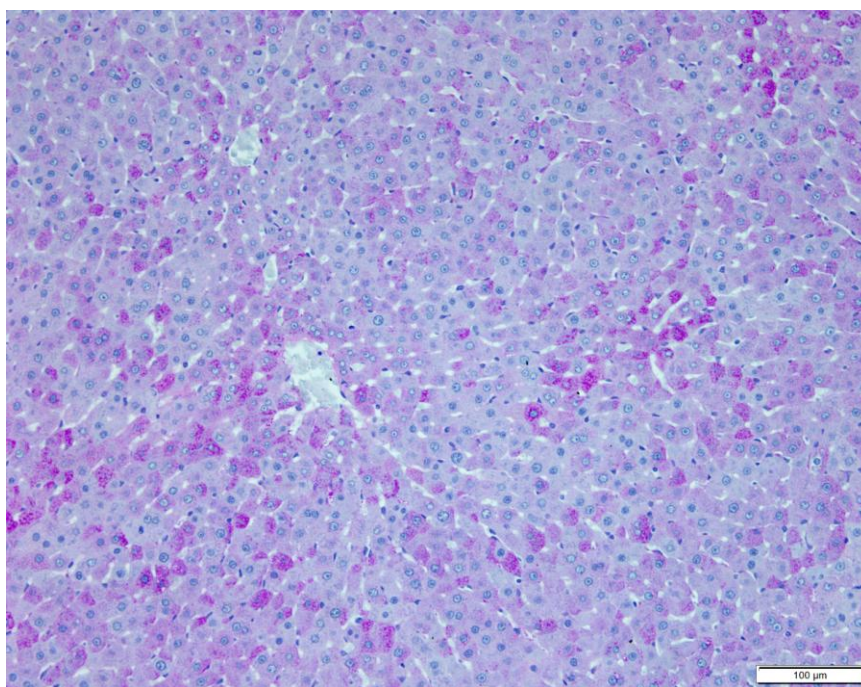
Legenda: ▲ - acidofilija citoplazme i kariopiknoza; ↑ - paperjasta degeneracija



Slika 34. Tkivo jetre pacova tretiranih etinilestradiolom (HE, 10x).

Legenda: ← - bilijarni duktus praznog lumena.

Elementi portne trijade su uobičajenih histoloških karakteristika. U žučnim duktusima (Slika 34) i manjim žučnim putevima (Slika 32) se ne uočava nakupljanje pigmenta. Inflamatorni infiltrat nije uočen. Na periferiji lobulusa prisutno je oskudno vezivno tkivo, nešto obilnije u predelu portnog prostora. Bojenjem na retikulin i po *Mallory* metodi, ne uočava se proliferacija vezivnog tkiva koja odstupa od građe jetre kontrolne grupe.



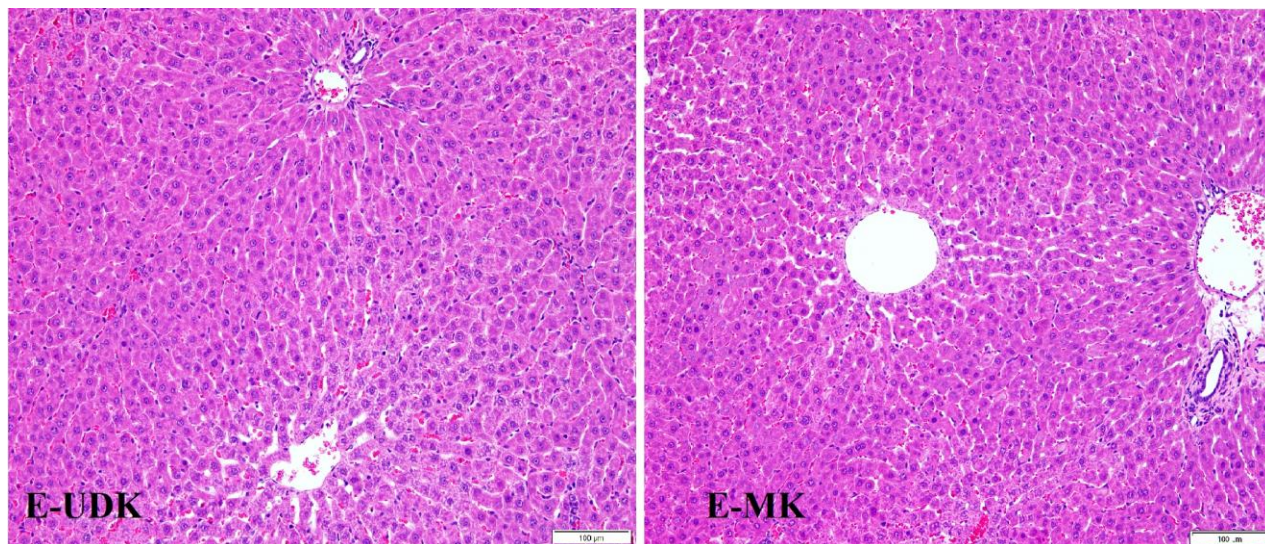
Slika 35. Tkivo jetre pacova tretiranih etinilestradiolom (PAS/AB, 20x).

Bojenje metodom PAS/AB (Slika 35) prikazuje hepatocite sa intracitoplazmatskim, difuzno raspoređenim PAS pozitivnim granulama crvene boje. Stiče se utisak da je u odnosu na kontrolnu grupu, smanjen broj PAS-pozitivnih hepatocita, a da im je distribucija po zonama acinusa uniformna.

4.4.1.4. Grupe E-UDK i E-MK

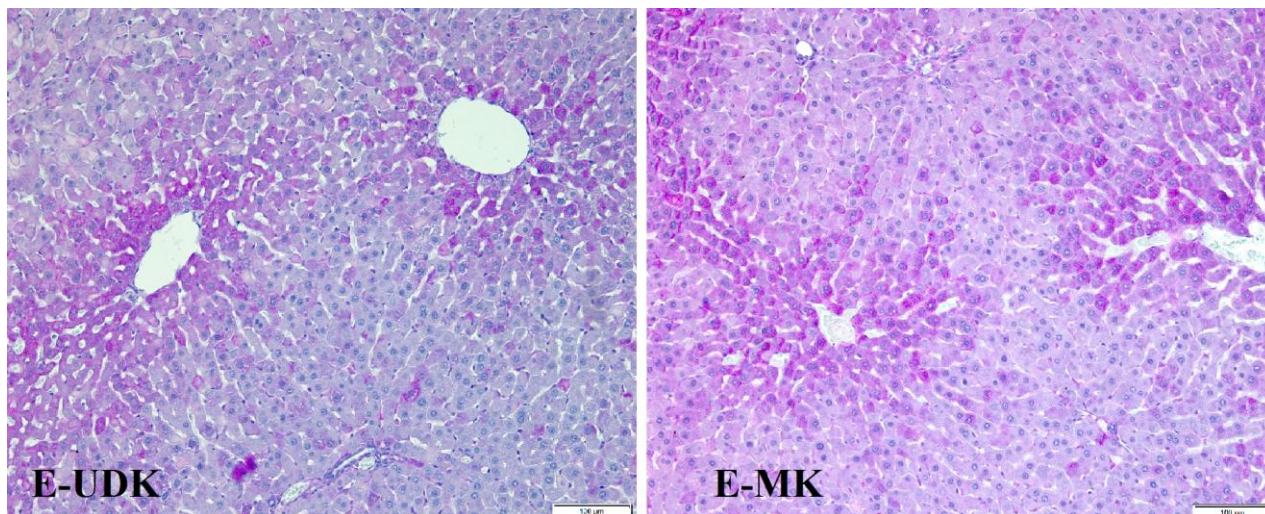
Među jedinkama na EE+UDK, odnosno EE+MK tretmanu, nema značajnih razlika u histološkoj građi jetre (Slika 36). Kod životinja obe grupe uočava se jasna lobularna građa tkiva jetre. U centru lobulusa nalazi se centralna vena od koje zrakasto polaze Remakove gredice sačinjene od hepatocita. Između gredica nalaze se sinusoidi uobičajenog izgleda. Gotovo svi hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili

paracentralno lokalizovanog jedra. Ne uočavaju se hepatociti sa intracitoplazmatskom akumulacijom pigmenta i znacima paperjaste degeneracije. Elementi portne trijade su uobičajenih histoloških karakteristika. U žučnim duktusima i manjim žučnim putevima se ne uočava nakupljanje pigmenta. Inflamatorni infiltrat nije uočen.



Slika 36. Tkivo jetre (HE, 20x).

Bojenjem tkiva jetre životinja obe grupe po PAS/AB metodi, uočava se veće prisustvo PAS-pozitivnih hepatocita u odnosu na EE grupu (Slika 37).



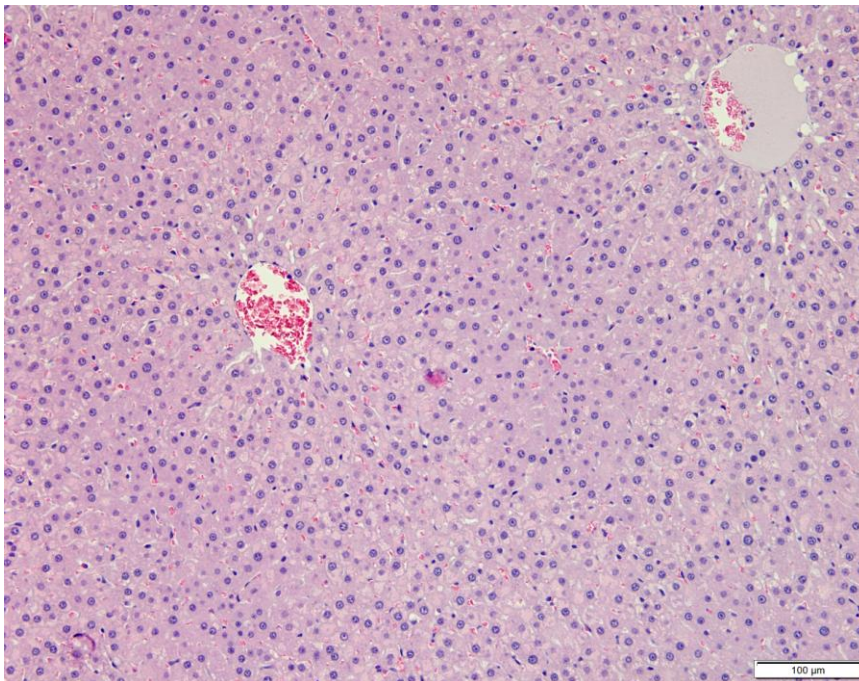
Slika 37. Tkivo jetre (PAS/AB, 20x).

U tkivu jetre analiziranih životinja nije uočena značajna proliferacija vezivnog tkiva, a retikulinska potka je očuvana. Na periferiji lobulusa prisutno je oskudno vezivno tkivo, nešto obilnije u predelu portnog prostora, bez odstupanja u odnosu na kontrolnu grupu.

4.4.2. Kvalitativna histološka analiza tkiva jetre životinja sa aloksanskim dijabetesom

4.4.2.1. Grupa A

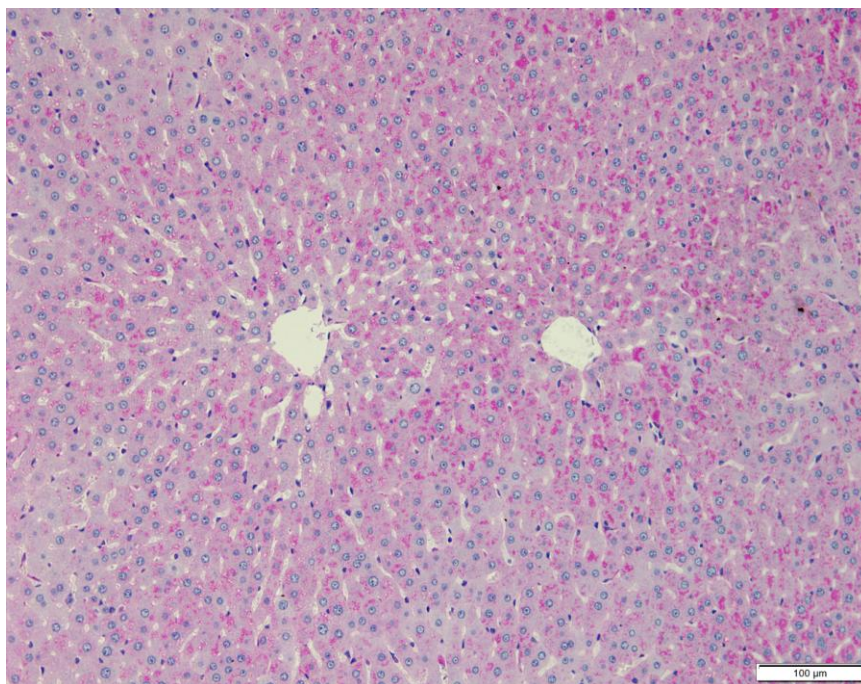
U pregledanim histološkim rezovima tkiva jetre pacova, bojenim HE metodom (Slika 38), vidi se klasična lobularna građa, sa tankim septama od vezivnog tkiva između lobulusa.



Slika 38. Tkivo jetre (HE, 20x).

Lobulusi su izgrađeni od hepatocita aranžiranih u vidu Remakovih gredica, zrakasto postavljenih u odnosu na centralno postavljenu *v.centralis*. Remakove gredice su međusobno razdvojene sinusoidima. Svi hepatociti su poligonalnog oblika, centralno ili paracentralno postavljenog krupnog jedra i uočljivog jedarca. Citoplazma je ružičasta, obilna, homogena. Razlika u građi zone 1, 2 i 3 jetrinog acinusa nije uočljiva. Žučni pigment se ne uočava u hepatocitima, drugim ćelijama jetre, kao ni u međućelijskom prostoru i žučnim vodovima.

Portni prostori su sačinjeni od vezivnog tkiva u kome se raspoznaju klasični elementi portne trijade: interlobularna arterija i vena, kao i jedan ili više žučnih duktusa, uobičajenih histoloških karakteristika. Žučni duktusi su odgovarajućeg lumena, bez znakova dilatacije i bez prisustva pigmenta. Na histološkim preparatima bojenim histochemijskim metodama PAS/AB (Slika 39) uočava se glikogen deponovan u čitavoj citoplazmi u vidu crvenih, gusto raspoređenih PAS pozitivnih granula. Distribucija glikogena po zonama je uniformna.

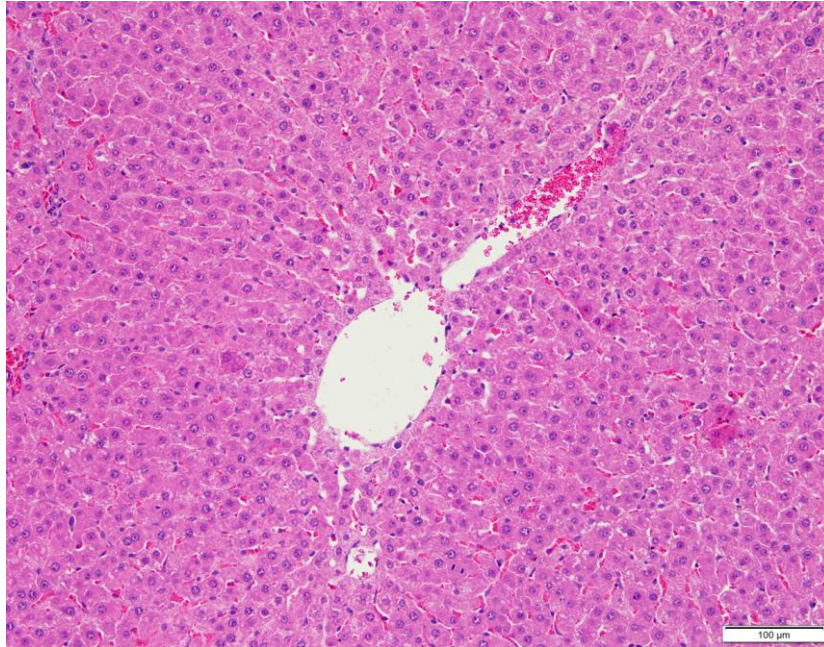


Slika 39. Tkivo jetre (PAS/AB, 20x).

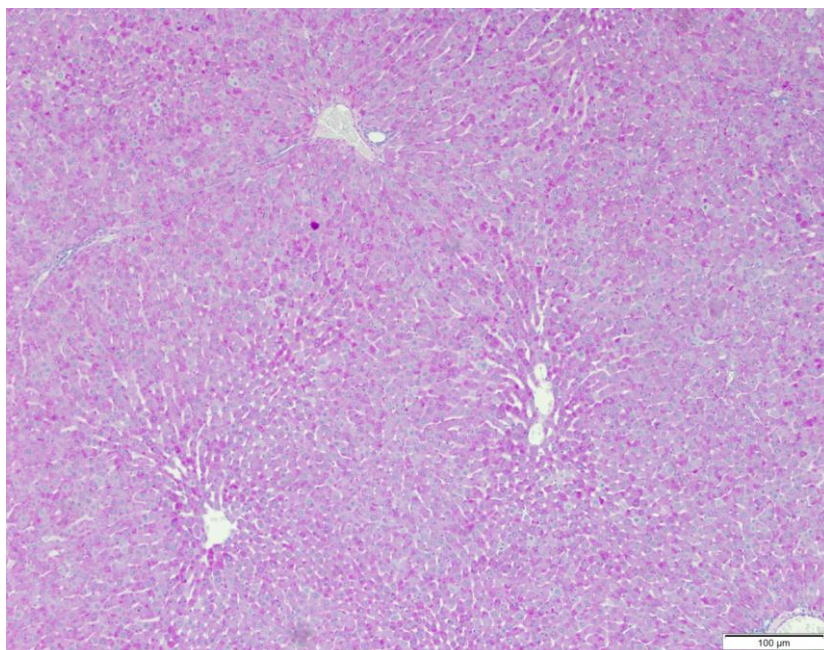
4.4.2.2. Grupa AE

U tkivu jetre dijabetičnih životinja tretiranih etinilestradiolom uočava se jasna lobularna građa tkiva jetre, sa centralno postavljenom centralnom venom. Hepatociti su raspoređeni u vidu Remakovih gredica, sa sinusoidalnim kapilarima između njih (Slika 40). Hepatociti su najvećim delom poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra. Razlika u građi perivenularne, intermedijarne i periportne zone nije uočljiva. Na periferiji lobulusa prisutno je oskudno vezivno tkivo, nešto obilnije u predelu portnog prostora, slično nalazu u kontrolnoj grupi. Elementi portne trijade su uobičajenih histoloških karakteristika.

U žučnim duktusima i manjim žučnim putevima se ne uočava nakupljanje pigmenta. Inflammatory infiltrat nije uočen. Na histološkim preparatima bojenim metodom PAS/AB (Slika 41) u svim zonama acinusa uočavaju se PAS-pozitivni hepatociti.



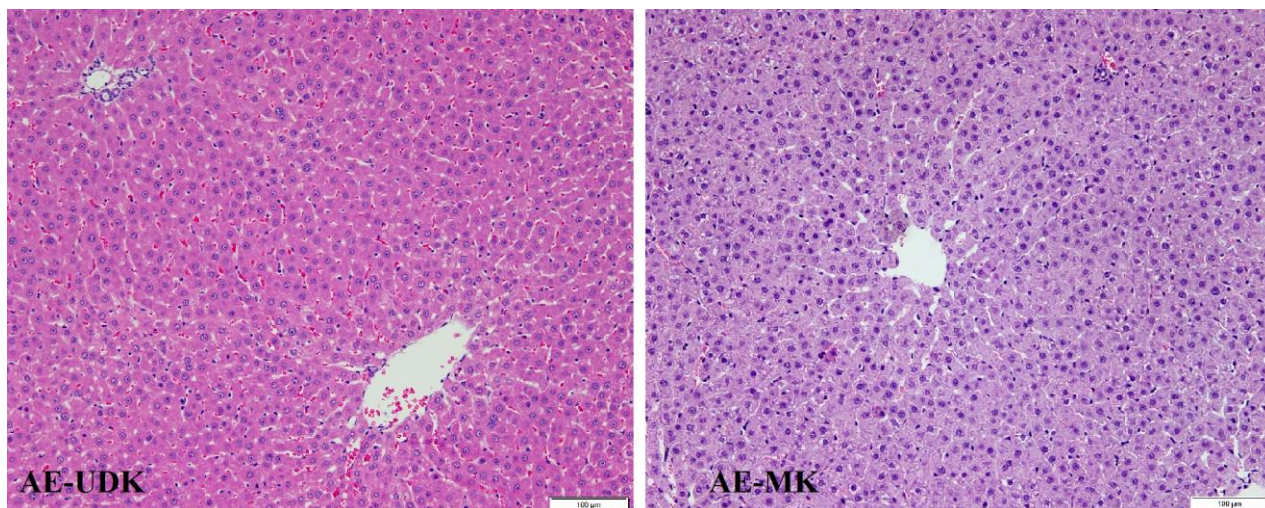
Slika 40. Tkivo jetre (HE, 20x).



Slika 41. Tkivo jetre (PAS/AB, 10x).

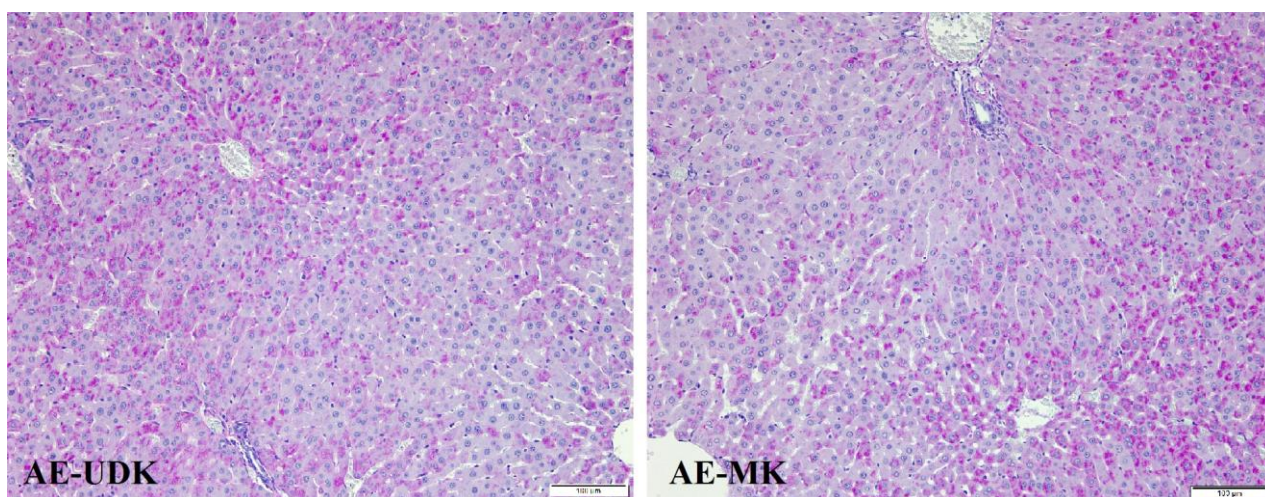
4.4.2.3. Grupe AE-UDK i AE-MK

U tkivu jetre dijabetičnih životinja na EE+UDK odnosno EE+MK tretmanu uočava se uobičajena građa tkiva jetre (Slika 42).



Slika 42. Tkivo jetre (HE, 20x).

Hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra. Ne uočavaju se hepatociti sa intracitoplazmatskom akumulacijom pigmenta i znacima paperjaste degeneracije



Slika 41. Tkivo jetre (AB-PAS, 20x) Tkivo jetre pacova bojeno metodom PAS/AB (Slika 43) u obe grupe sadrži difuzno raspoređene hepatocite sa intracitoplazmatskim PAS⁺ crvenim granulama.

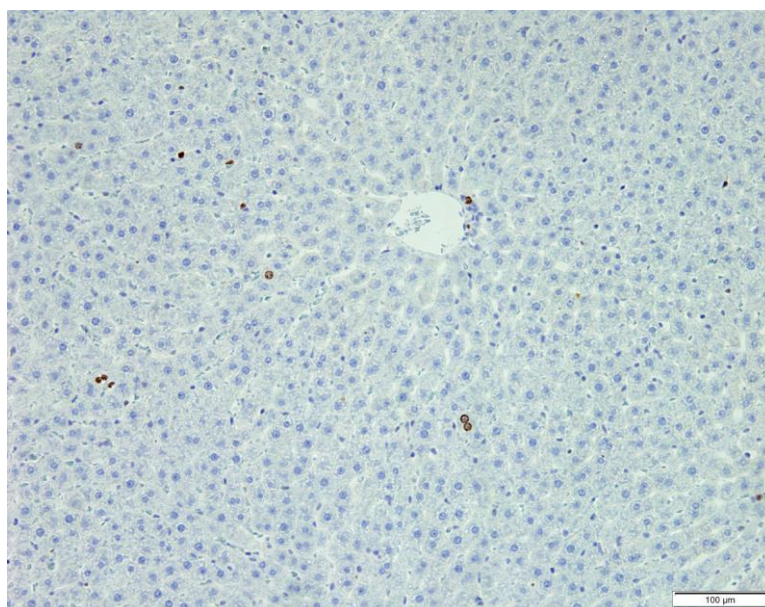
Na periferiji lobulusa prisutno je oskudno vezivno tkivo, nešto obilnije u predelu portnog prostora. Elementi portne trijade su uobičajenih histoloških karakteristika. U žučnim duktusima i manjim žučnim putevima se ne uočava nakupljanje pigmenta. Inflammatory infiltrat nije uočen. Tkivo jetre pacova bojeno metodom PAS/AB (Slika 43) u obe grupe sadrži difuzno raspoređene hepatocite sa intracitoplazmatskim PAS⁺ crvenim granulama.

4.5. Imunohistohemijska analiza tkiva

4.5.1. Imunohistohemijska analiza tkiva jetre životinja koje nisu tretirane aloksanom

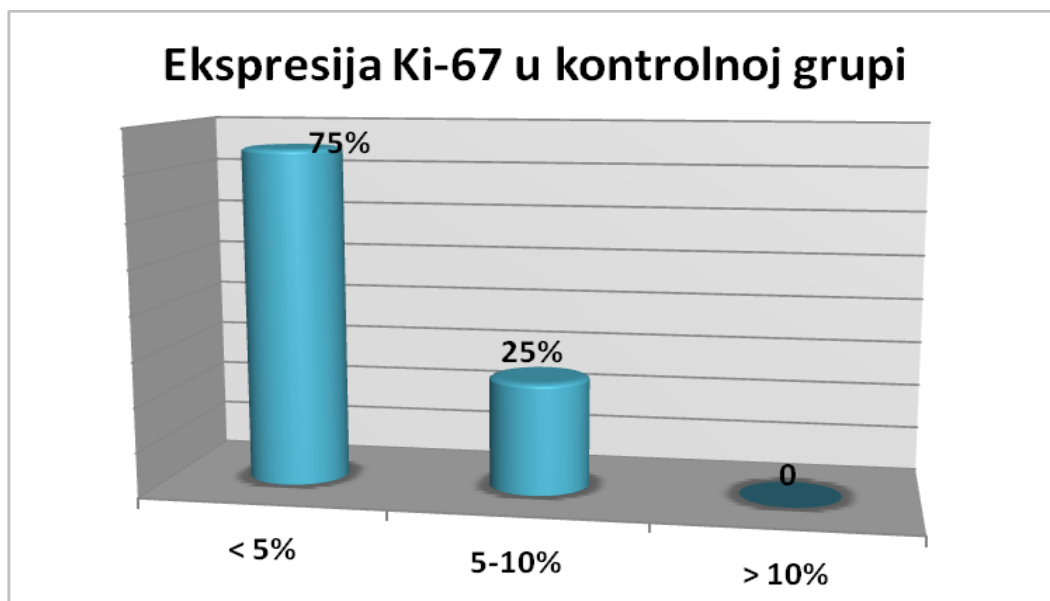
4.5.1.1. Proliferativni indeks hepatocita

Analizom ekspresije Ki-67 u hepatocitima životinja iz kontrolne grupe (K1), ustanovljeno je da je kod 75% jedinki Ki-67 prisutan u manje od 5% (Slika 44), a kod 25% jedinki u više od 5% hepatocita.



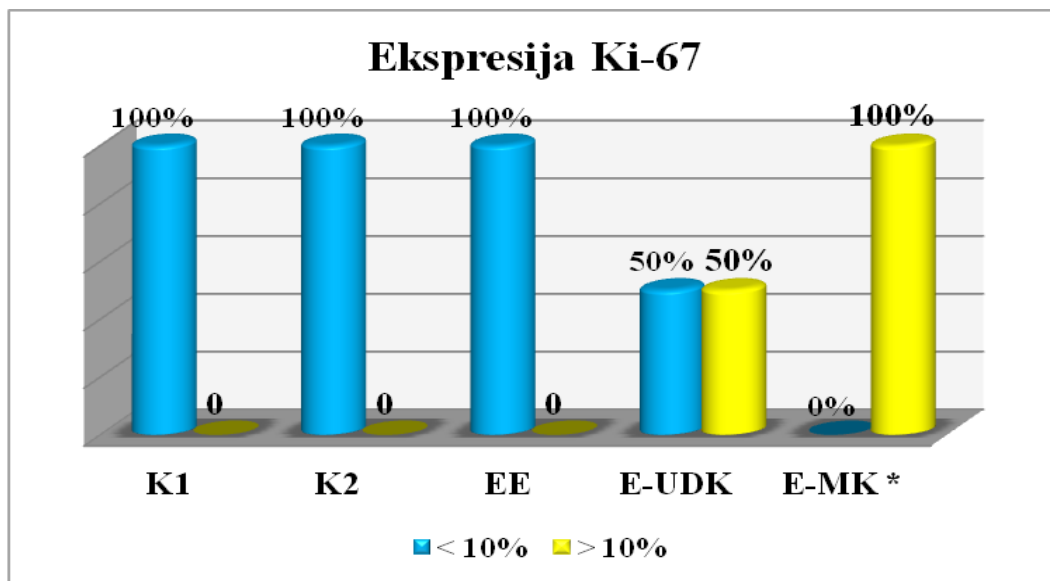
Slika 44. Ki-67 pozitivni hepatociti u tkivu jetre pacova tretiranih fiziološkim rastvorom (20x).

Kako ni jedna jedinka kontrolne grupe nije pokazala ekspresiju Ki-67 u više od 10% ćelija jetre (Grafik 11), ta vrednost je uzeta kao granična vrednost. Ekspresija Ki-67 u više od 10% ćelija smatrana je pojačanom ekspresijom Ki-67, odnosno povećanim proliferativnim indeksom hepatocita. Ovaj kriterijum primenjen je na sve eksperimentalne grupe.



Grafik 11. Ekspresija Ki-67 u hepatocitima kontrolne K1 grupe.

Kod svih jedinki grupa K2 i EE prisutna je niska ekspresija Ki-67 proteina (manje od 10%) slično K1 grupi, tj mali broj hepatocita se nalazi u nekoj od aktivnih faza ćelijskog ciklusa.

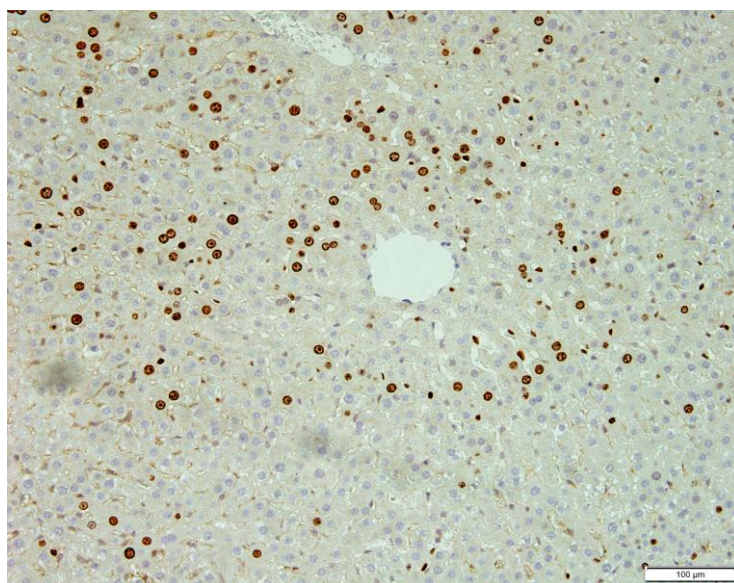


Grafik 12. Ekspresija Ki-67 u kontrolnim grupama i grupama tretiranim etinilestradiolom.

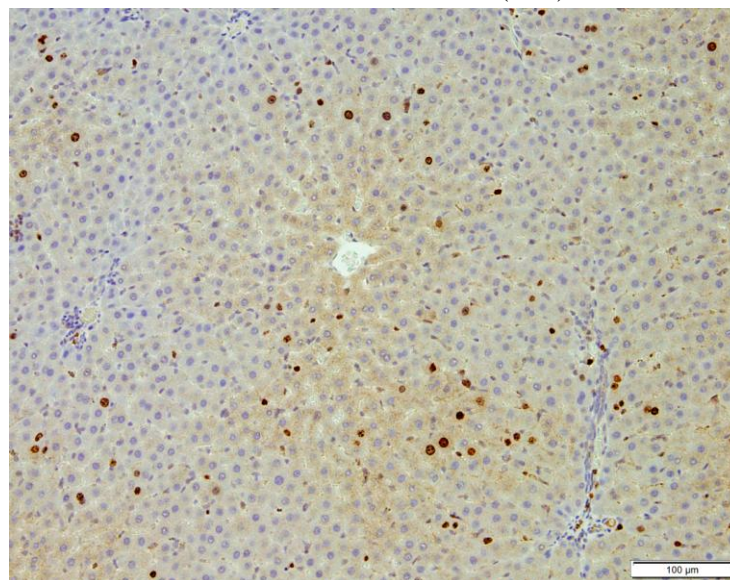
Legenda: * - statistički značajna razlika u poređenju sa grupama K1, K2 i EE

U grupama koje su pored etinilestradiola imale kotretman žučnim kiselinama, u većem procentu je registrovan povećan proliferativni indeks hepatocita (Grafik 12), odnosno

kod 50% jedinki E-UDK grupe i kod 100% jedinki E-MK grupe (Slika 45) (Slika 46). Razlike između E-MK grupe i grupa K1, K2 i EE pokazuju statistički značajnost koja je utvrđena *Mann-Whitney U* i *Kolmogorov-Smirnov* testovima (MW=0.000, p=0.029; KS=1.141, p=0.037). Ki-67 pozitivne ćelije u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama pokazuju nešto veću, ali ne isključivu prisutnost u zoni II i zoni I acinusa jetre.



Slika 45. Ki-67 pozitivni hepatociti u tkivu jetre pacova tretiranih etinilestradiolom i monoketoholnom kiselinom (20x).



Slika 46. Ki-67 pozitivni hepatociti u tkivu jetre pacova tretiranih etinilestradiolom i ursodeoksiholnom kiselinom (10x).

4.5.1.2. Ekspresija markera apoptoze

4.5.1.2.1. Ekspresija Bcl-2

Slaba ekspresija Bcl-2 uočena je u tkivu jetre kontrolnih grupa (Slika 47). Hepatociti jedinki tretiranih sa EE nisu ekspimirali Bcl-2. Primena UDK je dovela do slabe ekspresije kod jedne jedinke, što odgovara nalazu u kontrolnoj grupi. Primena MK uz EE nije uticala na ekspresiju Bcl-2 u hepatocitima (Tabela 14). *Kruskal-Wallis* test za celokupan uzorak pokazuje da uočene razlike nisu statistički značajne ($F=6,817$, $n=8$, $p=0,557$).

Tabela 14. Ekspresija Bcl-2 proteina u hepatocitima.

ekspresija Bcl-2	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
nije prisutna	75%	75%	100%	75%	100%
slaba	25%	25%	-	25%	-
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-

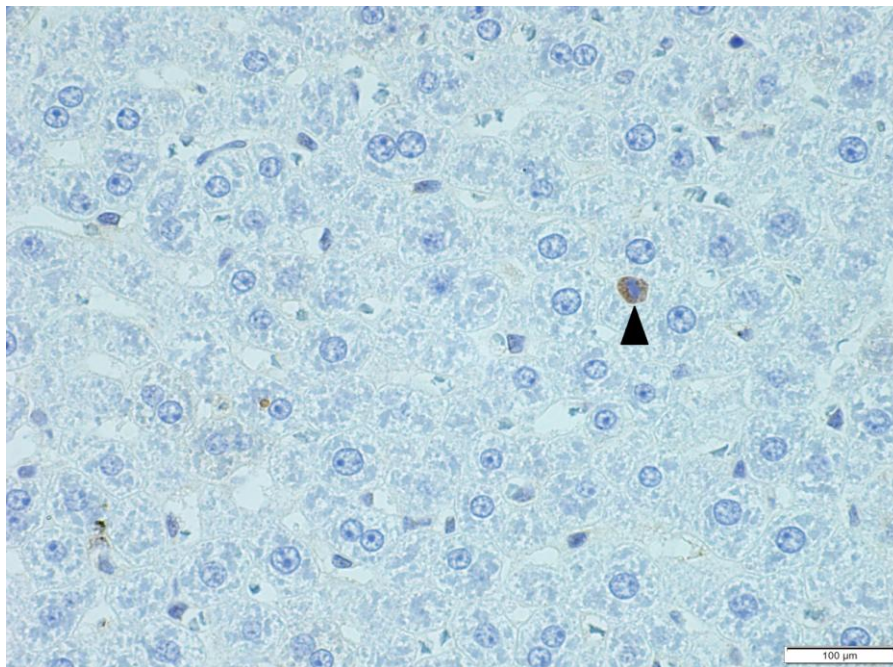
4.5.1.2.2. Ekspresija Bcl-x proteina

Kod polovine jedinki kontrolne K1 grupe uočena je ekspresija Bcl-x proteina (Slika 48). Od jedinki tretiranih propilen glikolom, četvrtina je ekspimirala Bcl-x. Jedinke koje su primale etinilestradiol nisu pokazale ekspresiju Bcl-x u hepatocitima (EE), čak ni uz kotretman sa žučnim kiselinama (E-UDK, E-MK) (Tabela 15).

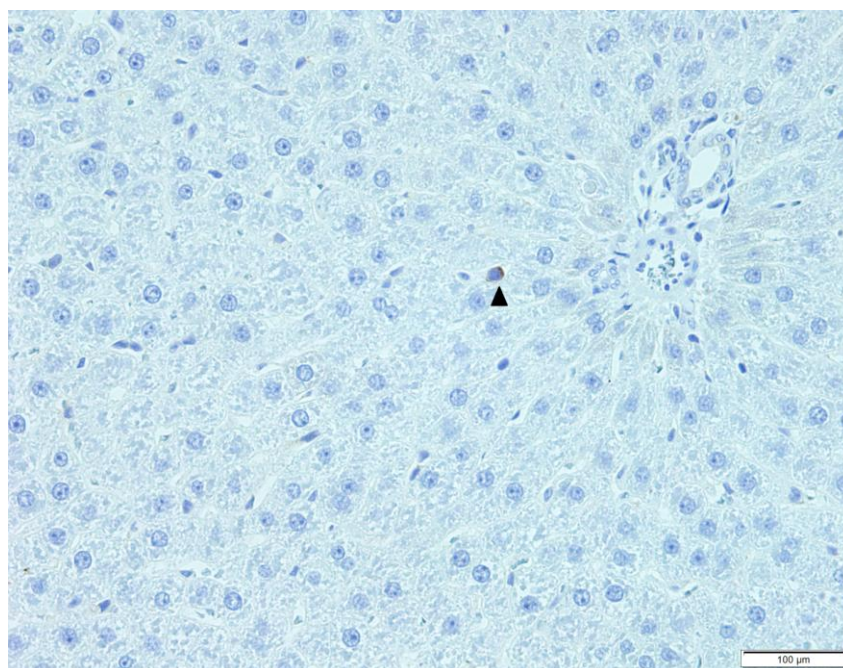
Kruskal-Wallis test za celokupan uzorak pokazuje da uočene razlike nisu statistički značajne ($F=5,920$, $n=8$, $p=0,656$).

Tabela 15. Ekspresija Bcl-x proteina u hepatocitima.

ekspresija Bcl-x	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
nije prisutna	50%	75%	100%	100%	100%
slaba	50%	25%	-	-	-
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-



Slika 47. Bcl-2 pozitivni hepatocit (▲), (60x).



Slika 48. Bcl-X pozitivni hepatociti (▲), (40x).

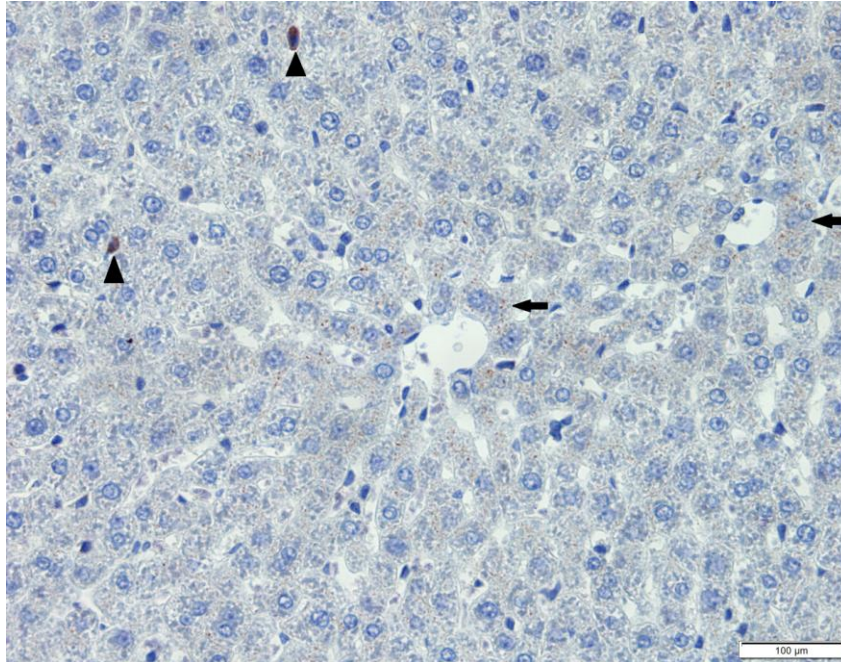
4.5.1.2.3. Ekspresija Bax proteina

Pri analizi ekspresije Bax, interpretirana je i beležena samo ekspresija Bax u citoplazmi hepatocita, a zanemarena ekspresija Bax u drugim vrstama ćelija prisutnim u jetri. U svim analiziranim grupama, prisutna je samo slaba citoplazmatska ekspresija Bax. Kontrolne grupe jedinki su u polovini slučajeva ekspimirale protein Bax. U grupi EE je nešto češće bila prisutna ekspresija Bax (Slika 49, Slika 50). Primena UDK uticala je na ekspresiju Bax, i vratila je na nivo kontrolne grupe. Za razliku od UDK, monoketoholna kiselina nije dovela do promene u ekspresiji Bax u odnosu na EE grupu (Tabela 16).

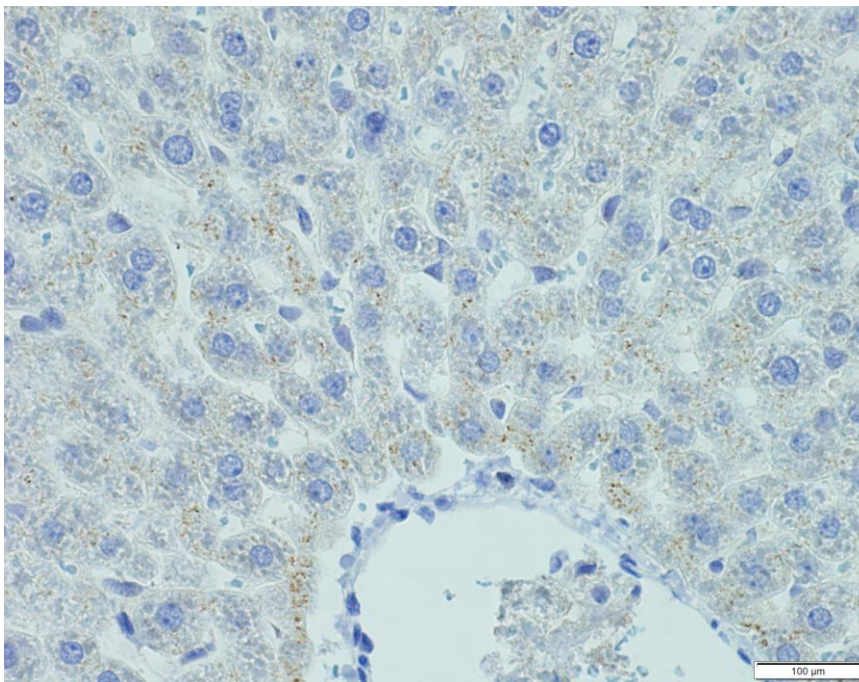
Tabela 16. Ekspresija Bax proteina u hepatocitima.

ekspresija Bax	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
nije prisutna	100%	100%	50%	100%	75%
slaba	-	-	50%	-	25%
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-

Kruskal-Wallis test pokazuje da uočene razlike u stepenu ekspresije Bax u posmatranim grupama, ne pokazuju statističku značajnost ($F=6,515$, $n=8$, $p=0,590$).



Slika 49. Ekspresija Bax u hepatocitima (←) i drugim vrstama ćelija (▲), (40x).



Slika 50. Ekspresija Bax u hepatocitima, (60x).

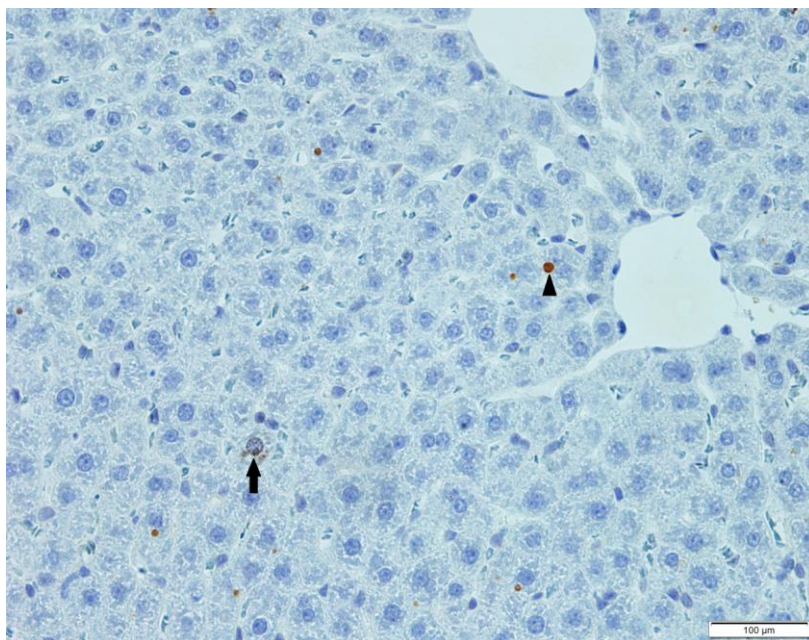
4.5.1.2.4. Ekspresija p53 proteina

U tkivu jetre svih jedinki iz posmatranih grupa, uočena je samo slaba ekspresija p53 (Slika 51, Slika 52). Polovina jedinki tretiranih fiziološkim rastvorom ekspresirala je p53 u citoplazmi hepatocita. Ekspresija je uočena u citoplazmi pojedinačnih, difuzno raspoređenih hepatocita. Nuklearno prisustvo p53 proteina nije prisutno. U grupi EE samo jedna jedinka je ekspresirala p53, ali je uočena i nuklearna ekspresija, za razliku od kontrolne i ostalih grupa (Tabela 17).

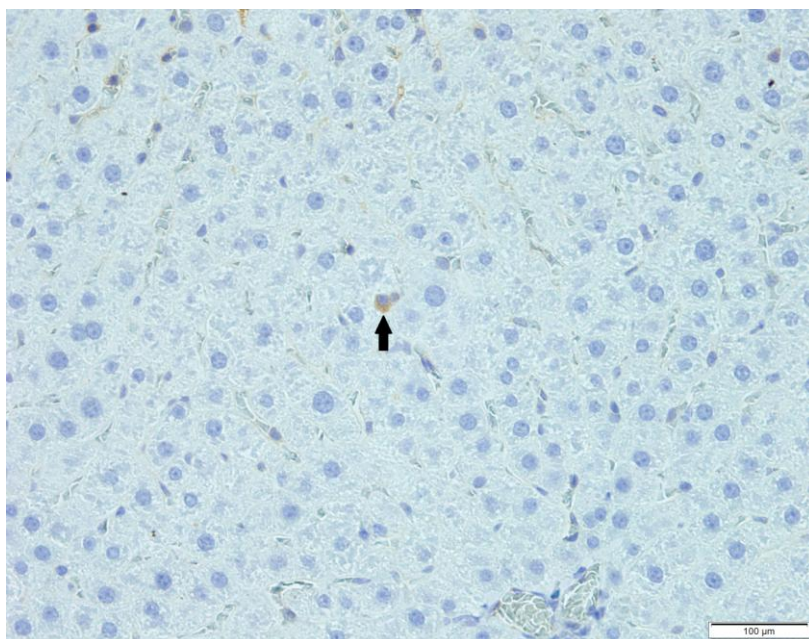
Jedinke na tretmanu EE+UDK nisu pokazale ni citoplazmatsku ni nuklearnu ekspresiju p53. Za razliku od UDK, kod jedne jedinke na EE+MK tretmanu prisutna je citoplazmatska p53 ekspresija (Tabela 17). *Kruskal-Wallis* test pokazuje da uočene razlike u stepenu ekspresije p53 u posmatranim grupama, ne pokazuju statističku značajnost ($F=7,433$, $n=8$, $p=0,491$).

Tabela 17. Ekspresija p53 proteina u hepatocitima.

ekspresija p53	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
nije prisutna	50%	75%	75%	100%	75%
slaba citoplazmatska	50%	25%	-	-	25%
slaba nuklearna	-	-	25%	-	-
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-



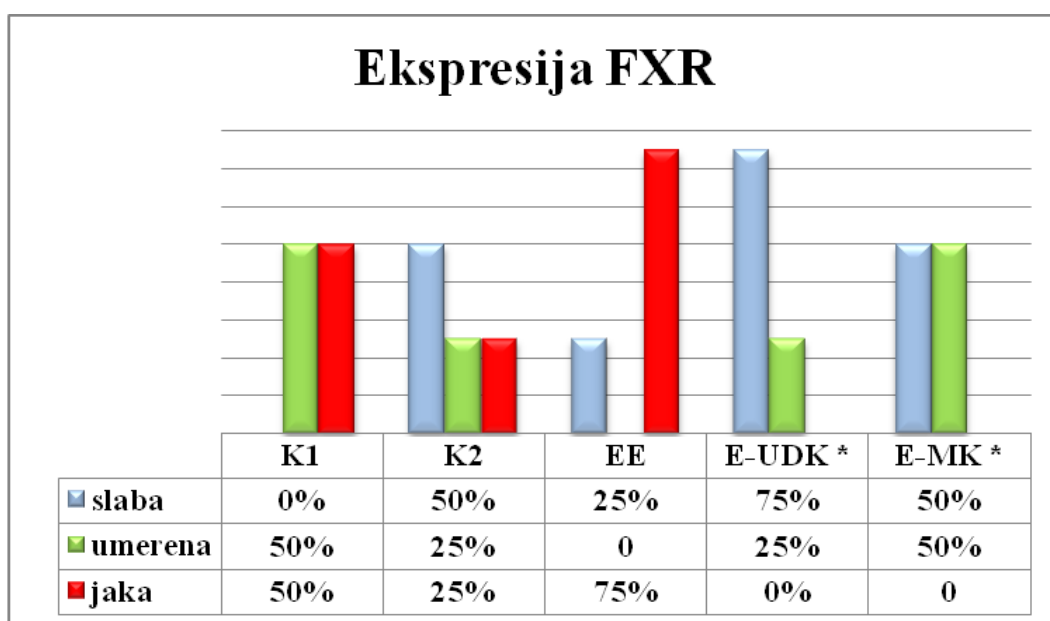
Slika 51. Citoplazmatska i nuklearna ekspresija p53 u hepatocitu (↑) i nespecifično citoplazmatsko bojenje (▲) (40x).



Slika 52. Citoplazmatska ekspresija p53 u hepatocitu (↑), (40x).

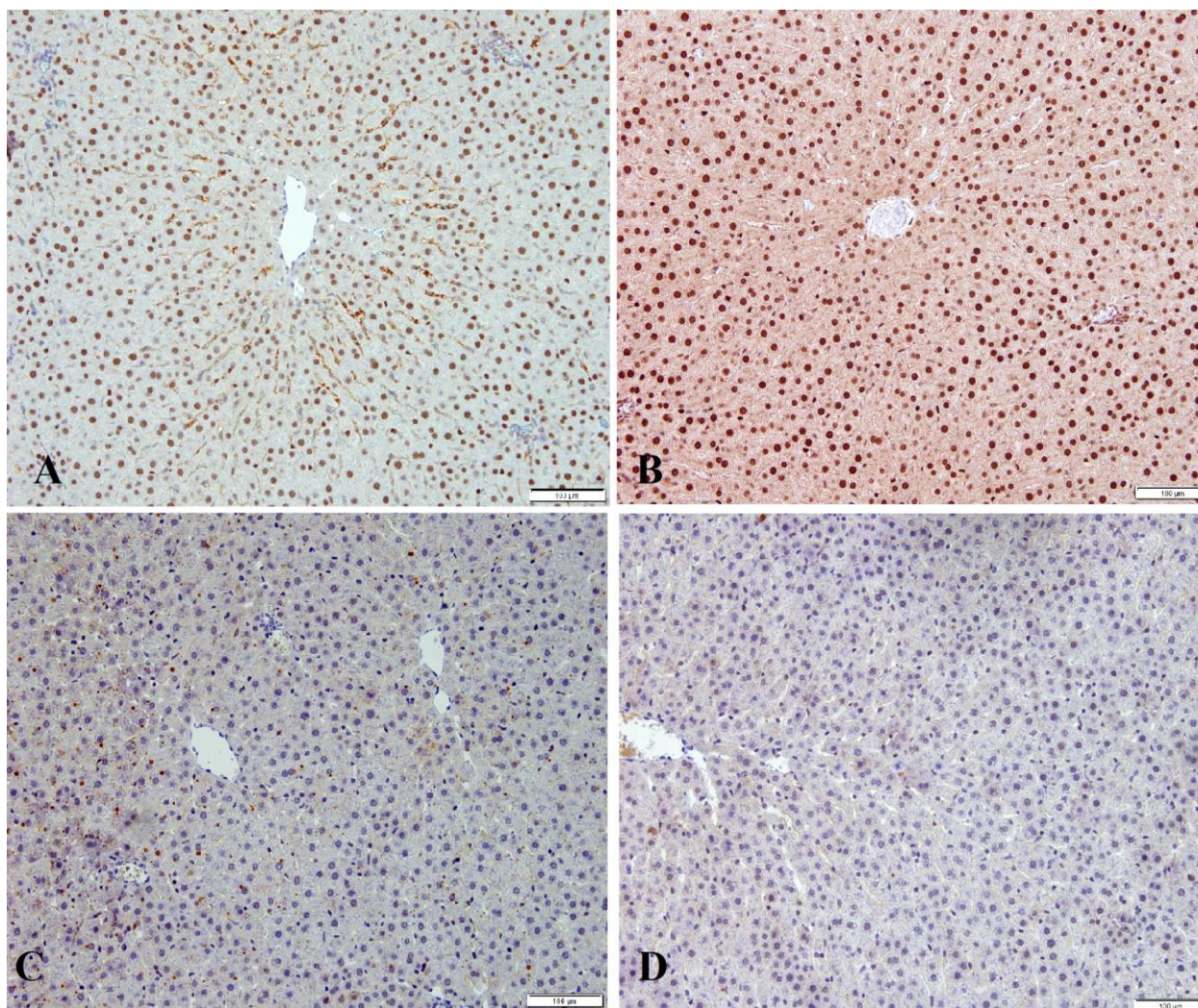
4.5.1.3. Ekspresija FXR receptora

Prema ranije navedenim kriterijumima, ekspresija FXR u tkivu je tumačena na osnovu izračunatog FXRscore za svaku jedinku. U kontrolnoj grupi, 50% jedinki imalo je umerenu a isto toliko jaku ekspresiju FXR. U grupi EE, jaka ekspresija je utvrđena kod 75% jedinki, dok je tretman ursodeoksiholnom kiselinom značajno smanjio ekspresiju FXR, tj nije bilo jake ekspresije, a dominantna je bila slaba ekspresija. U grupi E-MK takođe nije bilo jake ekspresije, već je polovina jedinki imala slabu a polovina umerenu ekspresiju FXR (Grafik 13) (Slika 53).



Grafik 13. Ekspresija FXR u tkivu jetre životinja sa holestazom.

Prema Kruskal-Wallis testu za celokupan uzorak, postoje statistički značajne razlike ($F=23.628$, $n=8$, $p=0.003$). *Mann-Whitney U* i *Kolmogorov-Smirnov* testovi pokazuju da su statistički značajne razlike između grupa K1 i E-UDK, tj K1 i E-MK ($MW=0.500$, $p=0.029$). Takođe, ekspresija u EE grupi se statistički značajno razlikuje od ekspresije FXR u E-UDK i E-MK ($KS=1.491$, $p=0.037$).



Slika 53. Ekspresija FXR (20x).

Legenda: A- grupa K1 tretirana fiziološkim rastvorom; B- grupa EE, tretirana etinilestradiolom; C- grupa E-UDK, tretirana etinilestradiolom i ursodeoksiholnom kiselinom; D- grupa E-MK, tretirana etinilestradiolom i monoketoholnom kiselinom.

Analizom parametra FXR%, odnosno zastupljenosti hepatocita koji su ekspimirali FXR (FXR⁺ hepatociti) *Kruskal-Wallis* testom, potvrđena je statistička značajnost ustanovljenih razlika ($F=24.717$, $n=8$, $p=0.002$). U kontrolnoj grupi (K1) sve jedinice imaju više od 75% FXR pozitivnih hepatocita, dok su u K2 grupi zastupljene sve kategorije FXR%. Velik broj FXR pozitivnih hepatocita prisutan je i u EE grupi, za razliku od E-UDK i E-MK grupa (Tabela 18). Ova razlika pokazuje statističku značajnost, utvrđenu *Mann-Whitney U* i *Kolmogorov-Smirnov* testovima ($MW=0.000$, $p=0.029$, $KS=1.414$, $p=0.037$).

Tabela 18. Zastupljenost FXR pozitivnih hepatocita.

FXR %	K1	K2	EE	E-UDK *	E-MK *
1-25%	0	25%	0	50%	50%
26-50%	0	25%	25%	25%	0
51-75%	0	25%	0	25%	50%
76-100%	100%	25%	75%	0	0

Legenda: * - statistički značajna razlika u poređenju sa grupom EE

Intenzitet bojenja u FXR pozitivnim hepatocitima (Tabela 19) nije ispoljio statistički značajne razlike među grupama (KW=10.133, n= 4, p=0.038).

Tabela 19. Intenzitet bojenja u FXR pozitivnim hepatocitima oglednih grupa.

FXR int	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
slab	25%	50%	25%	100%	50%
umeren	25%	25%	0	0	50%
jak	50%	25%	75%	0	0

Ispitivanjem povezanosti ekspresije FXR i vrednosti šećera u krvi nakon tretmana žučnim kiselinama, uočeno je da postoji jaka korelacija u grupama K1, EE, E-UDK i E-MK (Tabela 20).

Tabela 20. Pravac i intenzitet korelacije između ekspresije FXR i šećera u krvi.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
ŠUK	Jaka pozitivna R=0.89 p=0.106 KD=79.21%	Zanemarljiva R=0.1 p=0.895 KD=1%	Jaka pozitivna R=0.77 p=0.225 KD=59.29%	Jaka pozitivna R=0.63 p=0.368 KD=39.69%	Jaka pozitivna R=0.89 p=0.106 KD=79.21%

Uticaj sintetske i prirodne žučne kiseline na oksidativni status i apoptozu hepatocita
- doktorska disertacija -

U Tabeli 21, navedene su korelacije ekspresije FXR i parametara jetrene funkcije, ispitane *Spearman* testom. U odnosu na ekspresiju Ki-67 postoji slaba negativna korelacija ($R=0.24$, $p=0.764$, $KD=5.76\%$).

Tabela 21. Pravac i jačina korelacije ekspresije FXR i praćenih parametara jetrene funkcije.

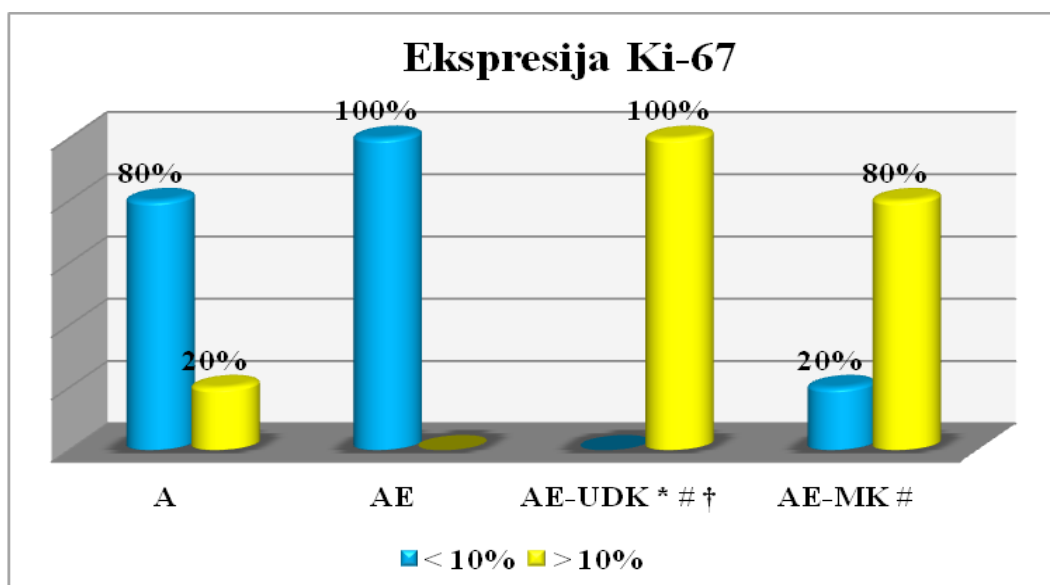
	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
<u>AST</u>	-	-	-	Slaba pozitivna $R=0.21$ $p=0.789$ $KD=4.41\%$	-
<u>ALT</u>	-	Jaka pozitivna $R=0.80$ $p=0.200$ $KD=64\%$	Slaba pozitivna $R=0.26$ $p=0.742$ $KD=6.76\%$	Srednja pozitivna $R=0.32$ $p=0.684$ $KD=10.24\%$	-
<u>γ-GT</u>	-	Srednja pozitivna $R=0.45$ $p=0.553$ $KD=20.25\%$	-	-	-
<u>BLRu</u>	-	-	Slaba pozitivna $R=0.26$ $p=0.742$ $KD=6.76\%$	-	-
<u>BLRd</u>	Potpuna pozitivna $R=1$ $p=0.000$ $KD=100\%$	Jaka pozitivna $R=0.89$ $p=0.106$ $KD=79.21\%$	-	Slaba pozitivna $R=0.27$ $p=0.728$ $KD=7.29\%$	-

4.5.2. Imunohistohemijska analiza tkiva jetre životinja sa aloksanskim dijabetesom

4.5.2.1. Proliferativni indeks hepatocita

Prema ranije urvrđenom kriterijumu, povećanim proliferativnim indeksom hepatocita smatrana je ekspresija Ki-67 u više od 10% hepatocita. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji Ki-67 u grupama sa aloksanskim dijabetesom (KW=28.438, n=8, p=0.000). U grupi A kod 20% jedinki je verifikovan povećan proliferativni indeks, dok među jedinkama obolelim od aloksanskog dijabetesa tretiranih i etinilestradiolom nije zabeležena ekspresija Ki-67 u više od 10% ćelija, i generalno je prisutan vrlo mali broj Ki-67 pozitivnih hepatocita (Slika 54) (Grafik 14).

U grupama tretiranim žučnim kiselinama, značajno veći procenat jedinki imao je povećan proliferativni indeks (Slika 55) (Grafik 14).

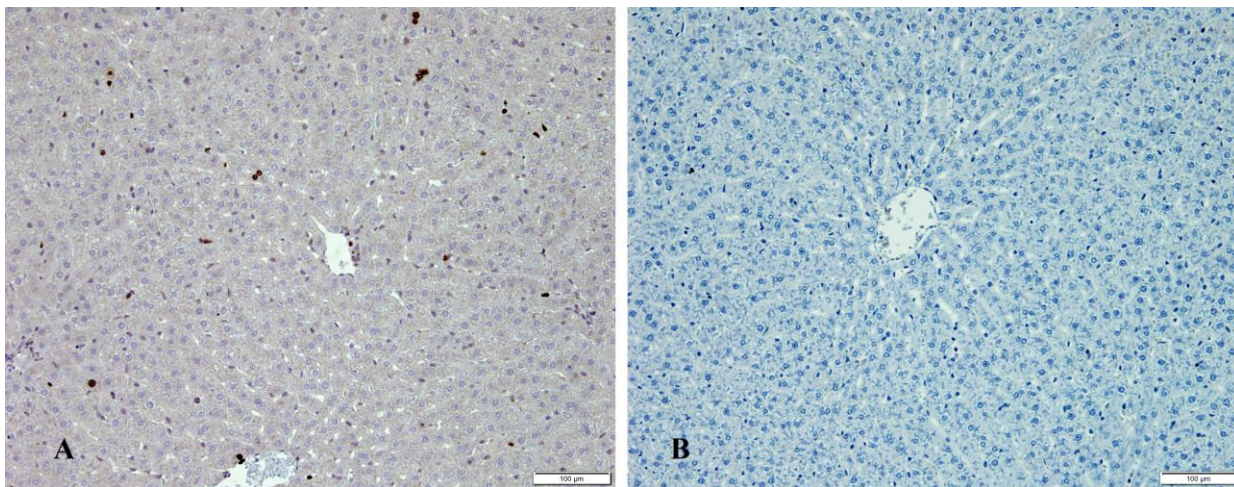


Grafik 14. Ekspresija Ki-67 u grupama sa aloksanskim dijabetesom.

Legenda: * - statistički značajna razlika u poređenju sa grupama K1, K2
- statistički značajna razlika u poređenju sa grupom AE
† - statistički značajna razlika u poređenju sa grupom A

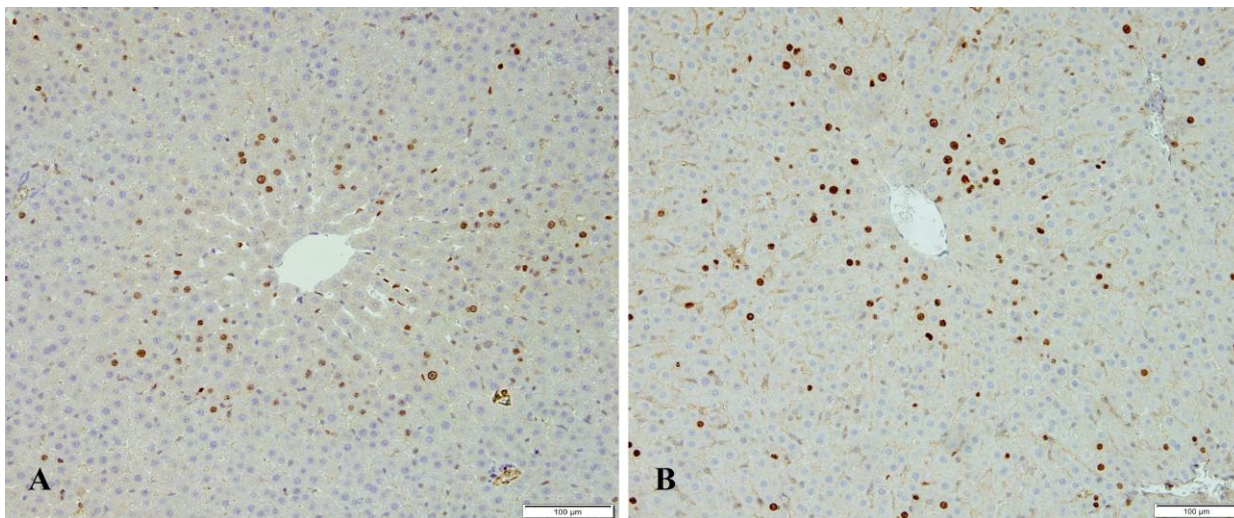
Povećan proliferativni indeks kod jedinki AE-UDK grupe je statistički značajno češći u odnosu na grupe K1 (MW=0.000, p=0.016, KS=1.491, p=0.023), A i AE (MW=0.000,

p=0.016). Jedinke grupe AE-MK u 80% slučajeva pokazuju povećan proliferativni indeks što pokazuje statističku značajnost u poređenju sa grupom AE (MW=2.500, p=0.032).



Slika 54. Tkivo jetre pacova bojeno imunohistohemijском metodom sa Ki-67 antitelom.

Legenda: A- grupa A (20x); B- grupa AE (20x)



Slika 55. Tkivo jetre pacova bojeno imunohistohemijском metodom sa Ki-67 antitelom.

Legenda: A- grupa AE-UDK (20x); B- grupa AE-MK (20x)

4.5.2.2. Ekspresija markera apoptoze

4.5.2.2.1. Ekspresija Bcl-2

Ekspresija Bcl-2 nije prisutna u tkivu jetre jedinki koje su primale jednokratnu dozu aloksana odnosno ALX+EE tretman. Ekspresija je prisutna nakon tretmana žučnim kiselinama, i to samo slabog stepena. Umerena i izražena ekspresija nije prisutna. Primena UDK je dovela do porasta ekspresije Bcl-2, što je (procentualno posmatrano), više nego u kontrolnoj grupi tretiranoj fiziološkim rastvorom (Tabela 22).

Tabela 22. Ekspresija Bcl-2 proteina u hepatocitima.

ekspresija Bcl-2	K1	A	AE	AE-UDK	AE-MK
nije prisutna	75%	100%	100%	60%	80%
slaba	25%	-	-	40%	20%
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-

Primena MK uz ALX+EE tretman, povećala je ekspresiju Bcl-2 u odnosu na A i AE grupe. Iako je ekspresija Bcl-2 bila manja nakon primene MK u odnosu na UDK, ipak je ekspresija u AE-MK grupi bila na nivou kontrolne grupe. *Kruskal-Wallis* test za celokupan uzorak pokazuje da uočene razlike nisu statistički značajne ($F=6,817$, $n=8$, $p=0,557$).

4.5.2.2.2. Ekspresija Bcl-x proteina

U tkivu jedinki svih grupa uočena je slaba citoplazmatska ekspresija Bcl-x proteina. *Kruskal-Wallis* test za celokupan uzorak pokazuje da uočene razlike nisu statistički značajne ($F=5,920$, $n=8$, $p=0,656$) (Tabela 23).

Tabela 23. Ekspresija Bcl-x proteina u hepatocitima.

ekspresija Bcl-x	K1	A	AE	AE-UDK	AE-MK
nije prisutna	50%	60%	80%	80%	80%
slaba	50%	40%	20%	20%	20%
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-

4.5.2.2.3. Ekspresija Bax proteina

U tkivu jedinki na ALX ili ALX+EE tretmanu, prisutna je citoplazmatska ekspresija bax, dok kod jedinki gde je primenjena neka od ispitivanih ŽK, ekspresija nije prisutna.

Kruskal-Wallis test pokazuje da uočene razlike u pogledu ekspresije Bax u posmatranim grupama, ne pokazuju statističku značajnost ($F=6,515$, $n=8$, $p=0,590$) (Tabela 24).

Tabela 24. Ekspresija Bax proteina u hepatocitima.

ekspresija Bax	K1	A	AE	AE-UDK	AE-MK
nije prisutna	100%	60%	60%	100%	100%
slaba	0	40%	40%	-	-
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-

4.5.2.2.4. Ekspresija p53 proteina

Ekspresija p53 kod jedinki sa aloksanskim dijabetesom prisutna je samo u AE grupi, i to u jedru hepatocita (Tabela 25). *Kruskal-Wallis* test pokazuje da uočene razlike u stepenu ekspresije p53 u posmatranim grupama, ne pokazuju statističku značajnost ($F=7,433$, $n=8$, $p=0,491$).

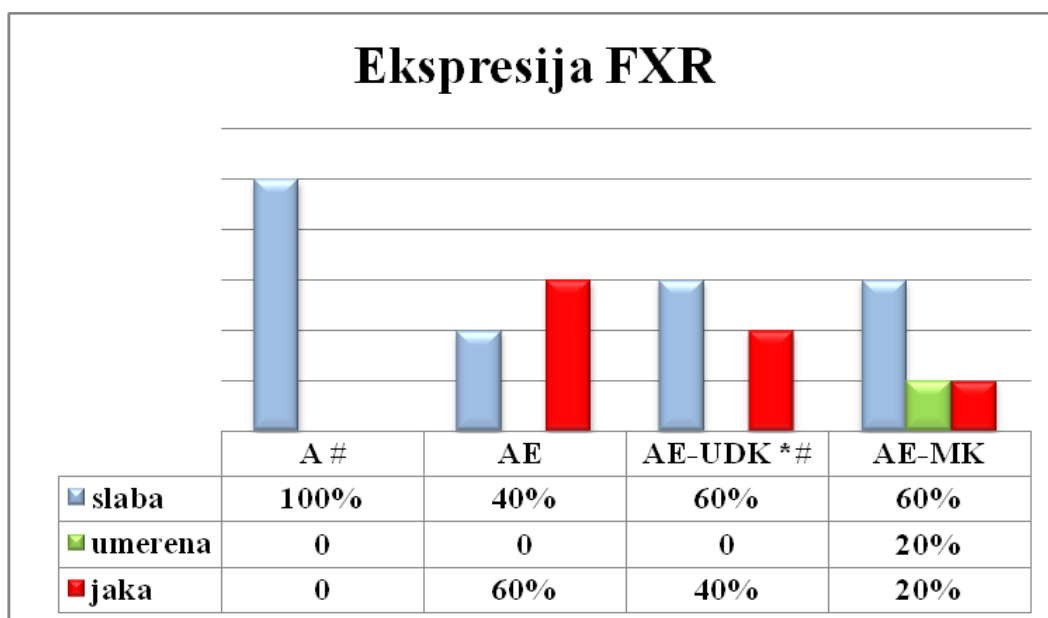
Tabela 25. Ekspresija p53 proteina u hepatocitima.

ekspresija p53	K1	A	AE	AE-UDK	AE-MK
nije prisutna	50%	100%	80%	100%	100%
slaba citoplazmatska	50%	-	-	-	-
slaba nuklearna	-	-	20%	-	-
umerena	-	-	-	-	-
izražena	-	-	-	-	-

4.5.2.3. Ekspresija FXR receptora

U grupi A, sve jedinice su pokazale slabu ekspresiju FXR, dok je u grupi koja je primala i etinilestradiol, kod svih jedinki uočena jaka ekspresija FXR. Jedinice U grupi kojoj je aplikovana MK, jaka ekspresija je smanjena na 20% jedinki (Grafik 15) (Slika 56).

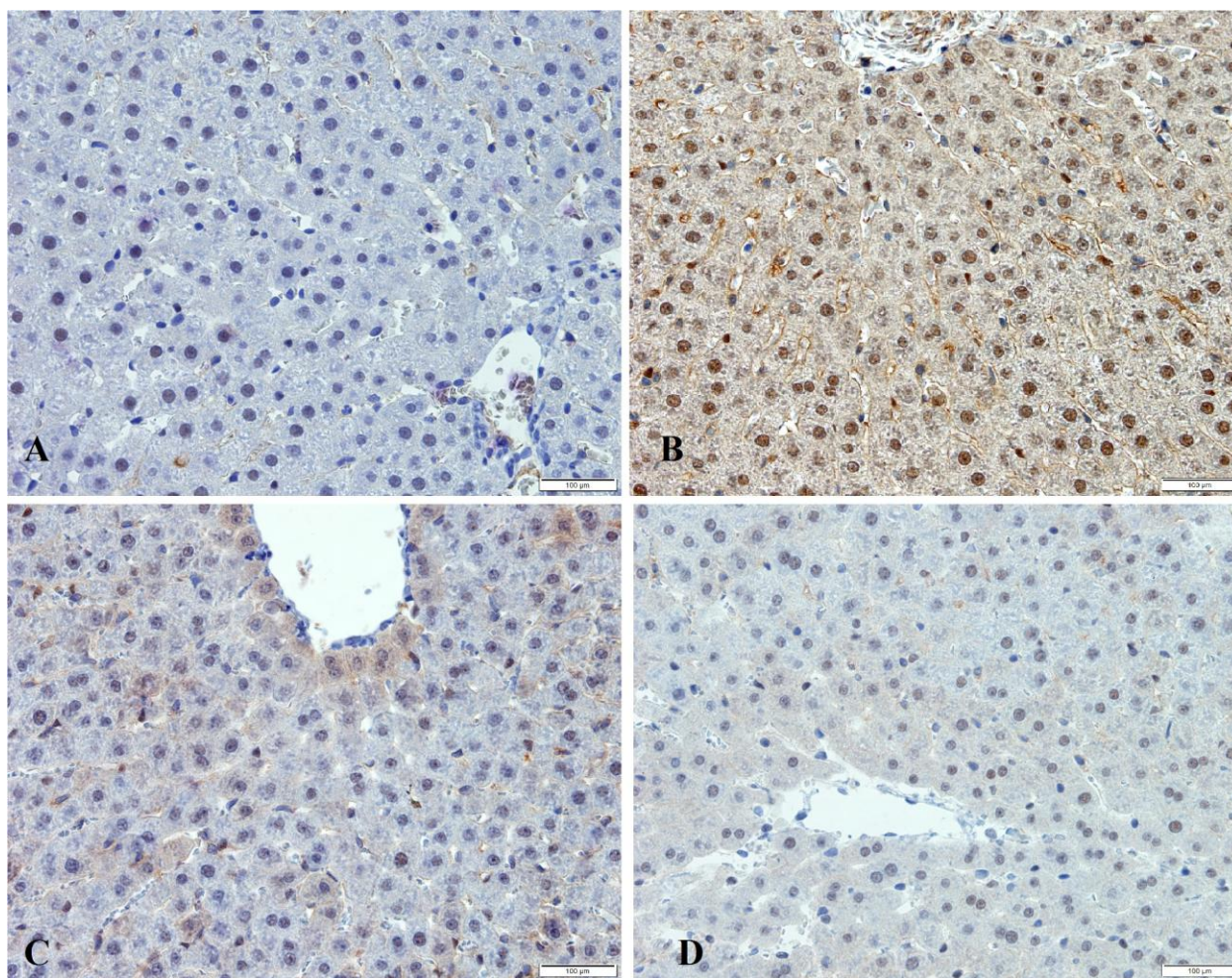
Prema *Kruskal-Wallis* testu za jednofaktorsku analizu višestrukih uzoraka, utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike u ekspresiji FXR kod analiziranih oglednih grupa ($F=23.628$, $n=8$, $p=0.003$). Ekspresija FXR se značajno razlikuje između grupa A i AE ($MW=0.000$, $p=0.016$; $KS=1.491$, $p=0.023$) Grupa AE-UDK ima značajno promenjenu ekspresiju FXR u odnosu na AE ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$), ali je još uvek različita i od ekspresije FXR u K1 ($MW=0.000$, $p=0.016$; $KS=1.491$, $p=0.023$).



Grafik 15. Ekspresija FXR u tkivu jetre jedinki sa aloksanskim dijabetesom.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1

- statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE



Slika 56. Ekspresija FXR kod jedinki sa aloksanskim dijabetesom (40x).

Legenda: A- grupa A (Alx); B- grupa AE (Alx+EE); C- grupa E-UDK (Alx+EE+UDK); D- grupa E-MK (Alx+EE+MK).

Analizom parametra FXR%, *Kruskal-Wallis* testom, potvrđena je statistička značajnost ustanovljenih razlika (KW=24.717, n=8, p=0.002) (Tabela 26). Grupa AE je značajno više imala veliku procentualnu zastupljenost FXR⁺ hepatocita u odnosu na K1 i A grupe (MW=0.000, p=0.016; KS=1.491, p=0.023). Primenom UDK i MK je značajno smanjen procenat FXR pozitivnih hepatocita u odnosu na AE grupu (AE-UDK grupa: MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013; grupa AE-MK: MW=2.500, p=0.032), ali kod AE-UDK grupe još uvek postoji značajna razlika u odnosu na K1 (MW=0.500, p=0.016).

Tabela 26. Zastupljenost FXR pozitivnih hepatocita.

FXR %	A	AE *	AE-UDK * #	AE-MK #
1-25%	100%	0	60%	60%
26-50%	0	0	20%	20%
51-75%	0	0	20%	0
76-100%	0	100%	0	20%

Legenda: * - statistički značajna razlika u poređenju sa grupom K1
#- statistički značajna razlika u poređenju sa grupom AE

Kakav je bio intenzitet bojenja u FXR pozitivnim hepatocitima, prikazano je u Tabeli 27. Man-Whitney U testom je utvrđena statistička značajnost razlika između grupe AE i AE-UDK (MW=0.000, p=0.008). Nisu utvrđene značajne razlike između AE-UDK i AE-MK grupa u poređenju sa kontrolnom K1 grupom.

Tabela 27. Intenzitet bojenja u FXR pozitivnim hepatocitima.

FXR int	A	AE	AE-UDK #	AE-MK
slab	100%	80%	20%	20%
umeren	0	0	40%	20%
jak	0	20%	40%	60%

Legenda: # - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE

Ispitivanjem povezanosti vrednosti promene koncentracije šećera u krvi nakon tretmana žučnim kiselinama i ekspresije FXR, uočeno je da u grupi jedinki tretiranih jednokratnom dozom aloksana, postoji jaka negativna korelacija, što se menja u grupama gde je primenjen i EE. U AE i AE-MK postoji jaka pozitivna korelacija, a u grupi AE-MK jačina korelacije je takva da se ne odnosi samo na posmatrani uzorak, već se može generalizovati (Tabela 28).

Tabela 28. Pravac i intenzitet korelacije između ekspresije FXR i promene koncentracije šećera u krvi.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
ŠUK	Jaka negativna R= -0.87 p=0.058 KD=75.69%	Jaka pozitivna R=0.87 p=0.058 KD=75.69%	Zanemarljiva R= -0.05 p=0.933 KD=0.25%	Jaka pozitivna R=0.89 p=0.041 KD=79.21%

U Tabeli 29, navedene su korelacije ekspresije FXR i parametara jetrene funkcije, ispitane *Spearman* testom. Korelacije u A grupi su zanemarljive, te nisu navedene. Korelacije FXR ekspresije i ekspresije Ki-67, odnosno markera apoptoze je zanemarljiva.

Tabela 29. Pravac i jačina korelacije ekspresije FXR i praćenih parametara jetrene funkcije.

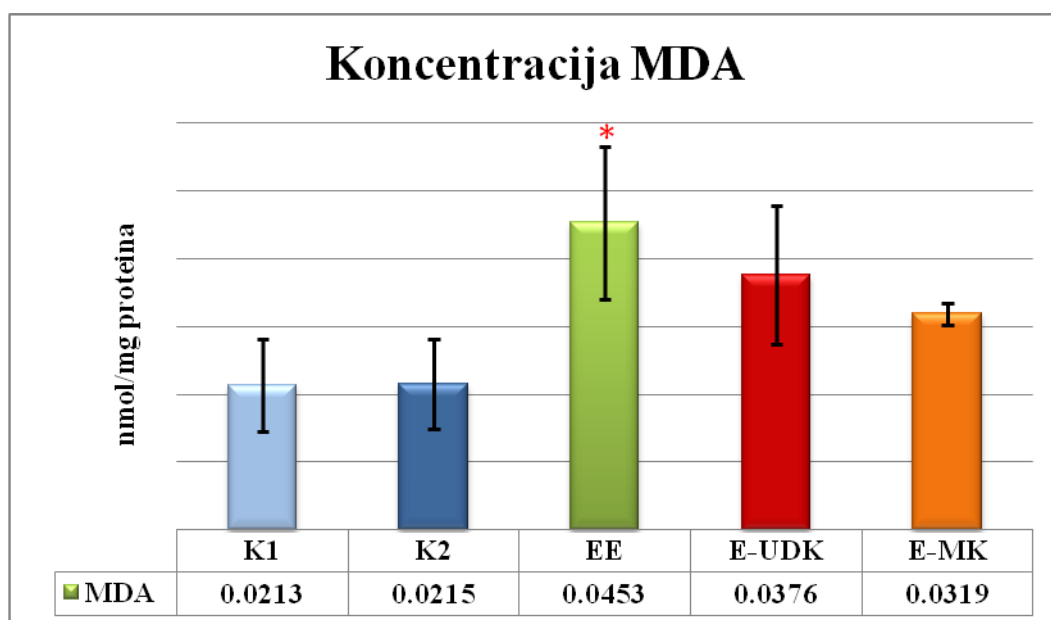
	A	AE	AE-UDK	AE-MK
<u>AST</u>	-	-	-	Jaka pozitivna R=0.78 p=0.118 KD=60.84%
<u>ALT</u>	-	Slaba pozitivna R=0.15 p=0.812 KD=2.25%	Jaka pozitivna R=0.86 p=0.058 KD=73.96%	-
<u>γ-GT</u>	-	-	Jaka pozitivna R=0.74 p=0.148 KD=54.76%	Srednja pozitivna R=0.32 p=0.596 KD=10.24%
<u>BLRu</u>	-	Slaba pozitivna R=0.29 p=0.638 KD=8.41%	Srednja pozitivna R=0.37 p=0.541 KD=13.69%	Jaka pozitivna R=0.52 p=0.373 KD=27.04%
<u>BLRd</u>	-	-	-	Srednja pozitivna R=0.32 p=0.596 KD=10.24%

4.6. Ispitivanje intenziteta lipidne peroksidacije i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite

4.6.1. Koncentracija malonilaldehida

4.6.1.1. Koncentracija malonilaldehida u jetri životinja koje nisu tretirane aloksanom

U cilju ispitivanja intenziteta lipidne peroksidacije, merena je koncentracija malonilaldehida u homogenatu jetre oglednih životinja. Na Grafiku 16 prikazane su koncentracije MDA u oglednim grupama.



Grafik 16. Koncentracija MDA ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1 i K2

Vrednost medijane, kao i aritmetička sredina najveća je u grupi EE, a najmanja u grupi E-MK (Tabela 29). Prema *Kruskal-Wallis* testu za celokupan uzorak, utvrđeno je da se izmerene vrednosti koncentracije MDA statistički značajno razlikuju ($KW=33.628$, $n=8$, $p=0.000$). Koncentracija MDA je značajno viša u grupi tretiranoj samo etinilestradiolom u odnosu na grupe K1 i K2 ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$). Kod jedinki tretiranih ursodeoksiholnom (E-UDK) i monoketoholnom kiselinom (E-MK) došlo je do smanjenja koncentracije MDA, tako da se statistički ne razlikuju od kontrolne grupe.

Tabela 29. Deskriptivni pokazatelji koncentracije MDA.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
Minimum	0,0119	0,0117	0,0326	0,0220	0,0295
Maksimum	0,0269	0,0269	0,0608	0,0475	0,0334
Medijana	0,0255	0,0247	0,0453	0,0360	0,0327
Raspon	0,0149	0,0151	0,0282	0,0255	0,0039
Varijansa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

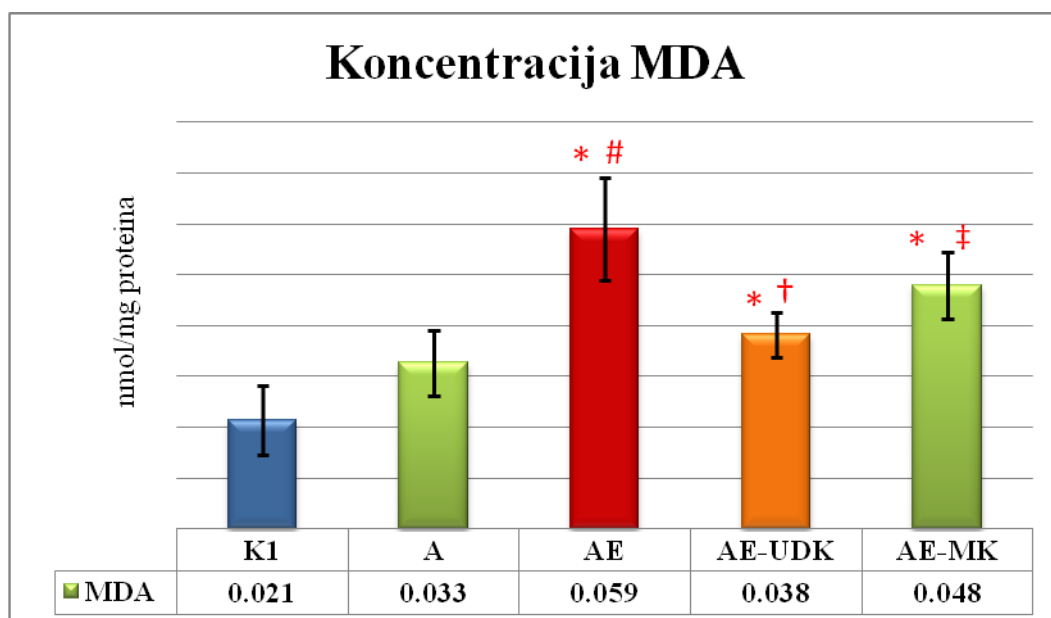
Testom korelacije, ispitana je povezanost koncentracije MDA i promene svih parametara praćenih u ovom istraživanju, što je predstavljeno u Tabeli 30.

Tabela 30. Korelacija koncentracije MDA i ispitivanih parametara

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
<u>AST</u>	Jaka pozitivna	Srednja pozitivna	Slaba pozitivna	Jaka pozitivna	Jaka pozitivna
	R=0.70,	R=0.30,	R=0.20	R=0.50	R=0.80
	p=0.188,	p=0.624	p=0.747	p=0.391	p=0.104
	KD=49%	KD=9%	KD=4%	KD=25%	KD=64%
<u>ALT</u>				Slaba pozitivna	
				R=0.20	
				p=0.741	
			KD=4%		
<u>γ-GT</u>					Srednja pozitivna
					R=0.45
					p=0.450
					KD=20.25%
<u>BLR u</u>		Slaba pozitivna	Jaka pozitivna	Slaba pozitivna	Slaba pozitivna
		R=0.16	R=0.50	R=0.22	R=0.15
		p=0.800	p=0.391	p=0.718	p=0.805
		KD=2.56%	KD=25%	KD=4.84%	KD=225%
<u>BLR d</u>				Slaba pozitivna	
				R=0.22	
				p=0.718	
			KD=4.84%		

4.6.1.2. Koncentracija malonilaldehida u jetri životinja sa aloksanskim dijabetesom

Koncentracije MDA između analiziranih grupa se statistički značajno razlikuju (KW=33.628, n=8, p=0.000). U odnosu na grupe K1 i K2, koncentracija MDA u grupi A ne pokazuje značajne razlike, što nije slučaj sa AE grupom. AE grupa ima značajno više koncentracije MDA u odnosu na grupe K1, K2 i grupu A (grupe K1 i K2: MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013; grupa A: MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013) (Grafik 17). Primenom UDK, koncentracija malonilaldehida se značajno smanjila u odnosu na grupu AE (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013). Razlike u koncentraciji između AE-UDK i A grupe nisu statistički značajne, ali je koncentracija MDA u AE-UDK grupi i dalje značajno viša u odnosu na grupe K1 i K2 (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013).



Grafik 17. Koncentracija MDA ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1 i K2
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu A
† - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE
‡ - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE-UDK

Primenom monoketoholne kiseline, koncentracija malonilaldehida je snižena u odnosu na AE grupu, ali ta razlika nije statistički značajna. Bez obzira na pad koncentracije MDA u AE-MK grupi, ona je i dalje značajno viša u poređenju sa grupama K1 i K2, grupu A

i grupu AE-UDK (grupa K1 i K2: MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013; grupa A: MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013; grupa AE-UDK: MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013).

Tabela 31. Deskriptivni pokazatelji koncentracije MDA.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
Minimum	0,0230	0,0487	0,0332	0,0432
Maksimum	0,0392	0,0723	0,0421	0,0573
Medijana	0,0355	0,0533	0,0411	0,0433
Raspon	0,0163	0,0236	0,0089	0,0141
Varijansa	0,000	0,000	0,000	0,000

Odgovarajućim testom, ispitano je postojanje korelacije koncentracije MDA i pokazatelja jetrene funkcije u grupama jedinki sa aloksanskim dijabetesom (Tabela 32).

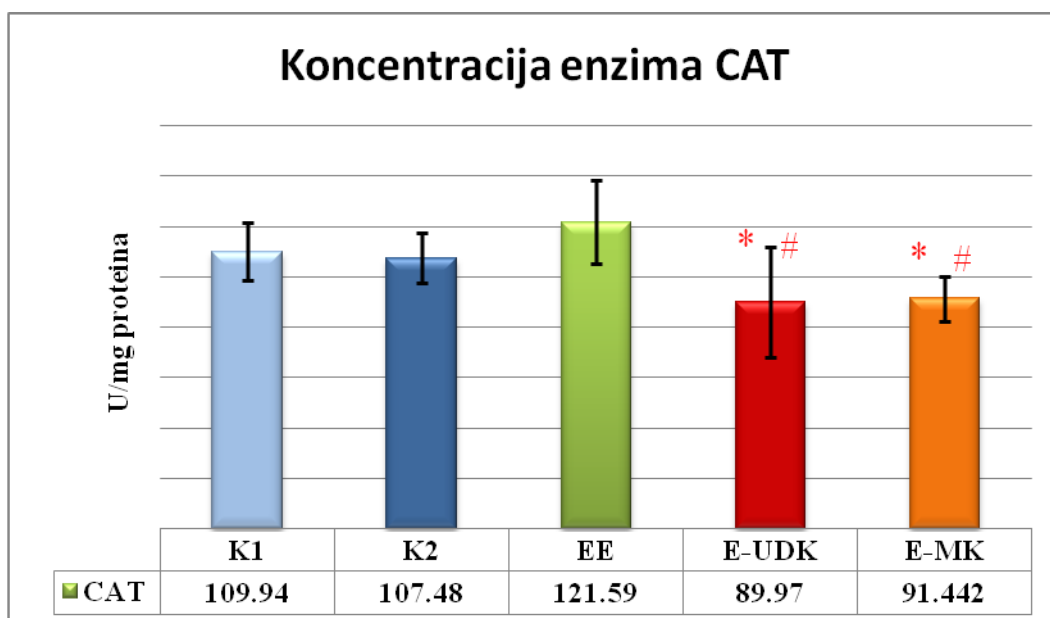
Tabela 32. Korelacija između koncentracije MDA i praćenih parametara.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
ŠUK	Slaba pozitivna R=0.15, p=0.805 KD=% 2,25	Srednja pozitivna R=0.30, p=0.624 KD=9%		
AST			Slaba pozitivna R=0.15, p=0.805 KD=2.25%	
ALT		Jaka pozitivna R=0.97, p=0.005 KD=94.09%)		
γ-GT				Jaka pozitivna R=0.58, p=0.308 KD=33.64%
BLR u				Jaka pozitivna R=0.67, p=0.219 KD=44.89%
BLR d	Jaka pozitivna R=0.67, p=0.215 KD=44.89%	Jaka pozitivna R=0.67, p=0.215 KD=44.89%	Jaka pozitivna R=0.72, p=0.172 KD=51.84%	Jaka pozitivna R=0.87, p=0.058 KD=75.69%

4.6.2. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri životinja koje nisu tretirane aloksanom

4.6.2.1. Aktivnost enzima katalaze (CAT)

Specifična aktivnost enzima katalaze u jetri životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (K1), propilen glikolom (K2), etinilestradiolom (EE) i etinilestradiolom uz aplikaciju žučnih 18kiselina (E-UDK i E-MK), prikazana je na Grafiku 18. Analizom datih vrednosti *Kruskal-Wallis* testom za celokupan uzorak, ustanovljeno je da su postojeće razlike u aktivnosti enzima statistički značajne ($F=29.709$, $n=8$, $p=0.000$).



Grafik 18. Koncentracija enzima CAT ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1 i K2
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu EE

Aktivnost enzima CAT je porasla u jetri jedinki tretiranih etinilestradiolom (EE) u poređenju sa jedinkama koje su primale fiziološki rastvor (K1) i propilen glikol (K2), ali ova razlika nije statistički značajna. Primena UDK i MK je dovela do statistički značajno nižih koncentracija enzima katalaze u poređenju sa grupom EE ($MW=1.000$, $p=0.016$). Aktivnost katalaze u E-UDK i E-MK grupama je čak značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu (K1) i grupu K2 ($MW=2.000$, $p=0.032$).

Tabela 33. Deskriptivni pokazatelji koncentracije enzima CAT.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
Minimum	0,0119	0,0151	0,0326	0,0220	0,0295
Maksimum	0,0269	0,2686	0,0608	0,0475	0,0334
Medijana	0,0255	0,0247	0,0453	0,0360	0,0327
Raspon	0,0149	0,0151	0,0282	0,0255	0,0039
Varijansa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Posmatranjem statističkih deskriptivnih pokazatelja aktivnosti enzima katalaze u oglednim grupama tretiranih etinilestradiolom, vidi se da je medijana najviša u EE grupi, ali je za razliku od aritmetičke sredine najniža u K2 i K1 grupi (Tabela 33). Raspon izmerenih vrednosti je najveći u EE grupi, a najmanji u grupi E-MK.

Spearman testom korelacije, ustanovljeno je da u EE grupi postoji pozitivna korelacija između aktivnosti enzima CAT i sledećih parametara: AST ($R=0.1$, $p=0.873$, $KD=1\%$), ALT ($R=0.9$, $p=0.037$, $KD=81\%$), γ -GT ($R=0.35$, $p=0.559$, $KD=12.25\%$) i BLRu ($R=0.3$, $p=0.624$, $KD=9\%$).

U grupi E-UDK, pozitivna korelacija postoji između aktivnosti CAT i ALT ($R=0.1$, $p=0.870$, $KD=1\%$), γ -GT ($R=0.29$, $p=0.638$, $KD=8.41\%$), BLRu ($R=0.32$, $p=0.604$, $KD=10.24\%$). U odnosu na ekspresiju Ki-67 ustanovljena je negativna korelacija sa aktivnošću CAT ($R=-0.45$, $p=0.553$, $KD=20.25\%$).

Aktivnost CAT u grupi E-MK pokazuje pozitivnu korelaciju sa ALT ($R=0.2$, $p=0.741$, $KD=4\%$) i BLRu ($R=0.67$, $p=0.219$, $KD=44.89\%$).

4.6.2.2. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px)

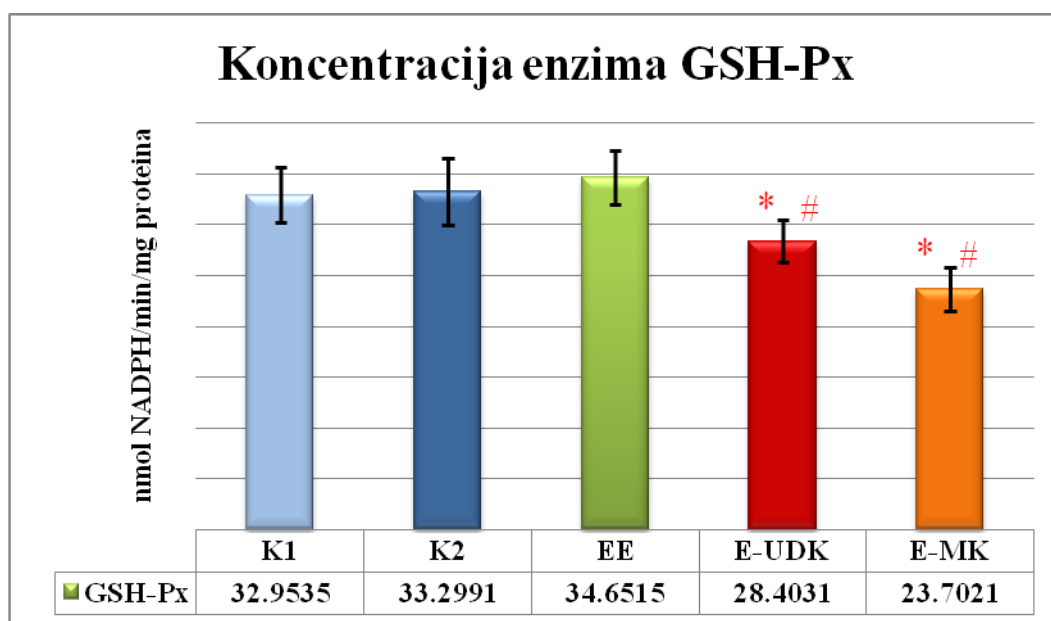
Deskriptivni statistički pokazatelji aktivnosti enzima GSH-Px prikazani su u Tabeli 34.

Tabela 34. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima GSH-Px.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
Minimum	28,9168	28,7963	31,7567	25,7228	20,8626
Maksimum	35,9885	37,5687	38,7326	31,2209	26,0632
Medijana	33,2991	33,2991	33,8579	28,2584	24,1128
Raspon	7,0716	8,7724	6,9758	5,4981	5,2006
Varijansa	7,335	10,694	7,234	4,211	4,521

Specifična aktivnost enzima glutation peroksidaze pokazuje statistički značajne razlike u analiziranim grupama, što je utvrđeno *Kruskal-Wallis* testom za celokupan uzorak (KW=32.695, n=8, p=0.000).

Aktivnost enzima glutation peroksidaze u jetri jedinki tretiranih etinilestradiolom je viša nego u kontrolnoj grupi K1 i grupi K2, ali ova razlika nije statistički značajna. Jedinke koje su primale preparat ursodeoksiholne kiseline imale su značajno nižu aktivnost GSH-Px u odnosu na jedinke grupe EE (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013) ali i od jedinki kontrolne grupe i grupe K2 (MW=2.000, p=0.032). Isti je slučaj i nakon primene monoketoholne kiseline uz etinilestradiol. Aktivnost enzima GSH-Px je značajno niža od aktivnosti istog enzima u grupama EE (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013), K1 i K2 (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013). 4.6.2.3. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GSH-R) u jetri životinja sa holestazom



Grafik 19. Koncentracija enzima GSH-Px ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1 i K2
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu EE

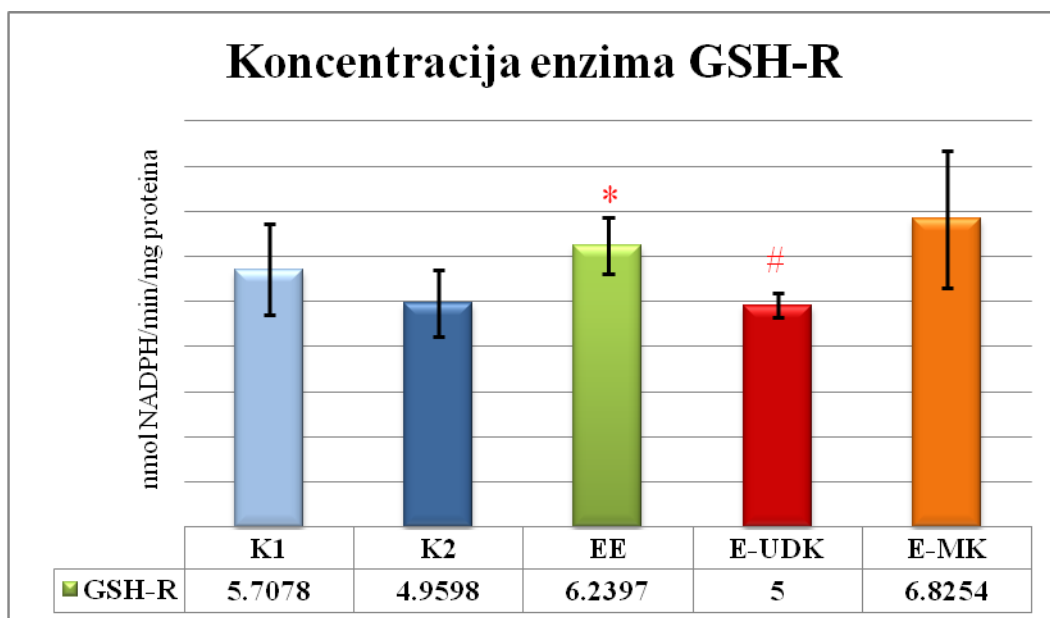
Ispitivanjem korelacije aktivnosti enzima GSH-Px, ustanovljeno je da u EE grupi postoji jaka pozitivna korelacija sa koncentracijom AST (R=0.50, p=0.391, KD=25%) i slaba pozitivna korelacija sa koncentracijom direktnog bilirubina (R=0.26, p=0.668, KD=6.76%).

U grupi E-UDK koncentracija GSH-Px je u jakoj pozitivnoj korelaciji sa telesnom masom jedinki na kraju ogleda ($R=0.9$, $p=0.037$, $KD=81\%$). Jačina korelacije je takva da se može uopštiti na celu populaciju. U odnosu na parametre jetrene funkcije ustanovljene su sledeće vrednosti testa korelacije: AST ($R=-0.3$, $p=0.624$, $KD=9\%$), ALT ($R=0.87$, $p=0.054$, $KD=75.69\%$) i γ -GT ($R=0.29$, $p=0.638$, $KD=8.41\%$). Negativna korelacija, dovoljne jačine da se može uopštiti na celu populaciju, utvrđena je između aktivnosti GSH-Px i ekspresije Ki-67 ($R=0.89$, $p=0.041$, $KD=79,21\%$).

Aktivnost enzima u grupi E-MK je u pozitivnoj korelaciji sa sledećim parametrima jetrene funkcije: γ -GT ($R=0.45$, $p=0.45$, $KD=20.25\%$), BLRu ($R=0.67$, $p=0.219$, $KD=44.89\%$) i BLRd ($R=0.63$, $p=0.252$, $KD=39.69\%$).

4.6.2.3. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GSH-R)

Specifična aktivnost enzima GSH-R u jetri životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (K1), propilen glikolom (K2), etinilestradiolom (EE) i etinilestradiolom uz aplikaciju žučnih kiselina (E-UDK i E-MK), prikazana je na Grafiku 20. Izmerene vrednosti u analiziranim grupama se međusobno značajno razlikuju ($KW=26.215$, $n=8$, $p=0.001$).



Grafik 20. Koncentracija enzima GSH-R ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1 i K2
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu EE

Aktivnost GSH-R kod jedinki tretiranih etinilestradiolom je značajno viša u odnosu na jedinke grupe K1 i K2 (MW=2.000, p=0.032). UDK je snizila aktivnost GSH-R značajno u odnosu na EE grupu (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013), a nema značajnosti razlike u odnosu na K1 i K2. Primena monoketoholne kiseline nije dovela do statistički značajnih razlika u aktivnosti GSH-R u odnosu na EE grupu. Takođe, aktivnost GSH-R u E-MK grupi nije statistički značajno viša u poređenju sa kontrolnom grupom K1. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima glutation reduktaze predstavljeni su u Tabeli 35.

Tabela 35. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima GSH-R.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
Minimum	4,1050	4,1050	5,5602	4,5608	5,1809
Maksimum	6,5176	5,9912	7,1959	5,1787	8,6808
Medijana	5,9912	4,6644	6,1638	5,0082	7,4795
Raspon	2,4126	1,8861	1,6357	0,6180	3,4999
Varijansa	1,010	0,558	0,384	0,077	2,327

Aktivnost GSH-R pokazuje srednje jaku pozitivnu korelaciju u EE grupi sa koncentracijom AST (R=0.3, p=0.624, KD=9%) i BLRd (R=0.26, p=0.668, KD=6.76%).

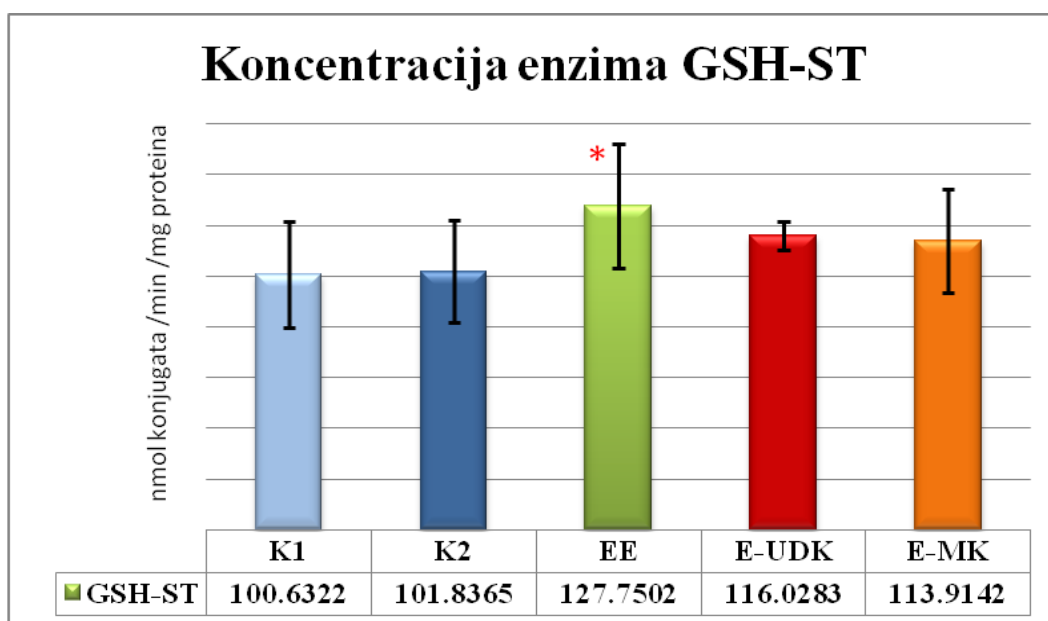
U grupi E-UDK aktivnost GSH-R je u jakoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom γ -GT (R=0.87, p=0.058, KD=75.69%). U odnosu na koncentraciju AST postoji srednje jaka pozitivna korelacija (R=0.3, p=0.624, KD=9%), a sa koncentracijom direktnog bilirubina slaba pozitivna korelacija (R=0.11, p=0.858, KD=1.21%). Jaka negativna korelacija utvrđena je između aktivnosti GSH-R i ekspresije Ki-67 (R=-0.89, p=0.106, KD=79,21%).

Aktivnost enzima u grupi E-MK je u jakoj pozitivnoj korelaciji sa telesnom masom jedinki na kraju ogleđa (R=0.92, p=0.026, KD=84.64%). Jačina korelacije je takva da se može uopštiti na celu populaciju. Od parametara jetrene funkcije, u pozitivnoj je korelaciji sa BLRu (R=0.82, p=0.092, KD=67.24%) i BLRd (R=0.11, p=0.863, KD=1.21%).

4.6.2.4. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GSH-ST)

Specifična aktivnost enzima glutation-S-transferaze u jetri životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (K1), propilen glikolom (K2), etinilestradiolom (EE) i etinilestradiolom uz aplikaciju žučnih kiselina (E-UDK i E-MK), pokazuje statistički značajne razlike (KW=27.621, n=8, p=0.001). Primenom *Mann-Whitney U* testa i *Kolmogorov-Smirnov* testa

analizirano je između kojih grupa tačno postoji ili ne postoji statistička značajnost uočenih razlika. Aktivnost enzima GSH-ST u EE grupi je značajno viša nego u grupama K1 i K2 (MW=2.000, p=0.032). Primena urodeoksiholne i monoketoholne kiseline je dovela do pada aktivnosti GSH-ST, ali ove vrednosti ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na grupu EE, K1 i K2.



Grafik 21. Koncentracija enzima GSH-ST ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1 i K2

Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima GSH-ST predstavljeni su u Tabeli 34.

Tabela 34. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima GSH-ST.

	K1	K2	EE	E-UDK	E-MK
Minimum	78,7412	74,1014	99,8420	107,2372	88,7180
Maksimum	124,3133	122,1475	166,4168	122,8434	141,8750
Medijana	89,8857	104,9687	126,1818	116,4210	116,3590
Raspon	45,5720	48,0461	66,5748	15,6062	53,1570
Varijansa	444,032	409,501	603,753	31,598	412,482

Aktivnost enzima GSH-ST u jetri jedinki grupe EE je u jakoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom enzima ALT u jetri na kraju oglada ($R=0.9$, $p=0.037$, $KD=81\%$), a jačina korelacije je takva da se može uopštiti na celu populaciju. Jaka pozitivna korelacija postoji i između aktivnosti GSH-ST i koncentracije enzima γ -GT ($R=0.71$, $p=0.182$, $KD=50.41\%$).

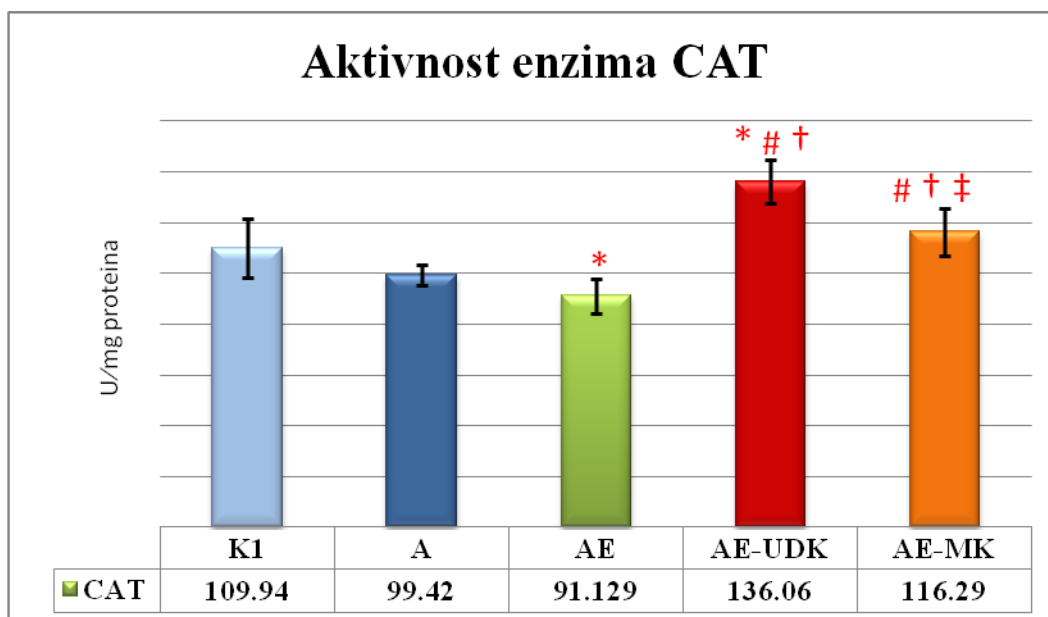
U grupi E-UDK, aktivnost enzima GSH-ST je u jakoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom enzima AST ($R=0.9$, $p=0.037$, $KD=81\%$) i BLRd ($R=0.89$, $p=0.041$, $KD=79.21\%$). U oba slučaja, jačina utvrđene korelacije je takva da se može uopštiti na celu populaciju. Slaba pozitivna korelacija postoji u odnosu na koncentraciju γ -GT ($R=0.29$, $p=0.638$, $KD=8.41\%$). U grupi E-MK potvrđena je samo jaka pozitivna korelacija sa koncentracijom ALT ($R=0.72$, $p=0.172$, $KD=51.48\%$).

4.6.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri životinja sa aloksanskim dijabetesom

4.6.3.1. Aktivnost enzima katalaze (CAT)

Aktivnost enzima katalaze bila je različita u grupama tretiranim aloksanom (A), aloksanom i etinilestradiolom (AE), kao i aloksanom i etinilestradiolom uz aplikaciju žučnih kiselina (AE-UDK i AE-MK). Na osnovu rezultata *Kruskal-Wallis* testa za ceo uzorak, vidi se da su ove razlike u aktivnosti statistički značajne ($F=29.709$, $n=8$, $p=0.000$).

Aktivnost enzima CAT u grupi A ne pokazuje značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu, ali je aktivnost CAT u grupi AE značajno niža od aktivnosti u grupi K1 ($MW=1.000$, $p=0.016$) i K2 ($MW=2.000$, $p=0.032$). Razlike u aktivnosti enzima između grupe A i AE nisu statistički značajne (Grafik 22).



Grafik 22. Koncentracija enzima CAT ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1

- statistički značajna razlika u odnosu na grupu A

† - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE

‡ - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE-UDK

Primena ursodeoksiholne kiseline je pojačala aktivnost enzima CAT, i to značajno u odnosu na kontrolnu grupu K1 ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$), grupu A ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$), i grupu AE ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$,

p=0.013). Primena monoketoholne kiseline je takođe dovela do pojačane aktivnosti enzima katalaze, koja je značajno veća nego u grupama A (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013) i AE (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013). Razlika aktivnosti enzima u AE-MK grupi u odnosu na K1 grupu nije statistički značajna. Iako su obe žučne kiseline delovale stimulatивно na aktivnost katalaze, MK je dovela do značajno manjeg porasta aktivnosti enzima u odnosu na UDK (MW=1.000, p=0.016). Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima katalaze u jetri životinja sa aloksanskim dijabetesom prikazani su u Tabeli 35.

Tabela 35. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti CAT.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
Minimum	93,66	85,14	122,36	106,35
Maksimum	105,03	101,63	145,80	128,47
Medijana	100,40	88,58	137,33	115,59
Raspon	11,376	16,496	23,440	22,121
Varijansa	17,680	44,406	72,958	83,375

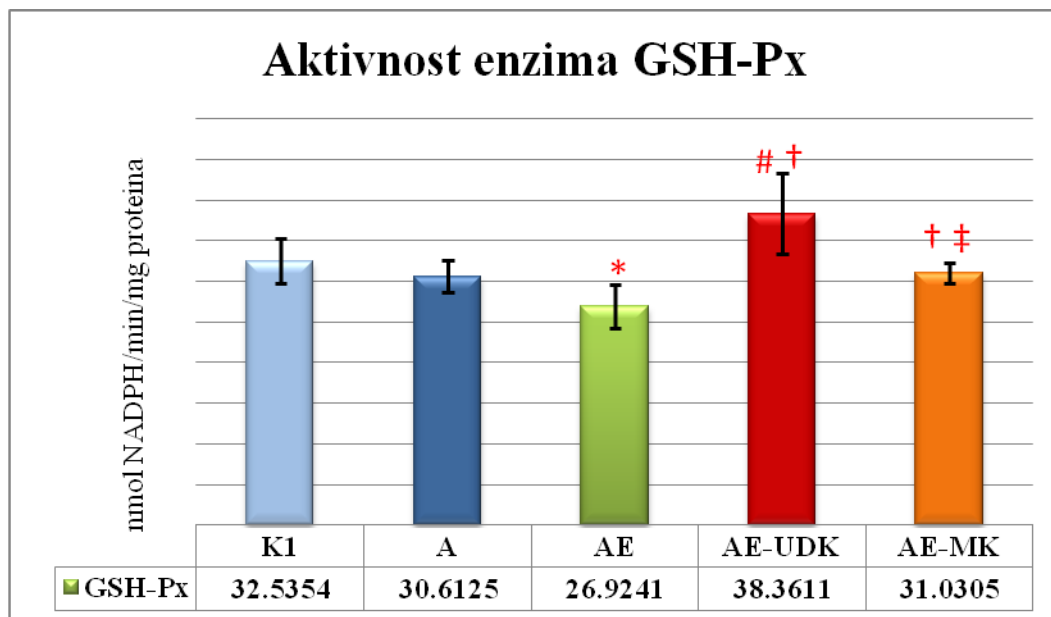
Tabela 36. Korelacije između aktivnosti enzima CAT i posmatranih parametara istraživanja.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
TM posle			Srednja pozitivna R=0.40, p=0.505 KD=16%	Srednja pozitivna R=0.30, p=0.624 KD=9%
ŠUK posle	Slaba negativna R= -0.20, p=0.741 KD=4%	Jaka negativna R= -0.50, p=0.391 KD=25%	Jaka negativna R= -0.70, p=0.188 KD=49%	Slaba negativna R= -0.20, p=0.747 KD=4%
AST	Jaka negativna R= -0.60, p=0.285 KD=36%			
ALT		Jaka negativna R= -0.67, p=0.219 KD=44.89%	Slaba negativna R= -0.10, p=0.870 KD=1%	Jaka pozitivna * R=0.97, p=0.005 KD=94.09%
γ-GT			Srednja negativna R= -0.35, p=0.559 KD=12.25%	Jaka negativna R= -0.87, p=0.058 KD=75.69%
BLRu			Potpuna negativna* R= -1.00, p=0.000 KD=100%	
BLRd		Srednja negativna R= -0.45, p=0.450 KD=20.25%		Slaba negativna R= -0.29, p=0.638 KD=8.41%

Legenda: * - jačina korelacije koja dozvoljava da se zaključak primeni na celu populaciju, a ne samo na uzorak.

4.6.3.2. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px)

Vrednosti specifične aktivnosti enzima glutation peroksidaze se razlikuju u grupama sa aloksanskim dijabetesom u zavisnosti od tretmana (Grafik 23). Prema *Kruskal-Wallis* testu za celokupan uzorak, uočene razlike pokazuju statističku značajnost ($F=32.695$, $n=8$, $p=0.000$). Značajnost razlika između pojedinih grupa ispitivana je naknadno *Mann-Whitney U* i *Kolmogorov-Smirnov* testovima.



Grafik 23. Koncentracija enzima GSH-Px ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu A
† - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE
‡ - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE-UDK

Aktivnost GSH-Px u grupi A je niža nego u kontrolnoj grupi, ali bez statističke značajnosti. Primena etinilestradiola je dodatno smanjila aktivnost GSH-Px u odnosu na kontrolnu grupu, što je uslovalo postojanje statističke značajnosti ovih razlika sa K1 i K2 grupom ($MW=1.000$, $p=0.016$). Razlike u aktivnosti između grupa A i AE nisu značajne.

Preparat ursodeoksiholne kiseline kod jedinki na ALX+EE tretmanu, doveo je do porasta aktivnosti enzima na nivo kontrolne grupe K1 sa kojom nisu utvrđene statistički značajne razlike. Aktivnost GSH-Px u AE-UDK grupi je značajno viša u odnosu na grupe A ($MW=1.000$, $p=0.016$) i AE grupu ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$).

U homogenatu jetre životinja na ALX+EE tretmanu koje su primale preparat monoketoholne kiseline, aktivnost GSH-Px je značajno viša u odnosu na grupu AE (MW=1.000, p=0.016). Usled primene MK, razlike u aktivnosti enzima u AE-MK i kontrolnoj grupi nisu statistički značajne. Iako su obe žučne kiseline dovele do porasta aktivnosti GSH-Px, porast u grupi AE-MK je značajno manji u odnosu na AE-UDK grupu (MW=1.000, p=0.016).

Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima glutation peroksidaze u jetri životinja sa aloksanskim dijabetesom prikazani su u Tabeli 37.

Tabela 37. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti GSH-Px.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
Minimum	28,3545	22,8682	31,7202	29,1435
Maksimum	33,3685	29,7734	43,7266	32,8584
Medijana	30,9228	27,4801	38,3582	31,0761
Raspon	5,0140	6,9052	12,0064	3,7149
Varijansa	3,832	7,403	24,485	1,763

Korelacija između aktivnosti GSH-Px i ŠUK na kraju ogleda ustanovljena je u grupama A i AE (grupa A: srednje jaka negativna, R=0.46, p=0.434, KD=21.16%; grupa AE: srednje jaka negativna, R=0.3, p=0.624, KD=9%).

U grupi A postoji korelacija između aktivnosti GSH-Px i γ -GT i BLRu (γ -GR: jaka negativna, R=-0.71, p=0.182, KD=50.41%; BLRu: jaka negativna, R=-0.97, p=0.005, KD=94.09%). U slučaju korelacije sa BLRu, jačina korelacije je dovoljna da se ovaj zaključak primeni na celu populaciju, a ne samo na uzorak.

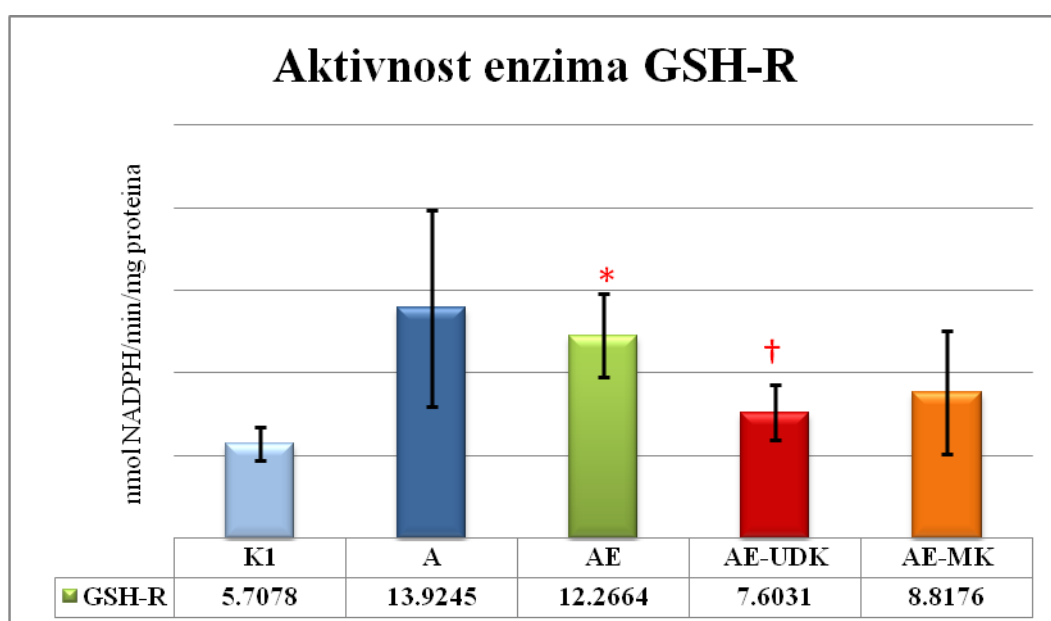
Aktivnost GSH-Px u grupi AE pokazuje potpunu negativnu korelaciju sa koncentracijom AST (R=1, p=0.000, KD=100%). Jaka negativna korelacija u ovoj grupi prisutna je i između GSH-Px i γ -GT (R=-0.58, p=0.308, KD=33.64%) i GSH-Px i Bru (R=0.7, p=0.188, KD=49%).

U grupi AE-UDK je utvrđena negativna korelacija zanemarljive jačine između aktivnosti GSH-Px i svih parametara jetrene funkcije (R=0.05, p=0.935, KD=0.25%), dok je u grupi AE-MK utvrđeno postojanje jake negativne korelacije aktivnosti GSH-Px i AST i ALT (R=0.7, p=0.188, KD=49%).

Aktivnost GSH-Px i proliferacije hepatocita posmatrane kroz ekspresiju Ki-67, pokazuje jaku pozitivnu korelaciju u grupama A i AE-MK (za obe grupe vrednosti testa su $R=0.71$, $p=0.182$, $KD=50.41\%$).

4.6.3.3. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GSH-R)

Specifična aktivnost enzima GSH-R u jetri životinja tretiranih aloksanom (Grafik 24) statistički značajno se razlikuju, što je utvrđeno *Kruskal-Wallis* testom za ceo uzorak ($F=26.215$, $n=8$, $p=0.001$).



Grafik 24. Koncentracija enzima GSH-R ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu A
† - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE
‡ - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE-UDK

Kotretman ALX+EE je doveo do značajnog porasta aktivnosti GSH-R u odnosu na kontrolnu grupu ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$). Preparat ursodeoksiholne kiseline kod jedinki na ALX+EE tretmanu, doveo je do smanjenja aktivnosti enzima do nivoa kontrolne grupe K1 sa kojom nisu utvrđene statistički značajne razlike. U odnosu na grupu AE, UDK je značajno smanjila aktivnost enzima GSH-R ($MW=0.000$, $p=0.008$; $KS=1.581$, $p=0.013$).

Monoketoholna kiselina kod jedinki na ALX+EE tretmanu dovela je do pada aktivnosti GSH-R na nivo kontrolne grupe, sa kojom nema statistički značajnih razlika. Nije ustanovljena ni statistička značajnost razlika u aktivnosti GSH-R između AE-MK i AE-UDK grupe.

Deskriptivni pokazatelji aktivnosti enzima GSH-R u jetri životinja sa aloksanskim dijabetesom prikazani su u Tabeli 38.

Tabela 38. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti GSH-R.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
Minimum	5,2568	9,9023	5,3466	3,6460
Maksimum	20,7692	16,0612	9,8344	13,1533
Medijana	15,8999	12,0968	7,6211	8,2454
Raspon	15,5124	6,1589	4,4878	9,5073
Varijansa	35,172	6,328	2,749	13,855

Korelacija između aktivnosti GSH-R i ŠUK posle tretmana, potvrđena je Spearmanovim testom u grupi AE (srednje jaka pozitivna, $R=0.3$, $p=0.624$, $KD=9\%$), dok je u ostalim grupama zanemarljiva.

Aktivnost GSH-R i koncentracija ALT su u jakoj korelaciji u svim grupama sa dijabetesom (grupa A: $R=0.36$, $p=0.553$, $KD=12.96\%$; grupa AE: $R=0.67$, $p=0.219$, $KD=44.89\%$; grupa AE-UDK: $R=0.62$, $p=0.269$, $KD=38.44\%$; grupa AE-MK: $R=0.72$, $p=0.172$, $KD=51.84\%$). Nije uočena značajna korelacija aktivnosti GSH-R i koncentracije AST.

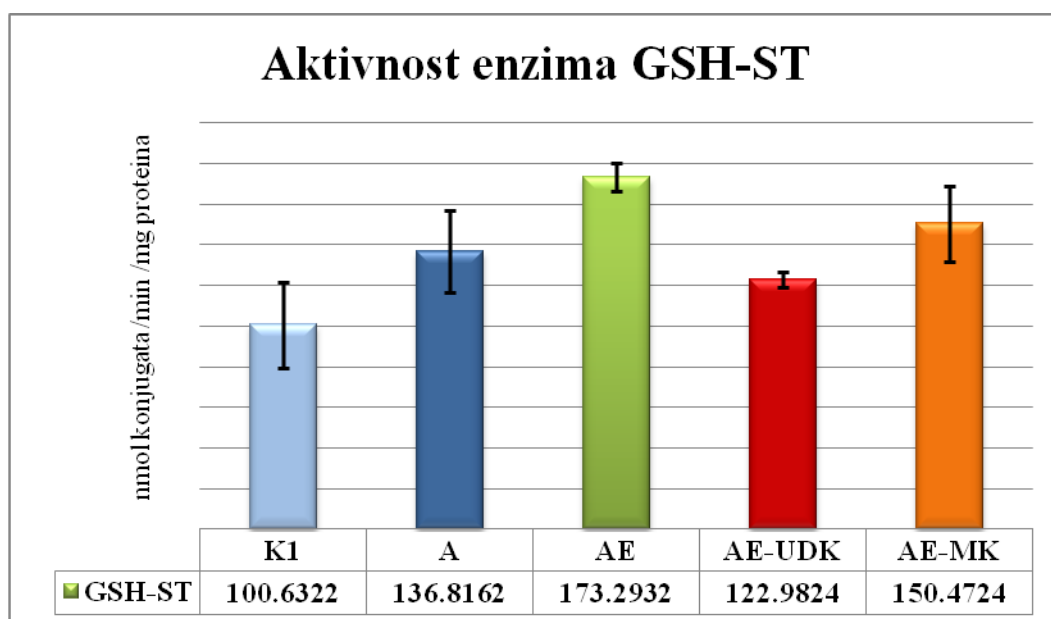
Sa koncentracijom γ -GT i BLRu postoji korelacija samo u grupi A (γ -GT: jaka pozitivna, $R=0.71$, $p=0.182$, $KD=50.41\%$; BLRu: $R=0.56$, $p=0.322$, $KD=31.36\%$). U poređenju sa BLRd korelacija je prisutna samo kod AE grupe, i to pozitivna korelacija dovoljne jačine da se uopšti na celu populaciju ($R=0.89$, $p=0.041$, $KD=79.21\%$).

Aktivnost GSH-R i proliferacija hepatocita pokazuju prisustvo jake negativne korelacije u grupama A i AE-MK (za obe grupe vrednost testa je $R=0.71$, $p=0.182$, $KD=50.41\%$).

4.6.3.4. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GSH-ST)

Aktivnost enzima glutation-S-transferaze razlikuje se u grupama jedinki sa aloksanskim dijabetesom. Najviša aktivnost zabeležena je kod jedinki na ALX+EE tretmanu, a najniža kod jedinki koje su pored ALX+EE tretmana primale preparat ursodeoksiholne kiseline (Grafik 25).

Statističkim testom koji analizira ceo uzorak posmatranih grupa, potvrđena je značajnost razlika u aktivnosti enzima GSH-ST (KW=27.621, n=8, p=0.001).



Grafik 25. Koncentracija enzima GSH-ST ($\bar{x} \pm SD$) u homogenatu jetre.

Legenda: * - statistički značajna razlika u odnosu na grupu K1
- statistički značajna razlika u odnosu na grupu A
† - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE
‡ - statistički značajna razlika u odnosu na grupu AE-UDK

Značajan porast aktivnosti GSH-ST u odnosu na kontrolu (K1) uočen je u grupi koja je primila samo jednokratnu dozu aloksana (MW=2.000, p=0.032), kao i kod jedinki na ALX+EE tretmanu (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013). Između ove dve grupe (A i AE) razlika u aktivnosti GSH-ST pokazuje statističku značajnost (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013). Ako se aktivnost GSH-ST poredi sa aktivnošću enzima u grupi gde je

primenjen samo EE, A grupa ne pokazuje značajne razlike, dok AE grupa pokazuje značajno višu aktivnost enzima (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013).

Preparat ursodeoksiholne kiseline je snizio aktivnost enzima, dovodeći je na nivo kontrolne grupe, sa kojom ne postoje statistički značajne razlike. U poređenju sa AE grupom, aktivnost GSH-ST je značajno niža u AE-UDK grupi (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013).

Monoketoholna kiselina je dovela do statistički značajnog smanjenja aktivnosti GSH-ST u poređenju sa AE grupom (MW=1.000, p=0.016). Razlike u aktivnosti enzima u poređenju sa grupom A nisu statistički značajne, ali je aktivnost GSH-ST u AE-MK grupi i dalje značajno viša u pređenju sa kontrolnom grupom (MW=0.000, p=0.008; KS=1.581, p=0.013). Kako obe ŽK dovode do pada aktivnosti enzima, poređenjem aktivnosti enzima u AE-UDK i AE-MK grupama, došlo se do podatka da je AE-UDK doveća do značajnijeg pada aktivnosti GSH-ST.

Desriptivni statistički pokazatelji aktivnosti enzima GSH-ST, ukazuju na ujednačen odgovor životinja na tretman u AE i AE-UDK grupama s obzirom na male vrednosti standardne devijacije, varijanse i raspona (Grafik 25, Tabela 39).

Tabela 39. Deskriptivni pokazatelji aktivnosti GSH-ST.

	A	AE	AE-UDK	AE-MK
Minimum	105,1460	167,2660	120,2580	125,6720
Maksimum	159,2900	181,3010	128,3530	167,3600
Medijana	142,1790	169,4990	121,0600	161,4470
Raspon	54,1440	14,0350	8,0950	41,6880
Varijansa	414,758	46,019	12,748	341,086

Jaka pozitivna korelacija između aktivnosti GSH-ST i koncentracije ŠUK na kraju ogleđa, postoji u grupama A, AE i AE-MK (grupa A: R=0.56, p=0.322, KD=31.36%; grupa AE: R=0.8, p=0.1104, KD=64%; AE-MK: R=0.7, p=0.188, KD=49%).

Koncentracija ALT i aktivnost GSH-ST u jakoj su pozitivnoj korelaciji u grupama A, AE i AE-UDK (za sve grupe vrednost testa je R=0.67, p=0.219, KD=44.89%). Samo u grupama A i AE-UDK postoji jaka korelacija koncentracije γ -GT i GSH-ST (za obe grupe vrednost testa je R=0.71, p=0.182, KD=50.41%). Korelacija GSH-ST i drugih parametara jetrene funkcije kod dijabetičnih jedinki je slaba do zanemarljiva.

Aktivnost GSH-ST i proliferacija hepatocita pokazuju prisustvo jake negativne korelacije u grupama A i AE-MK (za obe grupe vrednost testa je $R=0.71$, $p=0.182$, $KD=50.41\%$).

5. Diskusija

5.1. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na telesnu masu životinja

Jetra je organ koji ima centralnu ulogu u metabolizmu, varenju, detoksikaciji i eliminaciji supstanci iz organizma.

Osnovne uloge jetre su:

- metabolizam osnovnih jedinjenja (sinteza najvećeg broja proteina, metabolizam glukoze i lipida),
- skladištenje supstanci (depo glikogena, masti, vitamina-A, D, E, K, B12),
- sinteza žučnih kiselina,
- biotransformacija endogenih supstanci, lekova i toksina (143).

Iz navedenog je jasno da bilo koji faktor koji utiče na rad jetre, odnosno na funkciju hepatocita, u velikoj meri može uticati i na opšte stanje i telesnu masu organizma.

U sprovedenom ogledu tretman eksperimentalnih životinja prooksidativnim supstancama, imao je uticaja na vrednosti telesne mase. Poredeći telesnu masu na početku i na kraju oglada kod životinja tretiranih etinilestradiolom (EE) utvrđeno je statistički značajno smanjenje telesne mase, za razliku od kontrolne grupe (tretirane fiziološkim rastvorom) gde je utvrđen statistički značajan porast telesne mase na kraju oglada. Podaci o uticaju etinilestradiola na telesnu masu nisu brojni, i donekle su kontradiktorni. Prema pojedinim autorima primena etinilestradiola nije dovođila do značajnije promene u telesnoj masi, ali je bila uzrok značajnog porasta mase jetre, na račun proliferacije hepatocita. Drugi su pak utvrdili da dolazi do smanjenja telesne mase životinja (144, 145). Estrogen i njegovi derivati igraju važnu ulogu u etiologiji i patofiziologiji intrahepatične holestaze u trudnoći, a gubitak telesne mase je jedan od kliničkih znakova (146). Telesna masa grupe E-MK posle tretmana, bila je statistički značajno manja od kontrolne grupe i grupe tretirane etinilestradiolom, ali je to najverovatnije posledica statistički značajnih razlika u telesnoj masi koje su postojale i pre tretmana. Naše je stanovište da je MK ipak delovala blagotvorno na TM, tj da je primenom MK sprečeno smanjenje telesne mase životinja E-MK grupe usled primene etinilestradiola. Potvrdu tvrdnje o povoljnom uticaju monoketoholne kiseline na telesnu masu, nalazimo u činjenici da posmatrajući samo ovu grupu, nema statistički značajne razlike u telesnoj masi posle oglada u odnosu na pre oglada, te da je telesna masa grupe E-MK porasla u toku samog

ogleda. Slično povoljno dejstvo na održanje telesne mase uočeno je u grupi E-UDK, gde iako je postojalo malo smanjenje prosečne telesne mase u grupi na kraju, u odnosu na početak tretmana, to smanjenje nije bilo statistički značajno.

Žučne kiseline su ranije posmatrane kroz prizmu osnovnih uloga kao što su apsorpcija lipida i lipofilnih vitamina i metabolizam holesterola i žuči. Sa otkrićem nuklearnih receptora, prihvaćeno je da mogu delovati kao hormoni, ali i kao nutritivni signalni molekuli i tako regulisati metabolizam glukoze, lipida, lipoproteina i metabolizam energije (146). Postoji veliki broj studija koje se bave različitim aspektima povezanosti žučnih kiselina, ishrane, telesne mase, gojaznosti i patofiziologije masnog tkiva.

Dokazano je da žučne kiseline imaju uticaja na depoe energije u organizmu, kao što je masno tkivo, i to ne samo na zrelo masno tkivo već i na sam proces adipogeneze i diferencijaciju preadipocita u adipocite. Ove efekte ostvaruju preko svojih receptora, ali i redukcijom oksidativnog stresa. Ursodeoksiholna kiselina je pokazala antiproliferativan efekat i gotovo u potpunosti blokirala deobu preadipocita i konverziju preadipocita u adipocite. Osim toga UDK je pokazala inhibitorni efekat na niz enzima uključenih adipogenezu i lipogenezu. Neki od ovih efekata realizovali su se putem FXR i TGR5, dok su drugi bili nezavisni od njih, a povezani sa inaktivacijom PPAR γ (147). Fu i saradnici analizirali su promene u sastavu žučnih kiselina u različitim kompartmanima tela, u toku kalorijske redukcije različitog nivoa. Dokazali su da redukcija kalorijskog unosa za 30-40% dovodi do povećanja koncentracije žučnih kiselina. Istovremeno utvrđena je indukcija enzima uključenih u sintezu (Cyp7a1) i konjugaciju ŽK. Dodatni mehanizam koji je doveo do promene u koncentraciji žučnih kiselina je i uticaj na intracelularni transport u ileumu (148). Ima studija koje su utvrdile povoljan uticaj UDK na masu pojedinih organa i organskih sistema izloženih različitim patogenim i citotoksičnim agensima (149, 150).

U našem istraživanju, sve grupe jedinki sa dijabetesom su na kraju tretmana imale značajno manju telesnu masu u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu fiziološkim rastvorom. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije Rashid i saradnika, gde su jedinke nakon 21 dana aloksanskog dijabetesa imale znatno nižu telesnu masu u odnosu na jedinke koje nisu tretirane aloksanom (105). Hipoinsulinemija i hiperglikemija udruženi su sa gubitkom u telesnoj masi, što je dokazano i u stidijama sa streptazocin-indukovanim dijabetesom (151).

Informativan je i podatak o značajnosti razlika u telesnoj masi grupa posle tretmana, posmatrano u odnosu na početak tretmana. Nakon 5 dana trajanja aloksanskog dijabetesa, telesna masa se nije značajno promenila u A grupi. Naši podaci su u skladu sa rezultatima drugih istraživača koji su ustanovili da aloksanski dijabetes u trajanju od 7, 21 i 42 dana, nije značajno uticao na telesnu masu jedinki pacova (152). Al-Salami i saradnici navode da je kod životinja kod kojih je izazvan aloksanski dijabetes došlo do gubitka telesne mase, ali bez naznaka da li je ta promena statistički značajnog nivoa (93).

Nasuprot grupe A, kod jedinki sa aloksanskim dijabetesom uz svakodnevnu aplikaciju etinilestradiola, telesna masa je na kraju tretmana značajno opala. Na žalost, podatke drugih autora o uticaju koadministracije aloksana i etinilestradiola na telesnu masu nismo pronašli u nama dostupnoj literaturi. S obzirom da je etinilestradiol sam ili u kombinaciji sa aloksanom značajno uticao na promenu u telesnoj masi, treba razmotriti moguće mehanizma delovanja etinilestradiola na promenu telesne mase i energetske metabolizam.

Supstance sa estrogenskom aktivnošću potiču iz različitih prirodnih ili sintetskih procesa i produkata, uključujući endogene produkte (npr. estradiol), lekove (npr. etinilestradiol), biljke korišćene u ishrani (fitoestrogeni) i hemijske proizvode (ksenoestrogeni kao bisfenol A). Izlaganje ljudi niskim dozama bilo kojim od navedenih supstanci ima dvojaki potencijal: da pospešuje zdravlje ili da remeti normalnu endokrinu funkciju, i da utiče na različite organske sisteme sa kojima je estrogen u interakciji. Mehanizam delovanja, kao i željena i neželjena dejstva izloženosti ljudi niskim dozama estrogena i supstanci koje interaguju sa estrogenskim receptorima, često su nejasni (153). Prema novijim istraživanjima u toku primene oralnih kontraceptiva koji sadrže etinilestradiol, kod zdravih žena nisu uočeni efekti u smislu povećanja indeksa telesne mase. Međutim, ispitivani lekovi sadrže etinilestradiol u dozama od 30-35 μ g, i pri primeni ovih doza nisu registrovana ni druga neželjena dejstva (154). Ranija istraživanja koja su obuhvatala kontraceptive sa dozama etinilestradiola od 50 μ g i više, ustanovila su promene u telesnoj kompoziciji, kao i promenu osetljivosti na insulin kod viših doza (155). U našem istraživanju etinilestradiol je primenjen u dozi od 5mg/kg telesne mase, uzastopno 5 dana. Pri ovakvoj dozi, etinilestradiol ima izrazit uticaj na brojne procese u organizmu koje ostvaruje kako putem estrogenskih receptora (ER α), tako i prooksidativnim delovanjem (32, 37).

Različito u efektima estrogena i supstanci poput etinilestradiola koje reaguju sa estrogenim receptorima, mogle bi poticati upravo od tipa receptora ($ER\alpha$, $ER\beta$). Da bi se to ispitalo, posmatrani su $ER\alpha$ -deficijentni miševi, koji su imali teške poremećaje metabolizma insulina i glukoze, te je ustanovljeno da ovaj tip receptora deluje protektivno u različitim metaboličkim oboljenjima, uključujući i gojaznost i insulinsku rezistenciju. Uticaj $ER\beta$ ostao je donekle nerazjašnjen. Daljim ispitivanjima, dokazano je da $ER\beta$ narušavaju metaboličke funkcije, što se delom verovatno ostvaruje putem negativne interakcije sa PPAR receptorima. PPAR su uključeni u regulaciju energetske homeostaze delujući primarno u masnom tkivu, skeletnim mišićima i jetri. Za ostvarenje funkcije PPAR, pre svega $PPAR\gamma$, neophodan je velik broj kofaktora, koji su zajednički sa $ER\beta$ što predstavlja osnovu za njihovu međusobnu interakciju (156).

Primena ursodeoksiholne kiseline (AE-UDK), za razliku od monoketoholne kiseline (AE-MK), nije sprečila statistički značajno smanjenje telesne mase u odnosu na početak oglada kod životinja tretiranih sa oba agensa. Drugim rečima, primena monoketoholne kiseline je doprinela održanju telesne mase životinja izloženih dejstvu hepatotoksičnog etinilestradiola i aloksanskog dijabetesa. Tačan mehanizam delovanja žučnih kiselina na energetske homeostazu i depoe energije nije utvrđen ni kod glodara ni kod ljudi. Osim što su uključene u apsorpciju i metabolizam lipida i metabolizam glukoze, u skorije vreme je utvrđeno da administracija žučnih kiselina sprečava gojaznost usled neadekvatne i prekomerne ishrane i prevenira nastanak insulinske rezistencije. Primena žučnih kiselina kod miševa povećala je potrošnju energije iz mrkog masnog tkiva koje je glavni izvor energije kod glodara. Pretpostavlja se da (između ostalog) žučne kiseline regulišu energetske homeostazu, pa i telesnu masu, vezivanjem za membranske receptore (TGR5) na ksantoadipocitima čime utiču na enzime uključene u aktivaciju hormona štitaste žlezde (11, 55). Očekivalo bi se da ursodeoksiholna kiselina svojim protektivnim delovanjem u holestazi izazvanoj etinilestradiolom, utiče povoljno i na poboljšanje opšteg stanja jedinki što bi se moglo manifestovati održanjem telesne mase. Razlog za izostanak ovog očekivanog efekta mogao bi da bude nemogućnost UDK da odgovori u adekvatnoj meri na pojačan disbalans u organizmu usled istovremenog dijabetesa i holestaze. U prilog ove konstatacije govore dva podatka uočena u ovoj studiji. Naime, kod normoglikemičnih jedinki grupe E-UDK nije došlo do značajnog gubitka na telesnoj masi, odnosno, UDK je ispoljila povoljno dejstvo na

održanje telesne mase. Drugi podatak dobijen je poređenjem telesne mase na kraju tretmana, gde je ustanovljeno da je AE grupa imala značajno manju telesnu masu od EE grupe, kao i da su AE-UDK jedinke u proseku imale značajno manju telesnu masu od proseka E-UDK jedinki.

Kako u grupi jedinki tretiranih monoketoholnom kiselinom nije došlo do značajnih promena u telesnoj masi, postavlja se pitanje kojim mehanizmima je došlo do toga? Za razliku od UDK koja je prirodna žučna kiselina, monoketoholna kiselina je stabilna polusintetska žučna kiselina niske toksičnosti. Monoketoholna kiselina nastaje kao derivat holne kiseline, gde je na poziciji 12, OH-grupa zamenjena keto-grupom (*3 α ,7 α -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanoic acid*, 12-MK) (84, 94). Do sada je u više studija utvrđena uloga monoketoholne kiseline kao promotera transporta različitih lekova (84, 93, 157). U ovom ispitivanju se povoljna dejstva ne mogu pripisati promociji transporta drugih supstanci, već isključivo dejstvu same MK. Sintetske žučne kiseline usled modifikacija hemijske strukture dobijaju i drugačija fizičko-hemijska, pa i biološka svojstva. Iako nema sličnih podataka za monoketoholnu kiselinu, dokazano je da druge sintetske žučne kiseline imaju mogućnost aktivacije kako nuklearnih (FXR), tako i membranskih (TGR5) receptora. Rizzo i saradnici ispitivali su više polusintetskih žučnih kiselina i njihovih soli koje imaju svojstva liganda za FXR ili TGR5 ili pak za oba receptora (konkretno, reč je o derivatu INT-767, *6 α -ethyl-3 α ,7 α ,23-trihydroxy-24-nor-5 β -cholan-23-sulfate sodium salt*) (158).

5.2. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na vrednosti šećera u krvi

Etinilestradiol u malim dozama u kojima je prisutan u oralnim kontraceptivima, ne utiče na vrednosti šećera u krvi, te se danas po tom pitanju, smatra sigurnim za dugotrajnu primenu (159). Studije na oglednim životinjama u kojima je primenjen etinilestradiol, bile su uglavnom bazirane na izazivanje i ispitivanje holestaze. Korišćene doze bile su znatno više od onih u oralnim kontraceptivima (5-10mg/kg), ali nije uočen uticaj na vrednosti šećera u krvi (40). Podaci dobijeni našim istraživanjem, u saglasnosti su sa ovim istraživanjima. Kratkotrajna primena viših doza etinilestradiola nije dovela do značajnih promena vrednosti šećera u krvi, a male vrednosti varijanse, raspona i standardne devijacije govore da se ni pojedinačne vrednosti šećera u krvi nisu puno razlikovale od prosečnih vrednosti u grupama tretiranim etinilestradiolom. Nešto drugačije rezultate objavili su Jin i saradnici. Oni su na animalnom modelu ispitivali uticaj hronične primene EE i drugih supstanci koje se upliću u endokrinu signalizaciju (*endocrine-disrupting chemicals*, EDC). EE je dat u pijaćoj vodi, u dozi od 1µg/kgTM/dan, tokom 20 nedelja, uz visokokaloričnu hranu. Iako nije dokazan uticaj na vrednosti šećera u krvi, ustanovili su pojačanu ekspresiju gena uključenih u metabolizam glukoze i slobodnih masnih kiselina, te da bi hronična izloženost EE i drugim EDC supstancama mogla da naruši energetske metabolizam (160).

Dijabetes je doživotno metaboličko oboljenje, karakterisano nemogućnošću održavanja adekvatnog metabolizma glukoze. Insulin zavisni dijabetes melitus (tip 1, T1DM), nastaje usled destrukcije β-ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa i potpunog izostanka sekrecije insulina. Tip 2 dijabetesa (T2DM) nastaje kao kombinacija insulinske rezistencije perifernih tkiva i posledične pojačane sekrecije insulina od strane β-ćelija pankreasa, ali bez postizanja adekvatne regulacije nivoa glukoze. Imajući u vidu značaj samog dijabetesa sa pratećim komplikacijama i raširenost oboljenja, nije iznenađujuće da se razvio veliki broj metoda, tj modela za izazivanje dijabetesa, bilo tipa 1 ili tipa 2 (161). Aloksan i streptazocin su najčešće korišćene dijabetogene supstance koje izazivaju promene koje odgovaraju T1DM. Iako otkriven 1838. godine, tek 1943. godine je otkriveno da aloksan izaziva hiperglikemiju usled nekroze β-ćelija pankreasa, i to stanje nazvano je aloksanski dijabetes (134). U većini

eksperimentalnih studija, kao i u našem istraživanju, aloksanski dijabetes se postiže jednokratnom primenom aloksana u dozi od 100-150mg/kgTM, intraperitonealno (90, 105, 152, 162, 163). Zbog trajanja delovanja aloksana i njegovih produkata, verifikacija aloksanskog dijabetesa se radi 48h od aplikacije aloksana. Granična vrednost šećera u krvi da bi se potvrdio aloksanski dijabetes, malo se razlikuje od studije do studije, a kreće se od 13-15mmol/L, dok ima i onih koji za granične vrednosti uzimaju 8.3mmol/L, odnosno 20mmol/L (90, 105, 152, 164).

Nakon što su formirane grupe jedinki sa aloksanskim dijabetesom, a pre početka tretmana, nisu postojale značajne razlike u prosečnoj vrednosti šećera u krvi. Vrednosti šećera u krvi nakon tretmana, mogu se posmatrati i analizirati iz više aspekata. Ukoliko se posmatra sniženje prosečne vrednosti ŠUK u grupi na vrednosti manje od 15.0 mmol/l, takvo sniženje je uočeno samo u grupi tretiranoj ursodeoksiholnom kiselinom uz etinilestradiol, dok se grupa tretirana monoketoholnom kiselinom veoma približila toj vrednosti. Grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom je imala i statistički značajno niže vrednosti ŠUK na kraju oglada u odnosu na početak tretmana kiselinom, dok se smanjenje vrednosti ŠUK za grupu AE-MK približilo granici značajnosti ($p < 0.05$), ali je ipak nije dostiglo.

Može se govoriti i o procentu jedinki unutar grupe koje su na kraju oglada imale normalne vrednosti (< 15.0 mmol/l) ŠUK. U tom slučaju, grupe tretirane žučnim kiselinama imaju značajno veći broj normoglikemičnih jedinki, i to čak više među životinjama tretiranim monoketoholnom kiselinom (60%) u odnosu na ursodeoksiholnu kiselinu (40%). Kako je u grupama koje su primale žučne kiseline na kraju tretmana bilo i hiper- i normoglikemičnih jedinki i ujedno postojanje većih oscilacije pojedinačnih vrednosti ŠUK u odnosu na prosek, to objašnjava velike vrednosti devijacije, raspona i varijanse. Mora se reći da je i u grupi A koja nije primala nikakav tretman, jedna jedinka imala pad vrednosti ŠUK ispod 15.0 mmol/l. Moguće je da primena aloksana kod ove jedinke nije dovela do destrukcije svih Langerhansovih ostrvaca, odnosno da je preostalo dovoljno vitalnih β -ćelija koje su tokom 5 dana povratile funkcionalnost i reglisale glikemiju.

Iz svega navedenog proizilazi da je primena i prirodne (UDK) i sintetske (MK) žučne kiseline imala značajnog efekta na regulaciju šećera u krvi jedinki sa aloksanskim dijabetesom. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora.

Na modelu dijabetesa izazvanog streptazocinom, primenjen je 2% rastvor soli monoketoholne kiseline intranazalnim putem (0.2ml/kg TM). Nivo šećera u krvi proveravan je u kraćim vremenskim intervalima (u 0, 15, 30, 45, 60, 90 i 180 minuta od alikacije soli MK). U kontrolnoj grupi normoglikemičnih jedinki, primena soli MK nije dovela do značajnih promena u ŠUK. U odnosu na dijabetične jedinke tretirane fiziološkim rastvorom, primena soli MK kod dijabetičnih jedinki značajno je snizila glikemiju 30, 45, 60 i 90 minuta nakon aplikacije (165) (2). Rašković i saradnici su primenili so monoketoholne kiseline (4mg/kg, s.c.) i komercijalnim preparatom steviozida na miševima bez izazivanja dijabetesa. U cilju podizanja nivoa šećera u krvi, miševi su podvrgavani oralnom testu tolerancije glukoze (500mg/kg, p.o.) ili injekciji adrenalina (0.2mg/kg, s.c.). Pretretman samo sa soli MK ili kombinacijom steviozida i soli MK tokom 4 dana je znatno umanjio nivo šećera u krvi nakon testa tolerancije ili injekcije adrenalina, u poređenju sa grupom koja nije imala pretretman (166). U daljim istraživanjima ista grupa autora je ispitivala uticaj soli MK i steviozida, pojedinačno ili u kombinaciji na glikemiju jedinki sa aloksanskim dijabetesom. Tokom 5 dana navedene supstance su primenjivane peroralno ili putem subkutano postavljene osmotske pumpe. Pojedinačno primenjeni, steviozid i so MK snizili su nivo šećera u krvi, ali je (bez obzira na put primene), kombinacija steviozida i soli MK imala najjače hipoglikemijsko dejstvo (90).

Mahmoud i saradnici su ispitivali uticaj UDK i fenofibrata na modelu metaboličkog sindroma. U patogenezi, kliničkim manifestacijama i razvoju komplikacija metaboličkog sindroma i dijabetesa postoji veliki broj sličnosti. Ovi autori su dokazali da UDK normalizuje telesnu masu, vrednosti šećera u krvi, nivo holesterola i triglicerida. Dokazali su da UDK ovaj efekat postiže smanjenjem markera oksidativnog stresa. Fenofibrati kao aktivatori PPAR α imali su sličan efekat, ali je UDK pokazala jači uticaj u pogledu regulacije ŠUK i insulinske rezistencije. Osim toga smatraju da bi UDK mogla biti prihvatljivija u terapijskim smislu zbog vrlo dobre tolerancije i mogućnosti primene u trudnoći (167). Osim u stanjima poput dijabetesa (tip 1 i tip2), metaboličkog sindroma i gladovanju, UDK je pokazala povoljan efekat na regulaciju glukoze i drugih parametara i u nealkoholnom steatohepatitisu (150).

Žučne kiseline u jetri verovatno mogu regulisati metabolizam glukoze i regulacijom odgovarajućih enzima. Nekoliko studija je imalo suprotstavljene rezultate u pogledu uticaja žučnih kiselina na glukoneogenezu, kao i u pogledu uticaja nuklearnih receptora ŽK,

pogotovo FXR. Dok je po jednim nivo ograničavajućeg enzima glukoneogeneze (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*, fosfoenolpiruvat karboksikinaze- PEPCK) bio povišen delovanjem ŽK preko FXR u kulturama hepatocitima (168), dotle su drugi autori došli do zaključaka da ŽK suprimiraju ekspresiju PEPCK na FXR-zavistan i FXR-ne zavisian način (169, 170). Drugi enzimi uključeni u metabolizam glukoze u jetri takođe mogu biti regulisani putem FXR. Aktivacija FXR ne samo da snižava sintezu glukoze već i povećava sintezu glukagona u jetri, čime takođe snižava nivo šećera u krvi (171, 172). U istraživanjima *in vivo* T2DM i *in vitro* istraživanjima T1DM, utvrđeno je da i β -ćelije pankreasa ekspimiraju FXR kao i da je FXR važan za pravilan odgovor β -ćelija na opterećenje glukozom, te da ima protektivnu ulogu u β -ćelijama u metaboličkim oboljenjima (172, 173).

5.3. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na pokazatelje jetrene funkcije

Razvijen je veliki broj testova kojima se ispituju pojedine funkcije jetre. Kako su funkcije jetre brojne, raznovrsne i često isprepletane, testovi se mogu grubo podeliti na testove kojima se ispituje:

- ✓ eliminaciona i detoksifikaciona funkcija jetre (hepatični klirens testovi);
- ✓ sintetska funkcija (merenje albumina, faktora koagulacije i dr);
- ✓ metabolička funkcija (metabolizam amonijaka, koncentracija lekova, ksenobiotika, bilirubina, holesterola, triglicerida);
- ✓ poremećaj permeabilnosti i oštećenje ćelija (aktivnost enzima - AST, ALT, alkalna fosfataza (ALP), γ -glutamil transferaza (γ -GT) i 5'-nukleotidaza) (143, 174).

Holestaza se može definisati kliničkim znacima (žutica, pruritus, promena boje urina i stolice) i biohemijskim pokazateljima (povišene vrednosti transaminaza, konjugovanog i ukupnog bilirubina, ALP, γ -GT i drugih enzima) (175).

Transaminaze (ALT i AST) su najčešće korišćeni enzimi u dijagnostici oboljenja jetre. AST je lokalizovan u citosolu hepatocita i drugih ćelija dok se ALT znatno ređe nalazi u drugim ćelijama te je njegova aktivnost u plazmi pre svega refleksija oštećenja jetre (152). Membranski ili kanalikularni enzimi su alkalna fosfataza (ALP) i γ GT, lokalizovani u kanalikularnim delovima membrane hepatocita. Uz ALT, γ -GT se smatra najspecifičnijim markerom oštećenja jetre (143).

Efekte EE pripisuju se njegovom metabolitu, estradiol-17 β -D-glukuronidu koji smanjuje ekskreciju sastojaka žuči na reverzibilan i dozno zavistan način. Ovaj metabolit se sekretuje u žuč putem Mrp2, a potom sa luminalne strane kanalikularne membrane inhibira Bsep (26). U studijama na modelu holestaze izazvane etinilestradiolom, ustanovljeno je takođe da do poremećaja protoka žuči i sekrecije konstituenata žuči, dolazi usled poremećaja funkcije i ekspresije Ntcp transportera na sinusoidnoj membrani hepatocita pacova (15, 32, 145, 175). Osim pomenutih uticaja na transportne mehanizme, EE i estradiol-17 β -D-

glukuronid slabe međucelijske veze čime omogućavaju regurgitaciju elemenata žuči, i njihov ulazak u cirkulaciju (175). U više studija dokazano je da pomenuti poremećaji transportnih proteina nastaju već nakon 5 dana, i to u dozama od 5mg/kg TM/dan (18, 32), te je ovakav protokol primenjen i u našoj studiji.

U našem istraživanju došlo je do značajnog porasta AST, ALT, direktnog i ukupnog bilirubina u krvi jedinki koje su tokom 5 dana primale etinilestradiol. Značajan porast istih pokazatelja jetrene funkcije ustanovljen je i kod životinje sa aloksanskim dijabetesom koje su tretirane etinilestradiolom, u poređenju sa kontrolnom grupom i/ili jedinkama sa aloksanskim dijabetesom bez etinilestradiola. Sve navedeno sugerise da je došlo do poremećaja funkcije jetrenih ćelija, odnosno holestaze, pod uticajem etinilestradiola. Naši nalazi su u saglasnosti sa drugim studijama estrogenom-indukovane intrahepatične holestaze (15, 149, 176)(6–8).

U studijama sa humanim ispitanicima u široj populaciji, takođe je ustanovljeno da se u holestatskim poremećajima javlja kako porast nivoa enzima koji ukazuju na povećanu propustljivost membrane (AST, ALT), tako i enzima γ -GT koji može biti indukovano primenom oralnih kontraceptiva i steroida (174). Kod žena se u trudnoći javlja intrahepatična holestaza čiji su biohemijski markeri porast koncentracije ŽK, bilirubina, AST, ALT, AP i γ -GT u krvi (146).

Stepen poremećaja ćelijskog integriteta u holestazi kreće se od povećanog permeabiliteta ćelijske membrane do lize ćelije, pa zavisno od toga rastvorljivi sastojci ćelija u različitim koncentracijama dospevaju u krvnu plazmu. Kod lakših lezija hepatocita oslobodiće se pretežno citosolni enzimi, a tek kod težih oštećenja i enzimi iz subcelularnih struktura, npr mitohondrija ili ćelijskih membrana. Mehanizam oslobađanja kanalikularnih enzima je manje poznat. Smatra se da se povećava sinteza ovih enzima u oboleloj jetri, ali je diskutabilna veza između pojačane sinteze u ćeliji i porasta aktivnosti u plazmi. U nekim istraživanjima, kod pacijenata sa holestazom i povišenom aktivnošću ALP i γ -GT u plazmi, otkriveni su fragmenti membrane sa visokom aktivnošću ALP i γ -GT. Smatra se da su uzrokovani promenama u strukturi membrane hepatocita pod dejstvom žučnih kiselina koje kao deterdženti solubilizuju membranu (143). Kako u našem istraživanju nije dokazan značajan porast aktivnosti γ -GT u plazmi jedinki na EE i Alx+EE tretmanu, osnovano je pretpostaviti da je došlo do blažeg vida holestatskog poremećaja, odnosno da je povećana propustljivost

ćelijske membrane, ali da nije došlo do poremećaja integriteta ćelijske membrane i samih hepatocita.

Bez obzira na etiologiju holestaze, akumulacija toksičnih hidrofobnih žučnih kiselina je ključni faktor u oštećenju jetre. Balans hidrofilnosti i hidrofobnosti molekula ŽK određuje njihova biološka svojstva. Hidrofobnost ŽK zavisi od broja i rasporeda –OH grupa i konjugacije bočnog lanca sa glicinom ili taurinom. ŽK konjugovane sa taurinom su predominantno hidrofilne, kao i trohidroksilne ŽK u odnosu na dihidroksilne. U smislu hidrofobnosti molekula, poredak među prirodnim ŽK bio bi UDK < holna (CA) < henodeoksiholna (CDCA) < deoksiholna (DCA) < litholna (LCA). Visoko hidrofilne ŽK poput UDK su manje citotoksične i stimulišu izlučivanje komponenti žuči iz hepatocita (64, 102, 177, 178). Mehanizam toksičnosti hidrofobnih ŽK ogleda se u oštećenju membranskog sistema mitohondrija i same ćelijske membrane, i ubrzanom stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta koje dovode do daljeg, nekontrolisanog oštećenja vitalnih molekula i mehanizama u ćeliji (102). Nasuprot ovom negativnom efektu, nakupljanje ŽK u hepatocitima ima i povoljne efekte. Aktiviranjem nuklearnih receptora ŽK, osim supresije sinteze novih količina ŽK supresijom enzima (Cyp7a), utiču i na smanjenje preuzimanja i pojačanu eliminaciju ŽK iz hepatocita (175).

Redukcija sadržaja ŽK i/ili izmena sastava u korist manje toksičnih ŽK, predstavljaju neke od glavnih terapijskih ciljeva (44). Terapija prirodnim ŽK počela je 1970-ih sa primenom CDCA u terapiji holelitijaze. Međutim, brzo je povučena usled potencijalno ozbiljnih neželjenih dejstava. Dalja ispitivanja bila su vođena idejom da će primena endogenih netoksičnih ŽK imati hepatoprotektivno dejstvo (64, 102). Tako se došlo do UDK koja je imala slične efekte na holelitijazu kao CDCA, ali bez hepatotoksičnosti. I druga svojstva UDK učinila su je interesantnom za razvoj terapije hroničnih holestatskih oboljenja (44).

Primena UDK u našem istraživanju imala je hepatoprotektivno dejstvo, što se ogleda u značajnom poboljšanju testova jetrene funkcije. Uz dodatak UDK značajno su snižene vrednosti AST, γ -GT i ukupnog bilirubina u odnosu na jedinke tretirane samo etinilestradiolom. Vrednost ALT i direktnog bilirubina su snižene u E-UDK grupi, tako da nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Sličan efekat je postignut primenom UDK uz EE kod dijabetičnih jedinki. Vrednost AST, ALT, γ -GT i ukupnog

bilirubina u odnosu na jedinke tretirane samo etinilestradiolom je značajno smanjena, i ne pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Jedino je nivo direktnog bilirubina u AE-UDK grupu ostao na nivou EE grupe i statistički je značajno viši od vrednosti u kontrolnoj grupi. Ovim rezultatima pridružujemo se skupini istraživača koji su potvrdili hepatoprotektivno dejstvo UDK u genetskim oboljenjima tipa primarne bilijarne ciroze (64, 102), animalnim modelima ekstra- i intrahepatične holestaze (179, 180) i intrahepatične holestaze u trudnoći (146).

Primena monoketoholne kiseline ispoljila je hepatoprotektivno dejstvo slično UDK, odnosno dovela je do sniženja gotovo svih analiziranih parametara jetrene funkcije. Statistička značajnost dokazana je za promenu AST, ALT i ukupnog bilirubina kod jedinki tretiranih etinilestradiolom. Koncentracija ukupnog bilirubina je snižena u odnosu na EE grupu primenom MK, i ne pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Kod dijabetičnih jedinki koje su primale EE i MK, značajno je smanjena aktivnost ALT, direktnog i ukupnog bilirubina. Primetan je izostanak značajnosti delovanja MK u sniženju γ -GT u oba ispitivana modela, kao i u redukciji konjugovanog bilirubina kod jedinki tretiranih etinilestradiolom. S jedne strane rezultati vezani za γ -GT trebali bi se tumačiti sa dozom opreznosti, s obzirom da i porast aktivnosti γ -GT tokom tretmana sa EE i Alx+EE tretmana, nije statistički značajno viša od aktivnosti izmerene u kontrolnoj grupi. Kako je UDK i pored naedenog, dovela do značajnog pada aktivnosti γ -GT, dobijeni rezultati mogu i da sugerišu slabije protektivno dejstvo MK u odnosu na UDK. Objašnjenje bi se moglo potražiti daljim ispitivanjima uticaja MK na funkciju pojedinih transportera. Al-Salami i saradnici su ustanovili da MK remeti izlučivanje gliklazida iz ćelija kod jedinki sa aloksanskim dijabetesom. Njihova je pretpostavka da je MK delovala kao inhibitor Mrp3 transportera na bazolateralnoj membrani enterocita, a poznato je da Mrp3 u uslovima holestaze i nakupljanja ŽK, deluje kao efluksni transporter odnosno, izbacuje toksične komponente žuči iz hepatocita (91).

Iako je hepatoprotektivno dejstvo UDK u mnogim studijama potvrđeno, o samom mehanizmu delovanja se još uvek nagađa. Kao i kod većine biomolekula, najverovatnije i nije reč o samo jednom mehanizmu. Preovladava mišljenje da UDK deluje antiholestatski tako što smanjuje učešće toksičnih hidrofobnih ŽK. Terapijske doze UDK (13-15mg/kgTM/dan) podižu zastupljenost UDK u žuči sa normalnih 3-5% na 40-60%.

Konjugovani oblici UDK se u crevima (uglavnom u distalnom ileumu) i malim žučnim kanalima apsorbiraju aktivnim transportom. Kako je to istovremeno mesto i način apsorpcije i toksičnih endogenih ŽK, ovom kompeticijom povećana koncentracija UDK dovodi do smanjene enterohepatične cirkulacije i povećanog izlučivanja toksičnih ŽK (64). Ipak, pojedini autori su ovaj mehanizam delovanja UDK doveli u pitanje kada je pokazano da je nakon kratkotrajne primene UDK došlo do poboljšanja parametara holestaze, ali da je udeo CDCA i DCA kiseline ostao nepromenjen (65, 178). Takođe kod obolelih od primarne bilijarne ciroze i primarnog sklerozirajućeg holangitisa izostaje porast zastupljenosti UDK u žuči primenom terapijskih doza (65). Novija je i teorija “bilijarnog HCO_3^- kišobrana”, po kojoj UDK stimuliše sekreciju HCO_3^- i stvaranje alkalne sredine na apikalnom polu hepatocita i bilijarnog epitela, čime štiti membrane od hidrofobnih ŽK (178). Još jedan potencijalni mehanizam protekcije od strane UDK je danas pod znakom pitanja. Naime, od skora se preispituje do sada nesumnjivi uticaj UDK u transkripciji i post-transkripcijskim modifikacijama gena koji kodiraju transportere u ćelijskoj membrani hepatocita i žučnih kanalikula (Bsep, Mrp2, mrp3, Mrp4, OATP) (32, 102, 175, 178). Crocenzi i saradnici su utvrdili da u EE-indukovanoj holestazi dolazi do smanjenja ekspresije Mrp2 receptora na membrani hepatocita. Očekivalo se da će primena UDK povećati njihovu ekspresiju re-insercijom Mrp2 iz perikanalikularnih vezikula. Na njihovo iznenađenje, bilijarna ekskrecija se poboljšala sa primenom UDK, ali bez povećane ekspresije Mrp2. Ovo ih je navelo na zaključak da je do protektivnog efekta UDK došlo unapređenjem funkcije već postojećih Mrp2, pre nego povećanjem ekspresije (18). Sve veći akcenat se stavlja na vezu između UDK i njenih konjugata (*tauroursodeoxycholic acid*, *TUDCA*) sa sistemom protein-kinaza u ćeliji čime bi posredno pojačavala funkcionisanje transportera (102, 178).

Ispitivanja koja govore o antiapoptotskom i antioksidativnom dejstvu UDK su do sada dala zanimljive, ali nepotpune rezultate i ovaj pravac istraživanja je i dalje aktuelan (65, 178, 181).

Kako prirodne ŽK imaju dosta povoljnih dejstava, ali i dosta nedostataka, razumljivi su naponi da se stvore i polusintetske ili sintetske ŽK koje bi imale, jače, brže ili kompletnije dejstvo. 24-*nor*ursodeoksiholna kiselina (*norUDCA*) je derivat UDK sa skraćenim bočnim lancem. Izostanak metil-grupe je čini otpornijom na konjugaciju sa taurinom ili glicinom, za razliku od UDK. Rezultat je pojačavanje “bilijarnog HCO_3^- kišobrana” i mogućnost pasivnog

transporta *norUDCA* kroz holangiocyte, pa je čitavo enterohepatično kruženje zamenjeno “holehepatičnim šantom” (64, 181). Dodatnim skraćanjem bočnog lanca dobija se bis-*norUDCA*, koja nema mogućnost holehepatičnog šanta. Sintetski analog ŽK, holilsarkozin (*Cholyl-N-methylglycine*) koristi se kod pacijenata sa sindromom kratkog creva, u prevenciji malapsorpcije masti usled nedostatka ŽK i poremećaja varenja u proksimalnim partijama creva (102).

Podataka o mogućnosti monoketoholne kiseline da aktivira FXR ili druge receptore ŽK, za sada nema u nama dostupnoj literaturi. Iako je većina efekata UDK FXR-ne zavisna, UDK ima mogućnost aktivacije drugih receptora (GR, PXR i drugi) (65, 178).

5.4. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na histopatološke promene u tkivu jetre

Kako bi procena uticaja etinilestradiola i žučnih kiselina bila potpunija, pored određivanja koncentracije enzima i bilirubina, tkivo jetre je histološki obrađeno i izvršena je histopatološka analiza isečaka tkiva jetre.

Tkivo jetre kontrolne grupe (K1) tretirane fiziološkim rastvorom nije pokazalo odstupanja od normalne histološke građe tkiva jetre. Takav nalaz ne iznenađuje i nađen je i u istraživanjima drugih autora (136, 149, 176). S obzirom da je etilenestradiol rastvoren u propilen-glikolu, grupa K2 je primala samo propilen-glikol, kako bi se isključilo izolovano dejstvo ove supstance. Prema do sada prikazanim podacima, propilen-glikol nije doveo do statistički značajnih promena u telesnoj masi, ŠUK, i pokazateljima jetrene funkcije. Drugim rečima, grupa K2 se u statističkom pogledu nije razlikovala od kontrolne grupe K1. Na isečcima jetre bojenim standardnom hematoksilin-eozin tehnikom ne uočavaju se promene u građi tkiva jetre u poređenju sa tkivom jedinki koje su dobijale samo fiziološki rastvor. I ovaj nalaz je u saglasnosti sa literaturnim podacima (18).

Definicije holestaze, kao što je ranije rečeno, mogu biti zasnovane na morfološkim, biohemijskim ili kliničkim znacima. Takođe, determinišući kriterijumi za potvrdu nastanka holestaze razlikuju se donekle u humanoj medicini i u eksperimentalnom radu na životinskim modelima. Znaci holestatskog poremećaja razlikuju se u holestazi intrahepatičnog i ekstrahepatičnog porekla, akutnog ili hroničnog toka, dok pojedini toksini, lekovi i ksenobiotici mogu imati vrlo specifične markere (20, 21, 22, 175).

Studije na animalnim modelima, holestazu pretežno dokazuju postojanjem biohemijskim markera. Ona istraživanja koja su u svojoj metodologiji imala i histopatološku analizu tkiva (svetlosnim ili elektronskim mikroskopom), izvestile su o veoma raznolikim promenama u tkivu jetre i drugih organa. U većini ispitivanja, morfološke promene su zavisile od etiologije, trajanja uzroka holestaze i intenziteta odnosno koncentracije oštećujućeg agensa. U modelima ekstrahepatične holestaze dominira metod podvezivanja zajedničkog žučnog duktusa (*bile*

duct ligation – BDL model). Četiri nedelje nakog podvezivanja uz biohemijske pokazatelje (porast AST, ALT, bilirubina direktnog i ukupnog) bile su prisutne izrazite promene u tkivu jetre: poremećaj lobularne strukture, fibroza, početni znaci ciroze, nekroza hepatocita, proliferacija interlobularnih žučnih kanala i mestimično izlivanje žuči u vidu tzv žučnih infarkta (149). U ovoj studiji analizirana je čak i morfologija tetstisa, gde su uočene promene u skladu sa stepenom oštećenja jetre. Slične podatke o histopatološkim promenama jetre dobili su i drugi istraživači na BDL modelu (182).

Histološki obrasci kod lekovima izazvanog oboljenja jetre (*drug-induced liver disease* – DILI) zavise od mehanizma dejstva samog leka. Kontraceptivni steroidi predstavljaju prave indirektno hepatotoksine koji izazivaju holestazni tip oštećenja, odnosno akutno holestatsko oštećenje, i to češće po tipu čistog holestaznog oštećenja (*bland cholestasis*) nego holestatskog hepatitisa (27). Etinilestradiol je komponenta nekih od oralnih kontraceptiva, i već dugo se koristi za izazivanje promena tipa intrahepatične holestaze na životinjskim modelima. O mehanizmima kojima to postiže već je diskutovano, te se neće ponavljati. Još jedan od agenasa koji se koriste za model intrahepatične holestaze je α -naftil izotiocijanat (*alpha-naphththyl isothiocyanate* – ANIT) (176). Potvrda holestatskog efekta EE ili ANIT i patofiziologija oštećenja u *in vivo* studijama, češće se potvrđuju biohemijskim parametrima i subcelularnim i molekularnim promenama, te se malo studija zasniva na histopatološkoj potvrdi holestatskog poremećaja usled EE. Jedna od takvih studija sprovedena je od strane Radzikowske i saradnika. Na jetri jedinki tretiranih etinilestradiolom u njihovom ogledu dijagnostikovane su brojne promene, od masne promene hepatocita, preko promena u endotelu sinusoida i vaskularnih poremećaja do pelioze jetre i fokalne nodularne hiperplazije (136). Naši nalazi nisu u saglasnosti sa ovim istraživanjem. Promene hepatocita jedinki tretiranih etinilestradiolom, bile su minimalne do umerene u vidu obilnije, svetle citoplazme homogenog do paperjastog izgleda u pojedinačnim hepatocitima. Zonalna distribucija promena nije uočena, kao ni poremećaji i promene na vaskularnim elementima jetre. Razlog za ovakvu diskrepancu u nalazima Radzikowske i saradnika i našeg istraživanja može se tražiti u više metodoloških razlika. U njihovom istraživanju obuhvaćene su samo ženke Wistar pacova, te je efekat mogao biti i polno-zavistan. Trajanje njihove studije, odnosno aplikacije estrogena bilo je 8 nedelja, naspram 5 dana u našoj studiji. Kako su i drugi autori pretodnevnom primenom EE u istoj dozi kao i mi (18), dobili biohemijske potvrde holestaze,

vrlo je verovatno da je neophodan dugotrajniji tretman kako bi se ispoljile morfološke promene. Još jedna razlika u metodologiji ogleđa se upravo u visini doze EE, ritmu davanja i mestu aplikacije. U njihovom istraživanju primenjene su doze od 0.00075, 0.0015 i 0.003 mg/kgTM, jednom nedeljno ili svakog trećeg dana, a u svim slučajevima intramuskularno. Grupa koja je dobijala najmanju dozu, jednom nedeljno imala je najblaže promene i najbližnje promenama dobijenim u našem istraživanju. Naša studija dala je rezultate koji su u saglasnosti sa drugim izvorima koji potvrđuju da se promene nakon nekoliko dana intrahepatične holestaze uočavaju pre svega na ultrastrukturnom nivou u vidu oticanja i hidropsne degeneracije hepatocita periportalne zone, pojačane granulisanosti citoplazme, prisustva *Mallory* telašaca, promenama u građi mitohondrija, glatkog i granulisanog endoplazmatskog retikuluma (102, 183). Činjenica da su vrednosti citosolno lociranih transaminaza bile značajno povišene primenom EE, a da aktivnost γ -GT nije bila značajno povišena ni u EE niti u AE grupi, podržava histološki nalaz u našem istraživanju. Primenom EE došlo je do porasta propustljivosti ćelijske membrane, bez poremećaja integriteta ćelijske membrane i same ćelije. Masubuchi i saradnici koristili su ANIT za izazivanje intrahepatične holestaze. Vrednosti enzima jetre i tkivne uzorke analizirali su nakon 6, 24, 48 i 72 časa od administracije ANIT. Nivo enzima dostigao je plato nakon 48h, a histološke promene nakon 24h. Histopatološke promene su bile blage do umerene i delom se podudarale sa našim nalazom. Ogleđale su se u blagom edemu portnog prostora i hepatocita, sa povećanim brojem mitozama. Sa progresijom promena bili su uočljivi pojedinačni nekrotični hepatociti, difuzno raspoređeni u lobulusu, kao i inflamatorne promene (176). Iako u našem istraživanju nisu uočeni hepatociti u deobi na HE bojenju, ulazak hepatocita u proces deobe naknadno je ispitivan primenom imunohistohemijskog bojenja (Ki-67 marker).

Upoređen je i histološki nalaz tkiva jetre jedinki tretiranih sa UDK i MK. Na isečcima jetre bojenim standardnom HE tehnikom, ne uočavaju se promene u građi tkiva i osobinama hepatocita niti u grupi gde je aplikovana UDK, niti u grupi gde je aplikovana MK, odnosno nema odstupanja u odnosu na histološku građu tkiva jetre jedinki kontrolne grupe. Kako oštećenje hepatocita nastaje usled nakupljanja toksičnih ŽK u toku holestaze, naše istraživanje kao i istraživanje drugih autora podržava hipotezu da UDK poboljšava izlučivanje hidrofobnih citotoksičnih ŽK iz hepatocita u holestazi (149, 182). Naše istraživanje je utvrdilo da najverovatnije i monoketoholna kiselina deluje na isti način,

poboljšavajući enzimski status hepatocita i smanjujući histomorfološke promene, što je jedini takav podatak o monoketoholnoj kiselini. Dok se zna preko kojih transportera deluje UDK, taj podatak za MK nije još uvek ispitan. Al-Salami i saradnici zaključili su da ima uticaja na Mrp3 transporter, a Yang i saradnici su ustanovili da MK ne dovodi do oštećenja membrana, ali utiče na mehanička svojstva bioloških membrana što bi moglo da utiče kako na aktivni, tako i na pasivni transport (84, 184).

Tretnutno postoje aktivna pretklinička ispitivanja nekoliko lekova namenjenih holestatskim oboljenjima. To su selektivni modulatori pojedinih nuklearnih receptora ili signalnih molekula koji modifikuju holestazu. Ipak, biće teško razviti lek u vidu jednog molekula koji će biti toliko bezazlen poput UDK, a sa toliko simultanih pozitivnih efekata. Pre svega biće teško razviti takav lek za holestatske poremećaje s obzirom da pogađaju jetru, gde svaki imbalance hepatocita okida brojne patofiziološke promene (65). Monoketoholna kiselina je, za sada, na dobrom putu da se po efikasnosti i netoksičnosti približi ursodeoksiholnoj kiselini. Iako su do sada potencirani njeni efekti na olakšavanje transporta materija kroz biološke membrane (89, 90, 157), u našoj studiji je ispoljila vrlo povoljne efekte na regulaciju glukoze, pokazatelje jetrene funkcije i poboljšanje histološkog statusa. Sve češće se u novijim studijama ispituje efikasnost UDK uz koadministraciju drugih lekova. Tako je ustanovljeno da UDK uz rifampicin (PXR agonist) ima intenzivnije efekte na holestazu ne-opstruktivne etiologije, a da UDK uz koadministraciju budesonida efikasnije popravlja testove jetrene funkcije i histološki nalaz kod obolelih od primarne bilijarne ciroze u stadijumu I-III (178). Pokušava se i sa derivatima same UDK, kao što je *nor*-UDCA. U hepatocelularnom modelu holestaze izazvanom taurilitoholnom kiselinom (*tauroolithocholic acid*- TLCA), konjugat *nor*-UDCA sa taurinom je pokazao bolje antiholestatsko dejstvo u odnosu na monoterapiju sa UDK ili *nor*-UDCA (178).

Dijabetes melitus je dugogodišnja i doživotna bolest, koja usled hiperglikemije dovodi do poremećaja i komplikacija na velikom broju organa i organskih sistema. Kako je jetra uključena u metabolizam glukoze i lipida, histološki vidljive promene u tkivu jetre se javljaju, ali najčešće nakon višegodišnjeg trajanja dijabetesa (20, 21, 22). U skladu sa tim je razumljivo da u našem istraživanju nisu uočene promene u histološkoj građi tkiva jetre i ćelijskim odlikama hepatocita kod jedinki tretiranih samo jednokratnom primenom aloksana (grupa A). Promene koje su uočene u grupi jedinki sa aloksanskim dijabetesom koje su

primale EE, gotovo su identične onima kod jedinki tretiranih samo sa EE. Ipak, naš nalaz je do nekle u kontradikciji sa nalazom Al-Salami i saradnika, koji su zaključili da u aloksanskom dijabetesu dolazi do poremećene funkcije tesnih veza između ćelija i transportnih proteina ćelijske membrane u odnosu na životinje koje nisu primile aloksan (184).

Administracijom ispitivanih žučnih kiselina došlo je do normalizacije histološkog nalaza u tkivu jetre jedinki AE-UDK i AE-MK grupa. Jedan od čestih entiteta koji se histološki dijagnostikuje kod pacijenata obolelih od dijabetesa je nealkoholna masna jetra (*nonalcoholic fatty liver disease* – NAFLD) (185, 186). NAFLD se dijagnostikuje i kod osoba koje pate od gojaznosti i metaboličkog sindroma. Već je navedeno da ŽK ispoljavaju blagotvorno dejstvo u navedenim metaboličkim oboljenjima (150), pa ne uznenadjuje činjenica da su i u našem istraživanju UDK i MK poboljšale histološku sliku tkiva jetre dijabetičnih jedinki sa znacima holestatskog poremećaja jetre. Cipriani i saradnici ispitivali su ulogu derivata ŽK u regulaciji metaboličkih funkcija i histologiju jetre kod gojaznih pacova (leptin deficijentni Zucker *fa/fa* pacovi). Ovi pacovi pokazuju znake insulinske rezistencije, poremećaj lipidnog statusa, povećanu telesnu masu i promene u tkivu jetre (makrovezikularna steatoza, bubrenje hepatocita i retko inflamaciju u portnim prostorima). Primenjen je derivat ŽK, 6E-CDCA (6-ethyl-chenodeoxycholic acid) u dozi od 10 mg/kg, a efekti su poređeni sa delovanjem rosiglitazona (10 mg/kg). Rosiglitazon je poboljšao insulinsku rezistenciju i lipidni status, ali je čak doprineo uvećanju telesne mase i nakupljanju masti u hepatocitima. Nasuprot tome, 6E-CDCA koja je ligand FXR, imala je iste metaboličke efekte ali je i sprečila uvećanje telesne mase i depozicije masti u skeletne mišiće i jetru (52). Ista žučna kiselina 6E-CDCA ispitivana je na modelu ciroze jetre kod životinja i značajno je poboljšala histološki status. 6E-CDCA koja se još naziva i obetiholna kiselina (*obeticholic acid*– OCA) je derivat CDCA. Trenutno je u toku 2b faza kliničkog ispitivanja obetiholne kiseline u terapiji nealkoholnog steatohepatitisa (*Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in Nonalcoholic Steatohepatitis Treatment* – FLINT). Dosadašnji rezultati ovog ispitivanja pokazuju da OCA poboljšava histološke parametre steatohepatitisa, steatozu, inflamaciju i baloniranje hepatocita (187).

5.5. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na ekspresiju Ki-67 markera i proliferaciju hepatocita

U zrelim, odraslim jedinkama, broj ćelija je izbalansiran usled odgovarajućeg odnosa procesa ćelijske proliferacije i ćelijske smrti. Određeni autori smatraju da apoptoza igra komplementarnu, ali upravo suprotnu ulogu u odnosu na mitozu, u održavanju ćelijske i tkivne homeostaze (188).

Ne postoji standardizovana vrednost, odnosno nivo ekspresije Ki-67, koji se smatra normalnim u jetri pacova. Stoga smo analizom ekspresije Ki-67 proteina u hepatocitima kontrolne grupe prvo ustanovili koliko ćelija je Ki-67 pozitivno kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom. Tako smo odredili graničnu vrednost od <10% Ki-67 pozitivnih (Ki-67⁺) hepatocita. Ekspresija Ki-67 u 10% ili više ćelija smatrana je povećanjem proliferacije hepatocita. U drugim studijama koje su se bavile uticajem ŽK na proliferaciju hepatocita, metodologija je bila drugačija i zasnivala se na određivanju količine DNK ili stepenu inkorporacije i sinteze proteina koji ulaze u sastav DNK (188, 189).

Daljom analizom došli smo do podatka da se grupa tretirana propilen glikolom (K2) ne razlikuje od kontrolne grupe u pogledu proliferacije hepatocita. Kod jedinki sa aloksanskim dijabetesom bez holestaze, 20% je pokazalo povećanu proliferaciju hepatocita, što nije statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu jedinki. Iako se ne može sa sigurnošću tvrditi bez dodatnog ispitivanja, moguće je da je ovakav rezultat u A grupi posledica velikog poremećaja metabolizma glukoze, odnosno odgovor tkiva jetre na ovaj poremećaj (190).

Ni jedna jedinka tretirana samo etinilestradiolom (EE), odnosno dijabetična jedinka tretirana etinilestradiolom (AE), nije imala povećanu proliferaciju hepatocita. Naši rezultati u grupi EE su do neke nesaglasni sa rezultatima Barone i saradnike, koji su nakon izazivanja holestaze dokazali povećanu proliferaciju hepatocita. Ovu nesaglasnost treba uzeti donekle sa rezervom, s obzirom da metod izazivanja holestaze nije isti, tj oni su holestazu izazvali hranom bogatom CA i DCA, čime su postizane veoma visoke koncentracije toksičnih kiselina (191). Međutim i druge, novije studije došle su do podataka da nakupljanje ŽK u hepatocitima vodi aktivaciji FXR receptora, a da on utiče na regulatore ćelijskog ciklusa (*forkhead box m1b*) i stimuliše reparaciju i regeneraciju jetre (192). Kako je u našoj studiji izostala proliferacija hepatocita u grupama gde je biohemijski verifikovana holestaza,

objašnjenje bi se moglo potražiti u nedovoljnom porastu ŽK ili suboptimalnom sastavu ŽK neophodnih za pojačanu proliferaciju. Podrška ovoj tezi je svakako i podatak o malom porastu aktivnosti γ -GT u plazmi, kao i oskudan histološki nalaz u EE i AE grupama.

U grupama u kojima je uz EE primenjena ŽK, proliferacija je bila uočljivo (E-UDK) odnosno statistički značajno povećana (E-MK). Slično je bilo i među dijabetičnim jedinkama. Više jedinki grupe AE-UDK je imalo povećan proliferativni indeks u odnosu na AE-MK, ali su obe grupe pokazale statistički značajan porast proliferacije u odnosu na AE grupu.

Tokom niza godina sproveden je velik broj ispitivanja uticaja ŽK na proliferaciju hepatocita i regeneraciju jetre. Rezultati su brojni, ali i kontradiktorni. Starija istraživanja dala su rezultate slične našim. Hrana bogata UDCA i TUDCA dovela do proliferacije hepatocita i redukcije biohemijskih markera holestaze *in vivo* kod jedinki sa parcijalnom hepatektomijom. CA i DCA su dovele do pogoršanja holestaze i značajnije proliferacije, dok se kod jedinki tretiranih sa UDCA i TUDCA histološki nalaz i markeri holestaze nisu razlikovali u odnosu na kontrolu, ali je proliferacija hepatocita bila znatno viša. Naše mišljenje je u saglasnosti sa njihovim zaključkom da UDK povećava proliferaciju hepatocita uz smanjenje (toksičnih) efekata i markera holestaze, i da se modifikacijom sastava ŽK u organizmu može stimulisati proliferacija hepatocita. Oni nisu zalazili u objašnjenja kako bi koja od ovih kiselina dovodila do proliferacije.

Dalja istraživanja su, kao i naše, pokazala da UDK povoljno utiče na deobu ćelije. Danchenko i saradnici utvrdili su da UDK i njen derivat TUDCA štite proces sinteze DNK, koji narušavaju druge ŽK. GCDCA dozno-zavisno smanjuje inkorporacija [6-³H]timidina i [³⁵S]metionina u molekul DNK, a ovaj efekat je korigovan davanjem TUDCA. Smatrali su da se zaštitni efekat TUDCA može pripisati stabilizaciji membrane, što je osobina ursodeoksiholne kiseline (188). Uticaj UDK i drugih ŽK na sintezu DNK tokom regeneracije jetre *in vitro* i/ili *in vivo* su dokazali i drugi autori, od kojih su Heuman i saradnici doveli u pitanje uticaj hidrofilnosti/hidrofobnosti molekula ŽK na mogućnost pojedinih ŽK da modifikuju sintezu DNK (191, 193, 194, 195, 196). Oni su dokazali protektivni uticaj UDK i konjugata na celovitost i metabolizam eritrocita u smatrali da je to rezultat mehanizama koji nisu isključivo specifični za hepatocite, odnosno preuzimanje, metabolizam i transport ŽK (195).

Uticaj na aktivnost timidin-kinaze bio je jedan od pretpostavljenih mehanizama delovanja nekonjugovanih i tauro-konjugovanih ŽK na regeneraciju jetre pacova. Martinez-Diez i saradnici su testirali uticaj CA, DCA, CDCA i UDK u nekonjugovanom obliku i konjugata kiselina sa taurinom i glicinom. ŽK su aplikovane u kulturi hepatocita pacova, a vijabilnost ćelija je testirana 6h od aplikacije ŽK (testiranjem očuvanosti integriteta i funkcije mitohondrija, lizozoma, endoplazmatskog retikuluma i ćelijske membrane). Oni su pokazali da toksične ŽK dovode do redukcije vitalnosti ćelija i sinteze DNK. Nekonjugovana DCA je ispoljila najveću redukciju vitalnosti, dok je konjugacija umanjila toksičnost. Dalje su ispitivali uticaj DCA i konjugata na sintezu DNK. Došli su do interesantnog podatka, da DCA u koncentraciji u kojoj značajno inhibira sintezu DNK, ne dovodi do značajne redukcije vitalnosti ćelija. Došli su i do još jednog podatka koji je kontradiktoran sa drugim studijama, a to je da TUDCA ne umanjuje efekat DCA u inhibiciji sinteze DNK. Smatraju da je razlog mehanizam kojim DCA deluje na sintezu DNK, a koji je drugačiji od onih koji dovode do citotoksičnosti, kao i drugačiji metodološki pristup (189).

Novija istraživanja ispitivala su mehanizme koji utiču na regeneraciju jetre i deobu ćelija. Zhang i saradnici su na modelu parcijalne hepatektomije i CCl₄-indukovanog oštećenja jetre opisali uticaj FXR aktivacije u oštećenju jetre. Smanjena funkcija jetre dovodi do nakupljanja toksičnih ŽK koje aktiviraju FXR, a on uticajem na regulatore ćelijskog ciklusa podstiče regeneraciju jetre (192). Njihovo istraživanje ne daje objašnjenja povećane proliferacije pod dejstvom kiselina poput UDK, koje nisu ligandi FXR i redukuju sadržaj hidrofobnih ŽK (ligandi FXR). Drugi autori koji su utvrdili da ŽK povećavaju proliferaciju ćelija intestinalnog trakta i jetre (192, 197, 198), smatrali su da se ovaj proliferativni efekat može objasniti i direktnim mitogenim potencijalom ŽK, pa bi bila dobrodošla dalja ispitivanja UDK i MK na regulaciju ćelijskog ciklusa (198). Osim FXR, i drugi nuklearni receptori imaju uticaja na razmnožavanje ćelija. U studiji Shizu i saradnika, dokazano je da PXR sam ne utiče na proliferaciju, ali da aktivacija PXR utiče na ćelijski ciklus glodara omogućavanjem CAR receptorima da ispolje proliferativno dejstvo (61). Prolongirana primena aktivatora PPAR kod glodara dovodi do stimulacije proliferacije hepatocita i čak do tumorskih promena (199). Iz navedenog proizilazi da direktni ili posredni uticaj UDK i MK na receptore ŽK predstavlja još jedan od mogućih mehanizama proliferativnog delovanja.

Ipak, otkriveni su i mehanizmi nezavisni od receptora ŽK koji dovode do proliferacije hepatocita. Nakon parcijalne hepatektomije, značajnu ulogu u hiperplaziji jetre igra supresija CYP7a1 enzima, glavnog i ograničavajućeg enzima sinteze ŽK. Ustanovili su da ta supresija nije bila regulisana aktivacijom FXR, već da je na neki način povezana sa različitim protein kinazama (200). Kako je u našem istraživanju došlo do povećane proliferacije hepatocita u E-MK i E-UDK grupama, bez statistički značajnog povećanja ekspresije FXR, moguće je da UDK i MK drugačijim putem regulišu supresiju CYP7a1 i podstiču proliferaciju (200).

I drugi istraživači pokušali su da nađu objašnjenje uticaja UDK. Ispitivanjem mikroRNK *in vitro* i *in vivo* dokazano je da UDK modifikuje mikroRNK i favorizuje proliferaciju ćelija. Uzun i saradnici su dokazali da UDK poboljšava regeneraciju jetre u nealkoholnoj masnoj jetri antioksidativnim delovanjem, što je još jedan aktuelan pravac istraživanja (196).

I pored brojnih odgovora koje su istraživanja pružila, ostaje i mnogo pitanja vezanih za uticaj ŽK na sintezu DNK i proliferaciju ćelija, od kojih je najznačajnije koji je dominantan mehanizam delovanja? Nejasno je da li razlike u efektu pojedinih ŽK na proliferaciju ćelija proizilaze iz dinamike preuzimanja i ekskrecije u žuč, odnosno od vremena izloženosti ćelije, ili pak od posebnih i specifičnih svojstava svake od ŽK. Takođe, iako je bilo takvih naznaka u *in vivo* istraživanjima, razmatra se da li je oštećenje funkcije hepatocita ili drugih ispitivanih ćelija, preduslov za delovanje ŽK (189).

Ne treba zaboraviti da ŽK imaju (stimulatorni ili inhibitorni) uticaj i na diferencijaciju i proliferaciju preadipocita i adipocita. UDK je imala antiproliferativni efekat u fiziološkim uslovima, ali kada je kultura preadipocita bila izložena oksidativnom stresu porekla endoplazmatskog retikuluma, UDK je imala antioksidativni i proliferativni uticaj (147). Brojne novootkrivene funkcije ŽK i receptori preko kojih ostvaruju svoja dejstva, doveli su do istraživanja koja ispituju uticaj ŽK na proliferaciju ili inhibiciju iste u ćelijama benignih i malignih tumora (199, 201, 202).

5.6. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na apoptozu hepatocita

Genetski kod apoptoze prisutan je kod svih višćelijskih organizama. Kod kičmenjaka, je po prvi put uočeno da su u proces apoptoze uključene mitohondrije. Bilo je iznenađujuće otkriće da citohrom c, normalno prisutan u mitohondrijama, učestvuje u aktivaciji kaspaza u citoplazmi. Sledila su otkrića nastanka pora u membrani mitohondrija i oslobađanje tzv apoptogenih faktora, što je definisano kao “tačka bez povratka” u životnom ciklusu ćelije (119).

Apoptoza je prisutna u fiziološkim procesima tokom rasta i razvoja, homeostaze imunog sistema i različitih fizioloških stanja. U odraslom dobu, očuvan mehanizam apoptoze otklanja maligno alterisale ćelije, sprečavajući njihovu nekontrolisanu proliferaciju, a nasuprot tome, nastanak tumora je olakšan kada je apoptoza neadekvatna ili blokirana (119). Inicijacija apoptoze može nastati usled signala izvan ćelije koji se prenose transmembranskim receptorima, ili unutar ćelije. Okidači unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze mogu biti oštećenje DNK, oksidativni stres, porast Ca^{+} u citoplazmi, i mnogi drugi. Prema preporukama Komiteta za nomenklaturu ćelijske smrti, razlikuje se kaspaza-zavisni i nezavisni unutrašnji put aktivacije, ali se u centru oba puta nalaze mitohondrije, odnosno formiranje pora na spoljašnjoj membrani mitohondrija (MOMP) (203).

Porodica Bcl-2 proteina reguliše nastanak i permeabilnost MOMP. Bcl-2 protein je prvi put otkriven kao onkogen u ćelijama limfoma, gde je njegova pojačana ekspresija usled translokacije, sprečavala smrt limfomskih ćelija i promovisala proliferaciju. Do danas je identifikovan velik broj proteina ove skupine. Primarno mesto delovanja ovih proteina je spoljašnja membrana mitohondrija, a nalaze se u stalnoj međusobnoj interakciji (119). Ranije je pomenuto da postoji grupa antiapoptotskih i pro-apoptotskih Bcl-2 proteina. Proapoptotski proteini (npr Bax, Bak) imaju više BH domena, i odgovorni su za formiranje MOMP. Njihovo delovanje je sprečeno delovanjem antiapoptotskih multidomenskih proteina (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, Mcl-1, A1). U suštini, inhibicija ili aktivacija i jedne i druge grupe, zavisi od tzv BH3-only proteina Bcl-2 porodice. Oni su zaduženi za stvaranje dva uslova za otvaranje MOMP i inicijaciju apoptoze. Prvi uslov je inhibicija antiapoptotskih Bcl-2 proteina, i za to su zaduženi BH3-only derepresori/senzitizeri (Puma, Bad, Noxa i drugi). Samo ovaj uslov nije dovoljan, već je neophodno da dodje do aktivacije proapoptotskih Bcl-2 proteina. Ovu

ulogu ostvaruju proteini aktivatori iz grupe *BH3-only* proteina. *BH3-only* aktivatori (Bid i Bim) aktiviraju Bax i Bak u kratkotrajnoj interakciji (“*hit and run*”), kada su prethodno inaktivirani antiapoptotski proteini (119). Treba dodati da postoje i neki alternativni načini aktivacije Bax i Bak (između ostalog, putem p53) (119, 128, 204). Nakon formiranja MOMP, citohrom c u citoplazmi učestvuje u stvaranju apoptozoma, koji je okidač za proteolitičku aktivaciju kaspaza 9 i 3, takozvanih “egzekutora” ćelije (203).

p53 u ćelijama sisara evolutivno potiče od transkripcionog faktora metazoa, čija je osnovna funkcija bila odgovor na stres. Tumor-supresorska uloga p53 razvila se kod dugoživećih vrsta, kao adaptacija na kontinuiranu akumulaciju mutacija tokom brojnih deoba. Ipak, ne treba zaboraviti da p53 ima raznovrsne uloge koje nisu vezane za onkogenezu (128, 205). Kao odgovor na brojne ekstra- i intracelularne stresore, dolazi do niza post-translacijskih modifikacija p53 od kojih zavisi na koji način će i na koje gene p53 uticati. Pre svega, p53 ima ulogu transkripcionog faktora, koji je u zdravim ćelijama prisutan u maloj količini. U novije vreme su objašnjene i uloge citoplazmatskog p53 (128). Važnu ulogu u sudbini samog p53 ima Mdm-2 protein (*mouse double minute-2*), koji formira p53-Mdm-2 kompleks, sprečava transkripcionu ulogu p53 i čini ga podložnim za razgradnju. Oslobođanje iz ovog kompleksa potencira dejstvo p53. Jedan od najdramatičnijih odgovora na p53 aktivaciju je indukcija apoptoze. Pri tome, ćelija tipično prati mitohondrijalni put apoptoze, iako p53 modifikuje i spoljašnji put apoptoze (123, 128, 205). Najnovije studije ukazuju na još jednu ulogu p53, nezavisnu od transkripcije. Naime, citoplazmatski p53 pojačava nakupljanje Ca^{2+} u endoplazmatskom retikulumu, delujući na specifične transportere (205, 206).

U istraživanjima apoptoze, koristi se više metoda:

- citomorfološka analiza,
- detekcija kaspaza, supstrata, regulatora i inhibitora
- DNA fragmentacija
- ispitivanja promene membrana
- tehnika “velikih rezova” (*whole mounts*)
- tehnike ispitivanja mitohondrija (*mitochondrial assays*) (123).

Na HE bojenim rezovima tkiva primenom svetlosnog mikroskopa moguće je prepoznati apoptotične ćelije, ali je neophodna potvrda nekom od osetljivijih metoda. Morfološke promene su brze a ostaci i fragmenti se brzo fagocituju, tako da je moguće da se apoptoza odigra, a da se ne detektuje. Ovom tehnikom se detektuju takoreći, kasni događaji u apoptozi, pa ćelije koje se nalaze u ranoj fazi neće biti uočene (123). Iz tog razloga smo prisustvo apoptski izmenjenih ćelija, osim histoheimijskim bojenjem, analizirali i imunohistoheimijskom detekcijom proteina p53, Bcl-2, Bcl-x i Bax.

Ekspresija proapoptoskog proteina Bax nije uočena kod jedinki tretiranih fiziološkim rastvorom ili propilen glikolom. Kod jedinki na EE tretmanu, uočena je slaba citoplazmatska ekspresija Bax, ali statističkim metodama nije dokazana značajnost razlika u odnosu na kontrolu. U pogledu ekspresije p53 proteina, slaba citoplazmatska ekspresija bila je prisutna i u kontrolnoj grupi i u grupi jedinki koje su primale samo EE. Procentualno, razlika u ekspresiji p53 između ovih grupa nije statistički značajna, ali je sa histopatološkog stanovišta značajno to što je u grupi EE, uočena nuklearna ekspresija p53. Hepatociti kontrolne grupe i grupe tretirane propilen glikolom, pokazali su slabu citoplazmatsku ekspresiju antiapoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-x, dok hepatociti jedinki na EE-tretmanu nisu bili Bcl-2 i Bcl-x pozitivni, što statistički gledano, nije značajno.

U grupama gde je izazvan dijabetes, promena ekspresije proteina Bcl-2 familije i p53 bila je nalik onima uolestazi. Ekspresija Bcl-2 nije prisutna u grupama tretiranim samo aloksanom i aloksanom i etinilestradiolom, a ekspresija Bcl-x je opala u A grupi, i najmanja je u AE grupi. Nasuprot tome, uočen je porast ekspresije Bax, i nuklearna ekspresija p53 u AE grupi. I u ovom slučaju, razlike u odnosu na kontrolnu grupu i grupu tretiranu samo sa EE, nisu statistički značajne.

Iako bez statistički potvrđenih značajnosti u promeni ekspresije posmatranih markera, jasno je da je došlo do smanjene ekspresije antiapoptotskih proteina i inicijalne ekspresije proapoptotskog Bax, što govori u prilog stvaranja proapoptotskog okruženja u pojedinim hepatocitima nakon primene EE i aloksana pojedinačno ili u kombinaciji. Nuklearna ekspresija p53, potvrđuje ovo stanovište, s obzirom da glavni doprinos apoptozi p53 ostvaruje u jedru, kroz pojačanu transkripciju proapoptotskih proteina (Bax, Noxa, Puma) ili supresiju transkripcije antiapoptotskih proteina. Osim ovog nuklearnog delovanja, uočeno je da p53 u citosolu stimuliše proapoptpske Bcl-2, njihovu oligomerizaciju i ulazi u fizičku interakciju sa

antiapoptotskim Bcl-2 i Bcl-xl proteinima (128, 205). Kako je u osnovi holestaze i dijabetesa oštećenje reaktivnim kiseoničnim vrstama i poremećaj antioksidativne odbrane, razumljivo je da su rezultati ispitivanja apoptoze slični u ovim grupama. Intenzivnija apoptoza možda nije uočena zbog kraćeg trajanja studije ili je poremećaj redoks homeostaze bio blažeg stepena. Ipak, ne može se zanemariti suptilna promena anti- i proapoptotskih činilaca koja govori u prilog malog stepena aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze. Naši rezultati u tom smislu ne odstupaju od rezultata drugih autora. Serrviddio i saradnici nakon nakon 28 dana trajanja holestaze, nisu utvrdili pojavu apoptoze u hepatocitima. Međutim, citološkim metodama su ustanovili da, u odnosu na veličinu ćelija, postoje dve populacije- male ćelije i ćelije uobičajene veličine. Male ćelije su bile u većoj meri prisutne kod jedinki koje nisu primale neki vid terapije. Ove ćelije su bile žive, bez znakova apoptoze, ali su u sebi sadržale produkte koji su ukazivali na oštećenje ćelije (207).

Naše istraživanje, kao i istraživanja drugih autora podržavaju stav da oštećenje jetre u holestazi nastaje usled akumulacije toksičnih ŽK, sledstvenog poremećaja funkcije mitohondrija i većeg stvaranja ROS i pada antioksidativnih mehanizama (82, 208). Danchenko i saradnici su poredili uticaj GCDCA i TUDCA na apoptozu hepatocita u kulturi ćelija, a apoptoza je dokazivana ispitivanjem DNK. GCDCA je toksična za hepatocite, a u toku holestaze njena koncentracija značajno raste. U njihovom ogledu dovela je do porasta broja hepatocita u apoptozi, sa 6% koliko je procenjeno u kontrolnoj grupi, na 15% (188)(13). Nešto drugačije rezultate su dobili Martinez-Diez i saradnici. Dodajući nekonjugovanu i konjugovanu DCA kulturi hepatocita, došli su do zaključka da u toku holestaze dolazi do disregulacije sinteze DNK, ali da to ne mora nužno biti vezano za smanjenu vitalnost ćelija (189). Yerushalami i saradnici su primenivši drugačiju metodologiju, došli do rezultata sličnih našim. Kulturi sveže izolovanih hepatocita pacova tokom 4h, dodavali su hidrofobnu GCDCA i hidrofilnu GCA, prateći svakog sata produkciju ROS i apoptozu. Utvrdili su da su produkcija ROS, permeabilnost membrane mitohondrija i oslobađanje citohroma c glavni koraci u apoptozi izazvanoj žučnim kiselinama. Kod primene GCDCA procenat apoptotičnih ćelija je dozno- i vremenski zavisno rastao, a apoptozi je prethodilo povećano stvaranje ROS (82).

Primena aloksana dovodi do intenzivnih redoks reakcija aloksana i dialurične kiseline sa velikom produkcijom ROS. β -ćelije pankreasa, zavisno od modela primene aloksana odumiru

nekrozom ili apoptozom što dovodi do modela dijabetesa tip 1 (134). Delovanje aloksana nije ograničeno samo na pankreas. Opisane su brojne promene u tkivu jetre kod pacova sa aloksanskim dijabetesom, od najblažih i reverzibilnih do nekrotične ili apoptotske smrti ćelija (105, 209, 210, 211). Lucchesi i saradnici su nakon 26 nedelja od izazivanja aloksanskog dijabetesa opisali promene arhitektonike jetre i ultrastrukturne promene koje odgovaraju histopatološkom nalazu jetre kod ljudi, počevši od steatoze, preko steatohepatitisa do fibroze i ciroze jetre. Ultrastrukturno, opisali su redukciju broja organela, degeneraciju mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i jedra, što odgovara ultrastrukturnom izgledu ćelija koje podležu apoptozu (210). Kao i u našem istraživanju, promene histološke slike bile su praćene porastom AST, ALT, lipidne peroksidacije, i padom aktivnosti enzima antioksidativne odbrane (210, 211). Rashid i saradnici su primenom TUNEL metoda, utvrđivanjem fragmentacije DNK ispitivali pojavu apoptoze u hepatocitima nakon primene aloksana. U njihovoj studiji, uočen je značajan nivo fragmentacije DNK te su zaključili da je u znatnom broju hepatocita došlo do apoptoze (105). Kako kod nas postoji blag porast ekspresije Bax u A grupi i to bez statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom, moguće je da je razlog kraće trajanje našeg ogleada. Drugi potencijalni razlog neslaganja naših studija je i različita metodologija detekcije apoptoze, s obzirom da je TUNEL osetljivija metoda od imunohistohemijske detekcije proteina Bcl-2 porodice i p53 (212).

S obzirom da je naša studija izvedena na jedinkama pacova, zanimljiv je rezultat istraživanja Gumprecht i saradnika na izolovanim mitohondrijama hepatocita odraslih (9 nedelja života) i mladih (6-36 dana života) pacova. Ustanovili su da su mitohondrije mladih pacova mnogo manje podložne oštećenju putem ŽK u holestazi, te su hepatociti mladih jedinki rezistentniji na apoptozu (213). Ispitivanjem sastava ŽK u žuči mladih i starijih osoba, došlo se do rezultata da se kompozicija ŽK menja sa godinama, i da su sa starijom dobi sve više zastupljene hidrofobne ŽK (214). Ovaj nalaz govori u prilog da se u poređenju studija na životinjskim modelima mora voditi računa o svim faktorima koji mogu uticati na razlike u rezultatima, kao i da se rezultati dobijeni animalnim modelima ne mogu direktno ekstrapolirati na humane modele. Čak i ispitivanja na humanim kulturama ćelija hepatoma, ne daju pravu sliku puteva aktivacije i interakcija u apoptozu kod tumorski netransformisanih hepatocita u holestazi (208). Woolbright i saradnici izneli su još jednu sumnju u pogledu *in vivo* i *in vitro* toksičnosti GCDCA i drugih hidrofobnih ŽK, kako kod ljudi tako i kod

životinja. *In vivo*, koncentracija ŽK u serumu je slična koncentraciji u tkivu jetre, a ŽK čija koncentracija najviše raste su ne toksične ŽK poput TCA i GCA kod ljudi, tj TCA i α - i β -muriholna (*muricholic acid*- MCA) kod glodara. Koncentracija GCDCA kod ljudi raste polako, do 30 $\mu\text{mol/L}$ u uslovima teške holestaze, a studije na kulturama humanih hepatocita pokazuju blage citotoksične efekte tek na daleko višim koncentracijama. Slične razlike su uočili i na animalnim modelima i kulturama ćelija, pa smatraju da je uzrok to što su *in vivo* hepatociti izloženi mešavini ŽK od kojih neke pokazuju citoprotektivna i antiapoptotska svojstva (69).

Primena žučnih kiselina u našem istraživanju dovela je do promena u ekspresiji proteina uključenih u aktivaciju ili inhibiciju apoptoze. U grupi tretiranoj sa UDK i EE, došlo je do ekspresije Bcl-2 uprkos primeni EE, ekspresija Bcl-x se nije promenila, a redukovana je ekspresija Bax. Monoketoholna kiselina uz EE nije sprečila redukciju ekspresije posmatranih antiapoptotskih markera i nije imala uticaja na Bax. Međutim, obe primenjene ŽK su uticale na p53 protein. UDK je potpuno redukovala ekspresiju p53 u oba ćelijska kompartmana, dok uz primenu MK postoji slaba citoplazmatska ekspresija, ali nema nuklearne ekspresije p53. U grupama dijabetičnih jedinki uz EE tretman, obe ŽK su pospešile ekspresiju Bcl-2, ali kao i kod samo EE tretmana, nisu uticale na rast ekspresije drugog antiapoptotskog markera, Bcl-x. Kako su obe kiseline sprečile nuklearnu ekspresiju p53, verovatno je i indukcija Bcl-2 i redukcija Bax posredovana smanjenom aktivnošću p53 u transkripciji. Takođe, izostanak citoplazmatske ekspresije p53, je verovatno sprečio druge mehanizme delovanja p53. Dobijeni podaci ukazuju da se primarno dejstvo UDK i 12-MK ostvaruju regulacijom p53 u citoplazmi i jedru, regulišući na taj način pro- i antiapoptotske članove Bcl-2 familije.

UDK sprečava apoptozu tokom holestaze kako regulacijom sastava žuči, tako i redukcijom stvaranja MOMP i ROS, što je dokazano i u našem istraživanju i o čemu je već diskutovano. Još jedan od mehanizama je regulacija proteina Bcl-2 familije (65). Mitohondrije hepatocita kod pacova hranjenjih hidrofobnim ŽK imale su povećan sadržaj Bax, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Tretman sa UDK je u potpunosti sprečio ovaj porast, što u našem istraživanju nije bio slučaj. Blokada pro-apoptotskih mehanizama ostvaruje se delovanjem na različite transkripcione faktore Jun i Fos grupe. Indukciju antiapoptotskih članova Bcl-2 porodice, UDK ostvaruje vezivanjem za EGFR receptore, čime aktivira različite protein-kinaze (MAPK, PI3K) (102). Čini se da je u našem istraživanju

glavni mehanizam delovanja UDK regulacija p53. UDK sprečava translokaciju p53 iz citoplazme u jedro. U našem istraživanju je upravo to i potvrđeno, jer u grupama tretiranim sa UDK, ali i MK nije bilo nuklearne ekspresije p53. Osim toga, UDK skraćuje poluživot p53 i ubrzava njegovu razgradnju. Amaral i saradnici su ustanovili da UDK pospešuje vezivanje p53 za Mdm2 protein, što ga čini podložnijim razgradnji (81). Ovaj efekat UDK može objasniti izostanak i citoplazmatske i nuklearne ekspresije p53 kod jedinki na EE i ALX+EE tretmanu. Trebalo bi ispitati da li i monoketoholna kiselina utiče na razgradnju p53, s obzirom da je u citoplazmatska ekspresija p53 bila prisutna i kod E-MK i AE-MK grupe. I drugi autori slažu se da je regulacija p53 glavni mehanizam antiapoptotskog delovanja UDK (81, 128, 215). U ostvarivanju antiapoptotske uloge UDK i regulacije aktivnosti p53, važnu ulogu igra i aktivacija glukokortikoidnih receptora (GR). ŽK mogu biti ligandi GR, a aktivacija ovih receptora i čitave hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine utiče na metabolizam i homeostazu ŽK, regulaciju pokazatelja jetrene funkcije i histološki status jetre (216). Weitzel i saradnici su na kulturi hepatocita pacova ustanovili da se UDCA ne vezuje direktno za GR, ali da dozno-zavisno aktivira intracelularne GR (217). UDK je na GR-zavistan način dovela do indukcije antioksidativnog enzima katalaze (218). Nuklearni GR su važni i za translokaciju UDK iz citosola u jedro, što sprečava brojne pro-apoptotske transkripcione faktore, uključujući i p53 (102, 215). Za sada nije poznato da li je MK u stanju da aktivira GR i druge receptore ŽK, i u ovom pravcu su neophodne dalje studije. Do sada je dokazano da modifikacija holne kiseline i uvođenje keto-grupe, doprinosi ostvarenju brojnih povoljnih i citoprotektivnih svojstava 12-MK. Ustanovljeno je da vrlo slabo menja svojstva ćelijske membrane, ima slab afinitet za inserciju u modele membrana kao i da ne izaziva hemolizu eritrocita (84).

Ne treba zanemariti ni stavove o vezi apoptoze i oksidativnog stresa porekla endoplazmatskog retikuluma. Postoje indicije da pojedini apoptotski signali mogu zaobići mitohondrije i direktno aktivirati kaspaze. U holestazi dolazi do OS porekla endoplazmatskog retikuluma, sa aktivacijom kaspaze 12 bez uplitanja mitohondrija (66, 102, 219). UDK je u stanju da reguliše i suprimira i ovaj put aktivacije apoptoze (65).

Citoprotektivna svojstva UDK nisu dokazana u svim studijama. Martinez-Diez i saradnici nisu uočili protektivno delovanje UDK i njenih derivata na vitalnost kulture hepatocita pacova uz dodatak toksičnih ŽK (189). Takođe, nekonjugovana UDK na kulturi

ćelija hepatocelularnog karcinoma imala je pro-apoptotski efekat (220). Isto je dokazano i u kulturi Jurkat ćelija (T-ćelijski limfom), gde je UDK čak u većoj meri izazvala nekrozu (221). I ove rezultate treba uzeti s rezervom, jer je reč o tumorski izmenjenim ćelijama. U *in vivo* uslovima, ovo može biti povoljno dejstvo po organizam, što se ogleda u činjenici da UDK kod pacijenata sa cirozom smanjuje rizik za nastanak hepatocelularnog karcinoma (222). Kuhajda i saradnici su ispitivali citotoksičnost niza sintetskih derivata različitih prirodnih ŽK. Među brojnim značajnim rezultatima koje su prikazali, interesantno je da su konjugovani oblici 12-ketoholne kiseline pokazali citotoksična svojstva prema kulturama tumorskih ćelija (MCF-7, HeLa S-3, PC-3), ali nisu delovali toksično na kulturu zdravih fibroblasta pluća (MRC-5) (95). Ispitivanja sintetskih ŽK i derivata ŽK usmerena su u velikoj meri na pro-apoptotsko delovanje u tumorskoj patologiji. Tako je na ćelijama karcinoma prostate, utvrđeno je pro-apoptotsko delovanje sintetskih derivata UDK (HS-1183) i CDCA (HS-1199, HS-1200) (223). Veoma opsežnu studiju u tom pravcu sproveli su Kim i saradnici i na velikom broju sintetskih ŽK ustanovili da imaju veliki uticaj u regulaciji ćelijskog ciklusa i preživljavanja tj smrti tumorskih ćelija (224).

5.7. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na ekspresiju FXR u hepatocitima

FXR je jedan od brojnih nuklearnih receptora, sa dominantnom ulogom u sintezi, preuzimanju i ekskreciji žučnih kiselina iz jetre. Shodno tome, u najvećoj meri ga ekspimiraju tkiva organa koji su uključeni u transport ili metabolizam ŽK. Transkripcijsku ulogu ostvaruje formiranjem heterodimera sa drugim nuklearnim receptorom, RXR (12). Prvi put je otkriven u jetri pacova, i nazvan po farnesolu, međuproduktu sinteze mevalonata, koji ga je aktivirao u suprafiziološkim koncentracijama. Nedugo zatim, otkriveno je da su ŽK najpotentniji ligandi FXR (225). Kod sisara postoje dva FXR gena, α i β . Kod ljudi, za razliku od glodara, FXR β je inaktivan, tj nema funkciju receptora ŽK (44). FXR ima klasičnu multidomensku strukturu nuklearnih receptora. Pomenuti FXR/RXR dimer se vezuje za specifično mesto na DNK, a može biti aktiviran nakon interakcije sa ligandom bilo kog od ta dva receptora. FXR potom podleže konformacijskim promenama, otpušta korepresore i vezuje koaktivatore što ubrzava remodelovanje hromatina i aktivaciju transkripcije (225).

FXR u najvećoj meri ekspimiraju ćelije jetre, creva, bubrega, žučne kese i nadbubrežne žlezde. U manjoj meri prisutan je u adipocitima, kardiomiocitima, β -ćelijama pankreasa, endotelu, limfocitima, monocitima i glatkim mišićnim ćelijama, dok nije ustanovljeno prisustvo FXR u nervnim ćelijama i ćelijama skeletnih mišića (12, 44, 225). Prvu studiju u kojoj je temeljno imunohistohemijskim metodama ispitana ekspresija FXR (i RXR) u tkivu glodara u fiziološkim uslovima, sproveli su Higashiyama i saradnici. FXR⁺ ćelije u tankom i debelom crevu bili su enterociti, sa intenzivnijim bojenjem u tankom crevu. U bubrezima, FXR⁺ ćelije su bile epitelne ćelije proksimalnih, distalnih i sabirnih kanalića, a ćelije Henleove petlje bile su FXR-negativne (FXR⁻). U nadbubregu, ćelije u retikularnoj zoni kore pokazivale su vrlo slabo do slabo nuklearno bojenje na FXR. Vrlo slabo bojenje detektovali su i u bazalnom sloju epitela jezika, jednjaka, kože, rožnjače i cilijarnog tela (138).

U našem istraživanju, K1 grupa tretirana fiziološkim rastvorom, bila je kontrolna grupa jedinki. Polovina životinja je u tkivu jetre imala umereno izraženu nuklearnu ekspresiju FXR, što je u skladu sa pomenutom studijom Higashiyama i saradnika. Njihovi rezultati govore da je preko 75% hepatocita pokazivalo bojenje na FXR umerenog intenziteta. U

našem istraživanju ekspresija FXR je ocenjivana preko zbira ocena za intenzitet bojenja i za broj FXR⁺ ćelija. Ako pogledamo pojedinačno te parametre, vidimo da naši rezultati ne odstupaju u većoj meri od njihovih. Kod svih jedinki je više od 75% hepatocita bilo FXR⁺, pokazujući uglavnom umeren intenzitet bojenja. Ono u čemu se naši rezultati ne poklapaju sa Higashiyama i saradnicima, jeste nuklearna ekspresija FXR u endotelnim ćelijama, koja kod nas nije ustanovljena. U grupi K2 jedinice su primale propilen glikol, kako bi se otklonila sumnja da su efekti u EE grupi nastali usled delovanja propilen glikola a ne etinilestradiola, koji je u njemu rastvaran. Praćeni metabolički parametri, pokazatelji jetrene funkcije i histološka građa jetre u K2 grupi nisu odstupali od kontrolne, K1 grupe, a tako je i u slučaju ekspresije FXR.

Primarna žučna kiselina CDCA je najjači ligand FXR, dok su to u nešto manjoj meri druge prirodne hidrofobne žučne kiseline: DCA, LCA, CA. Ova okolnost je izuzetno važna, s obzirom na porast koncentracije ovih ŽK u holestazi. U takvim okolnostima dolazi do aktivacije FXR i njegovog negativnog uticaja na sintezu novih ŽK. Naime, aktivacija FXR suprimira funkciju glavnih enzima sinteze ŽK, Cyp7a1, aktivacijom nuklearnog represora (*small heterodimer partner*, SHP). Posredstvom SHP, FXR ostvaruje i dodatni antiholestatski efekat: redukcijom preuzimanja ŽK od strane hepatocita na bazolateralnoj membrani (supresija NTCP). ŽK koje su ligandi FXR istovremeno stimulišu ekspresiju BSEP i Mdr2 na kanalikularnoj membrani, a FXR potencira alternativne ekskretorne transportere na bazolateralnoj membrani (226). Ovaj efekat FXR na transportere povećava protok tj sekreciju svih sastojaka žuči, i pojačano izlučivanje iz organizma bilo putem žuči, bilo putem urina. Uticaj FXR je izuzetno koristan u uslovima kada je holestaza izazvana upravo poremećajem funkcije transportera, kao što je to slučaj u EE-indukovanom modelu intrahepatične holestaze, holestazi tokom trudnoće ili primene lekova, i u nekim genetskim oboljenjima. Nasuprot tome, kada je holestaza ekstrahepatična, odnosno kada je uzrok opstrukcija bilijarnog stable, ovakav uticaj FXR je poguban (182). U našem istraživanju, imunohistohemijskom metodom, dokazana je pretežno jaka ekspresija FXR. Do jače ekspresije u odnosu na kontrolnu grupu, došlo je ne toliko zbog promene u broju hepatocita koji ekspimiraju FXR, već usled intenzivnijeg bojenja u jedru hepatocita, odnosno verovatno veće količine FXR proteina detektovanog ovom metodom.

Kao što je ranije diskutovano, UDK i verovatno MK, imaju sposobnost redukcije količine hidrofobnih ŽK u hepatocitu i enterohepatičnoj cirkulaciji, čime olakšavaju holestazu. Hidrofilna UDK ne može direktno da aktivira ili suprimira aktivnost FXR (44, 225). Čak ni derivat UDK, *nor*-UDCA, ne pokazuje afinitet za FXR (65, 178). S obzirom na hidrofilnost 12-MK, aktivacija FXR ovom ŽK verovatno nije moguća. Redukcijom sadržaja hidrofobnih ŽK, UDK redukuje ligande FXR, tj indirektno umanjuju njegovu aktivnost. Ovo stanovište podržavaju rezultati našeg ispitivanja, gde je primenom ove dve ŽK došlo do značajno manje tj slabije ekspresije FXR. Stiče se utisak da je ovaj efekat ostvaren na račun promene FXR%, gde su uočene značajne razlike u odnosu na EE.

S obzirom na povoljan uticaj aktivacije FXR, smatralo se da aktivacija FXR polusintetskim i sintetskim ligandima može biti optimalan vid lečenja holestatskih poremećaja. Drugi razlog zbog kojeg se potencira sinteza sintetskih liganda jeste i to što prirodne ŽK kao ligandi FXR imaju relativno nizak afinitet za FXR, a i *in vivo* podležu razgradnji ili modifikaciji. Sve ovo ukazuje da ovi prirodni ligandi nisu idealni za primenu u ogleđima, kliničkim studijama i terapiji pacijenata. Nesteroidni ligandi FXR, GW4064 i fexaramin su višestruko potentniji aktivatori FXR u odnosu na CDCA (227). GW4064 je pokazao hepatoprotektivno dejstvo ne samo u intrahepatičnoj već i ekstrahepatičnoj holestazi (228). Aktivacija FXR polusintetskim ligandom (*6-ethyl chenodeoxycholic acid*, 6-ECDCa), derivatom CDCA, kod pacova sa EE-indukovanom holestazom, normalizovala je protok žuči i serumske markere holestaze, i suprimirala je Cyp7a1 (229). Pomenuti derivat ŽK, nazvan još i obetiholna kiselina (*obeticholic acid*, OCA) kao i sintetski ligand PX-102, nalaze se u fazama II i III kliničkog ispitivanja. Primenjena uz UDK kod pacijenata obolelih od primarne bilijarne ciroze koji su slabo odgovarali na terapiju, OCA je dovela do snižavanja aktivnosti ALT i γ -GT (178). OCA se pokazala efikasnom i u redukciji portalne hipertenzije i fibroze (177). U FLINT studiji (*Farnesoid X Receptor Ligand Obetocholic Acid in Nonalcoholic Steatohepatitis Treatment*), primena OCA je dovela do značajnog poboljšanja histološke slike, ali zbog porasta LDL-holesterola, potrebne su dugotrajnije studije da bi se utvrdila primenjivost OCA u terapiji ovog oboljenja (177). Veliki nedostatak primene OCA u nekim kliničkim ispitivanjima bio je pruritus koji perzistira ili se čak pojačava sa primenom OCA (25-50mg), i mogao bi biti posledica OCA, a ne holestaze (178).

Tokom godina je zapaženo da se metabolizam žučnih kiselina menja u dijabetesu tipa 2, a da korekcija sastava ŽK može da ima uticaja na regulaciju glikemije (44, 230). Takođe, primena aloksana utiče na sekreciju i sastav ŽK u jetri. Efekat aloksana na transport i sekreciju ŽK kao i sastav žuči ispitivali su Icarte i saradnici (231). Prema njihovim rezultatima, 3 dana nakon primene aloksana, značajno je manje izlučivanje kao i ukupna količina ŽK i ŽS, da bi nakon 6 dana bez supstitucije insulinom, došlo do normalizacije sinteze i izlučivanja ŽK i ŽS. Nakon 14 i 24 dana od primene aloksana, izlučivanje ŽK je značajno poraslo. Kako nakon primene aloksana nastaje model dijabetesa tipa 1, kod takvih jedinki je bila prisutna hiperglikemija i hipoinsulinemija. To bi značilo da hiperglikemija dovodi inicijalno do pada sinteze ŽK, a potom do normalizacije i čak stimulacije sinteze ŽK u aloksanskom dijabetesu dužem od dve nedelje. Kako su tkiva ogleđnih životinja u našem istraživanju uzorkovana 7.dana od primene aloksana, u svetlu njihovih rezultata, vrlo je verovatno da je nivo sinteze ŽK bio na uobičajenom nivou, kao kod zdravih jedinki. Ukoliko je sinteza ŽK još uvek bila snižena u vreme žrtvovanja, to bi mogao biti uzrok vrlo niskog stepena ekspresije FXR u A grupi. Treba naglasiti da se Icarte i saradnici nisu izjasnili o tačnom sastavu ŽK u toku trajanja aloksanskog dijabetesa, što može biti od presudne važnosti za aktivaciju FXR.

Iako brojna istraživanja sugerišu da FXR ima ulogu u metabolizmu glukoze, ovaj efekat je promenljiv i varira u zavisnosti od metoda istraživanja, modela dijabetesa ili nutritivnog statusa, genetske modifikacije životinja ili kultura, kao i saradnje FXR i drugih nuklearnih receptora (225). Naši rezultati ekspresije FXR kod jedinki tretiranih jednokratnom dozom aloksana, u saglasnosti su sa navodima Fiorucci i saradnika, da glukoza dovodi do smanjene ekspresije FXR u jetri, a da gubitak funkcije FXR kod odgovarajućih sojeva miševa, izaziva poremećaj metabolizma u smislu insulinske rezistencije, hiperglikemije, smanjene glukozne tolerancije i narušene funkcije insulina kako u jetri tako i u skeletnim mišićima (225). Duran-Sandoval i saradnici su sprovedli temeljno ispitivanje uloge i promene ekspresije FXR na Zucker soju dijabetičnih miševa, kulturi hepatocita i streptazocin-indukovanom dijabetesu (50). Na pomenutom modelu streptazocin-indukovanog dijabetesa tip 1, uz značajno više vrednosti šećera u krvi i insulinopeniju, u tkivu jetre značajno je smanjena FXR mRNK. Interesantno je da je dodatak insulina ovim jedinkama vratio nivo FXR mRNK na nivo kontrolnih jedinki. Kako bi proverili da li je ovaj pad ekspresije FXR

povezan sa ekspresijom gena čiju transkripciju reguliše FXR, utvrdili su da je ekspresija Cyp7a1 povišena, odnosno da su u hiperglikemiji suprimirani FXR-zavisni efekti. Koliko je značajno na kom se modelu ispituje uloga FXR, sugeriše i podatak da su na kulturi hepatocita poreklom od ne dijabetičnih jedinki, dobili dotovo suprotne rezultate dodatkom glukoze.

U grupi AE, gde je nakon izazivanja aloksanskog dijabetesa, svakodnevno apliciran etinilestradiol, ekspresija FXR je bila izrazito jaka. Potsetimo da je i glikemija u ovoj grupi bila na visokom nivou, bez statistički značajne razlike u odnosu na A grupu. Ovaj podatak o aktivaciji i jačoj ekspresiji FXR uz perzistiranje hiperglikemije deluje kontradiktorno. Neosporno je da je osnovna i najjasnija uloga FXR - regulacija sinteze i preuzimanja i sekrecije ŽK. Sa tog stanovišta, deluje veoma osnovano pretpostavka da izazivanje holestatskog poremećaja kod jedinki sa aloksanskim dijabetesom indukuje pretežno efekte FXR vezane za metabolizam ŽK. Za razjašnjavanje uloge FXR u ovakvom eksperimentalnom modelu, potrebne su detaljnije, uže usmerene i verovatno dugotrajnije studije.

Primena UDK i MK, značajno je redukovala ekspresiju FXR, na nivo sličan kontrolnim grupama. Jedinke ovih grupa su pokazale značajno poboljšanje transaminaza, bilirubina i γ -GT, što ide u prilog redukovanja citotoksičnih ŽK, te i indirektno smanjene količine liganda za FXR aktivaciju. Uz normalizaciju parametara jetrene funkcije, kod ovih grupa je i glikemija redukovana, i to kod AE-UDK grupe, na normoglikemične vrednosti. U ovim grupama za razliku od AE, ima jedinki i sa jakom i sa umerenom ekspresijom FXR. Ovo ne potvrđuje, ali i ne isključuje da su navedeni povoljni efekti rezultat kombinacije UDK tj MK i aktivacije FXR. Kombinacija FXR-liganda i UDK smatra se atraktivnom za terapiju nekoliko poremećaja, uključujući holestazne i inflamatorne bolesti hepatobilijarnog sistema. UDK ne utiče na aktivnost Cyp7a1, tj ne suprimira sintezu novih ŽK u holestazi, te bi polusintetski i sintetski ligandi FXR imali komplementarnu ulogu u lečenju holestaze, pogotovo jer su potentniji od prirodnih liganda (64). U modelu aloksanskog dijabetesa, smatra se da su β -ćelije pankreasa podlegle nekrozi (134). U tom svetlu, deluje da je od manjeg značaja podatak do koga su došli Renga i Popescu sa saradnicima, odnosno da β -ćelije pankreasa ekspimiraju FXR, i da aktivacija FXR sintetskim ligandima reguliše transkripciju insulina i deluje citoprotektivno na insulocite (172, 173).

U skorije vreme kao veza između metabolizma glukoze i lipida, insulina i žučnih kiselina, navodi se transkripcioni faktor FOXO1 (*forkhead box protein O1*). U aloksanskom dijabetesu dolazi do promene aktivnosti FOXO1, što uslovljava promenu sastava ŽK. I u ovom animalnom modelu i kod ljudi obolelih od dijabetesa, najveći FOXO1-zavisni efekti uočavaju se u nivou 12 α -hidroksi ŽK u jetri. Rezultati humanih i animalnih istraživanja, i značaj ovog efekta u njima, ne mogu se poistovetiti. Kod ljudi (za razliku od glodara), najzastupljenija 12 α -hidroksi ŽK je CDCA aktivator FXR. Tako da FOXO1 indukcija enzima Cyp8b1 promovise stvaranje CA na račun CDCA, što dovodi do relativne redukcije FXR aktivacije, jer je CA i konjugati CA, slabiji ligand FXR. Aktivacija FOXO1/Cyp8b1/12 α -hidroksi ŽK puta u dijabetesu rezultira smanjenom aktivnošću FXR i porastom TG. S druge strane, kod glodara CDCA se metaboliše do hidrofilne MCA koja ne aktivira FXR. Svakako njihovi rezultati ukazuju da je modifikacija sadržaja ŽK mogući vid terapije u dijabetesu, i uticaj 12-monoketoholne kiseline dijabetesu zahteva dalja ispitivanja (232, 233).

5.8. Uticaj ursodeoksiholne i monoketoholne kiseline na lipidnu peroksidaciju i antioksidativne enzime hepatocita

Uzrok toksičnosti kiseonika je bio nepoznat do 1954. kada je objavljena teorija o toksičnosti delimično redukovanih oblika kiseonika. Sa otkrićem enzima superoksid-dismutaze (SOD) 1969. godine počela je druga era istraživanja u oblasti slobodnih radikala u biološkim sistemima, što je i danas aktuelno polje istraživanja (97).

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) i reaktivne azotne vrste (*reactive nitrogen species* – RNS) nastaju i kada funkcionisanje ćelije nije narušeno. To su molekuli sa jednim ili više nesparenih elektrona u orbiti što ih čini veoma reaktivnim prema drugim molekulima. U niskim koncentracijama imaju povoljno i poželjno delovanje u organizmu (odbrana od mikrobioloških patogena, signalni molekuli, indukcija ćelijske replikacije i drugo) (97). Štetni efekti ROS, odnosno stanje oksidativnog stresa nastaje kada dođe do disbalansa u produkciji ROS i mogućnosti antioksidativne odbrane organizma da ih neutrališe (99). Superoksid anjon radikal (O_2^-) se smatra „primarnim“ reaktivnim oblikom kiseonika. Nastaje pretežno u mitohondrijama u transportnom lancu elektrona (kompleksima I i III). Iako sam nije toliko reaktivan, u daljim direktnim ili posredovanim reakcijama biva preveden u mnogo reaktivnije, „sekundarne“ ROS. Superoksid uplitanjem u metabolizam gvožđa stvara dovoljnu količinu slobodnog Fe^{2+} i Fe^{3+} za odigravanje Fentonove i Haber-Weis reakcije u kojima između ostalog nastaje vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksi radikal (OH^-). Vodonik peroksid stvara se i u peroksizomima usled brojnih procesa u kojima se koristi kiseonik. U fiziološkim uslovima, enzim katalaza je prisutan u matriksu peroksizoma i neutrališe H_2O_2 , ali u patološkim uslovima produkcija H_2O_2 prevladava i on se oslobađa u citosol. Hidroksi radikal je izuzetno reaktivna vrsta. Kako ima kratak poluživot, reaguje brzo sa bliskim molekulima. Reakcije pokrenute hidroksi radikalom uz učešće drugih reaktivnih kiseoničnih vrsta dovode do poremećaja funkcije enzima i drugih proteina, poremećaja sinteze DNK i RNK i lipidne peroksidacije (134).

5.6.1. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je proces oštećenja ćelijskog membranskog sistema, tokom kog dolazi do gubitka fluidnosti, opadanja membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti za H^+ i druge jone, pa je moguća i ruptura ćelije. Hidroksi i perhidroksi radikal (HOO^\cdot) važni su za fazu inicijacije lipidne peroksidacije. U reakciji sa polinezasićenim masnim kiselinama stvaraju slobodne lipidne radikale. U fazi propagacije i daljim reakcijama sa kiseonikom stvaraju se peroksi radikali LOO^\cdot i lipidni peroksidi (LOOH). Tokom propagacije, gvožđe može reagovati sa LOOH, dajući lipidne alkoksi radikale (LO^\cdot) koji dalje učestvuju u širenju lipidne peroksidacije. Učešće gvožđa u lipidnoj peroksidaciji praćeno je nastankom reaktivnih jedinjenja koja u reakciji sa tiobarbituratnom kiselinom grade obojene komplekse. Jedno od tih jedinjenja je i malonilaldehid. U fazi terminacije lipidne peroksidacije, disocijacijom LOOH dolazi do nakupljanja konačnih produkata peroksidacije i aktivnih radikala (100).

Uobičajeno je da se oksidativni stres i oštećenje usled OS, procenjuje ili merenjem antioksidativnih supstanci ili produkata nastalih pod dejstvom radikalnih kiseoničnih vrsta (235). Malonilaldehid je glavni i najviše proučavani produkt peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, i u brojnim istraživanjima koristi se kao pokazatelj procesa lipidne peroksidacije i mera njenog intenziteta (97, 236, 237). U našem istraživanju, analiziranjem stvorenog MDA, procenjivali smo da li je došlo do nakupljanja toksičnih ŽK u hepatocitima jedinki sa EE-indukovanom holestazom, koje bi dovele do generacije ROS i OS sa posledičnim oštećenjem membrana ćelije i organela. Hidrofobne ŽK doprinose nastanku OS remećenjem transporta elektrona u mitohondrijama, povećanjem propustljivosti membrane mitohondrija, što kod težih poremećaja funkcije hepatocita odnosno pri visokim koncentracijama hepatotoksičnih ŽK može biti okidač za smrt ćelije (102). Povećano stvaranje ROS je jedan od ranih procesa koji se odigravaju u hepatocitima tokom holestaze, pa ne iznenađuje podatak da je u većini ispitivanja na životinjskim modelima i u kulturama hepatocita, već nakon nekoliko dana ustanovljen porast MDA (30, 70, 100, 235, 238, 239, 240). Podaci dobijeni u našem istraživanju su u skladu sa navedenim istraživanjima. Značajno povećanje vrednosti MDA u homogenatu jetre životinja tretiranih samo

etinilestradiolom, ukazuju na otpočinjanje procesa lipidne peroksidacije, indukovane žučnim kiselinama.

U grupama gde su jedinke primale preparat ursodeoksiholne kiseline došlo je do pada vrednosti MDA, u toj meri da se koncentracija MDA u E-UDK grupi ne razlikuje statistički od kontrolne grupe. Smanjena koncentracija MDA, sugeriše smanjeni intenzitet lipidne peroksidacije, a kako nema razlika u poređenju sa kontrolnom grupom, verovatno je da je došlo do značajne supresije lipidne peroksidacije. Ovakav uticaj UDK je u saglasnosti sa stavovima i rezultatima drugih autora. Najveći broj studija ispitivao je redukciju MDA u jetri (64, 65, 70), ali je ovakav udicaj UDK dokazan i u drugim tkivima (236, 241). Postoje dokazi za nekoliko mehanizama UDK-posredovane hepatoprotekcije od OS u holestazi. Pre svega, to je modifikacija sastava ŽK u toku holestaze. Već je objašnjeno delovanje UDK na povećanje kanalikularne sekrecije toksičnih ŽK, indukcijom transportera (66). Za naše istraživanje, zanimljivo je antioksidativno svojstvo UDK, odnosno mogućnost da spreči ili bar umanja produkciju ROS i nastanak OS ili pak, da modifikuje aktivnost enzima antioksidativne zaštite. U prilog tome govori podatak da je *in vitro* dokazano da UDK štiti od oštećenja vodonik peroksidom (64), a ovo dejstvo UDK je potvrđeno i u *in vivo* ispitivanjima (207). Antioksidativno delovanje UDK ogleda se i u prevenciji nastanka mitohondrijalnih pora koje otvaraju put za smrt ćelije. Serviddio i saradnici su dokazali da je bez primene UDK produkcija H₂O₂ u mitohondrijama hepatocita na BDL-modelu holestaze dva puta veća nakon 21 dana, a 3,5 puta veća nakon 28 dana. Primenom UDK, 21.dana je produkcija H₂O₂ bila na nivou kontrolne grupe, a nakon 28 dana statistički značajno niža od netretiranih jedinki. Iz njihovog ogleda jasno se može zaključiti da je antioksidativna uloga UDK značajna. Takođe, da se naslutiti da iako je stvaranje ROS u holestazi rani događaj, ono u početku nije tako intenzivno, i da se produkcija ROS značajno povećava sa trajanjem holestaze (207). S obzirom da je naša studija trajala 5 dana, ovo bi moglo objasniti relativno oskudan histološki nalaz i izostanak apoptoze u tkivu jetre. Takođe, iako povišene, vrednosti transaminaza i γ-GT u našem istraživanju nisu bile višestruko veće od kontrolnih vrednosti, za razliku od drugih studija, što takođe govori u prilog blagog do umerenog porasta produkcije ROS. I drugi istraživači smatraju da UDK i sama poseduje mogućnost da neutrališe reaktivne kiseonične vrste, kao i da pojačava aktivnost antioksidativnih enzima, o čemu će biti diskutovano u narednom poglavlju (65, 183).

Primena monoketoholne kiseline uz etinilestradiol dovela je do značajnog pada koncentracije MDA, tako da nema razlika u odnosu na kontrolu. Posmatrajući nivo MDA u grupama E-UDK i E-MK, razlika nije statistički značajna. Poznato je da mnoge fizičko-hemijske osobine zavise od strukture molekula ŽK kao i broja, položaja i orijentacije - OH grupa. Formiranje micela i vrednost kritične micelarne koncentracije (*critical micellar concentration* - CMC) svake prirodne i sintetske ŽK je važno za razumevanje njihovog delovanja u biološkim sistemima i uticaja na membranski sistem ćelije (84, 85). U različitim istraživanjima došlo se do različitih vrednosti za CMC 12-keto derivata holne kiseline (Poša i saradnici- 62.5mM (85) odnosno 48mM (83); Yang i saradnici- 13.5mM, Chen i saradnici- 9.94mM (84)). Ipak, svi autori su dobili vrednosti koje su značajno više od CMC vrednosti holne, deoksiholne i tauriholne kiseline. Diketo- i triketo derivati holne kiseline imali su još više CMC. Porast CMC sa porastom broja keto grupa, može se objasniti otežanim formiranjem micela. Prisustvo keto grupa smanjuje hidrofobnu površinu molekula ŽK preko koje se ostvaruje povezivanje u micelle. Što je veći broj keto grupa, manja je hidrofobna površina, teže povezivanje i usled toga raste CMC (85). U submicelarnim koncentracijama monomeri ŽK se umeću u fosfolipidni dvosloj u manjoj meri remeteći strukturu i povećavaju propustljivost. Pri višim koncentracijama, dolazi do gubitka integriteta membrane zbog stvaranja mešovityh micela sastavljenih od žučnih soli i komponenti ćelijske membrane (84). Činjenica je da su nekonjugovani oblici prirodnih ŽK i oni sa manje hidroksilnih grupa izrazito hidrofobni i toksični. Već je pomenut poredak prirodnih ŽK u pogledu hidrofobnosti (UDK < CA < CDCA < DCA < LCA) (102). Studijom Yang i saradnika dokazano je da je hidrofobnost prirodnih kiselina (CA, DCA i TCA) i mogućnosti insercije u biološke membrane (*in vitro* model, *DPPC monolayer*), u skladu sa ovim pravilom. Međutim, osobine nekonjugovane, dihidroksilne sintetske 12-monoketoholne kiseline odstupaju od njega. Naime, 12-MK je pokazala znatno manji stepen hidrofobnosti i najmanji afinitet za inserciju u membrane. Po njihovom mišljenju, to sugeriše da je keto grupa na poziciji 12, znatno uticala na svojstva 12-MK. Uticaj ovih kiselina na membrane humanih ćelija ispitivali su izazivanjem hemolize eritrocita. Hidrofobna prirodna kiselina DC je u najmanjim koncentracijama izazivala hemolizu eritrocita, a zatim C i TC. 12-MK nije izazvala hemolizu u primenjenim koncentracijama (1-10mM), tj poredak hemolitičkog delovanja ove 4 ŽK korelira sa mogućnošću penetracije DPPC modela. Može se zaključiti da je 12-MK pokazala

drugačija fizičko-hemijska svojstva od prirodnih ŽK. S obzirom da nije pokazala jako solubilizirajuće dejstvo na membrane, već je u manjoj meri modifikovala mehanička svojstva membrane eritrocita i DPPC monosloja, smatra se manje toksičnom od prirodnih ŽK (84). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima navedenih studija, s obzirom da je aplikacija 12-MK značajno redukovala produkte lipidne peroksidacije.

U grupi A, jednokratna primena aloksana je dovela do porasta MDA, bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. Porast MDA ne iznenađuje jer je poznato da hiperglikemija dovodi do porasta produkcije ROS i RNS. Pored pojačanog stvaranja ROS putem oksidativne fosforilacije, NAD(P)H oksidaze, lipooksigenaze, i citohrom p450 monooksigenaze, za dijabetes je specifičan i proces autooksidacije glukoze. Dokazano je da *in vitro* glukoza u prisustvu jona gvožđa i bakra reaguje sa H₂O₂ pri čemu nastaje hidroksi radikal (97). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača koji su utvrdili pojačanu produkciju MDA usled oksidativnog oštećenja u dijabetesu, kao i u drugim metaboličkim oboljenjima (105, 162, 167, 242, 243, 244). Studija Altomare i saradnika ukazala je da postoje značajne razlike u koncentraciji MDA kod pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 sa dobrom odnosno lošom glukoregulacijom. Šta više, oni su ustanovili da postoji pozitivna korelacija vrednosti MDA u plazmi i ŠUK, što je potvrđeno i našim rezultatima (245). Treba napomenuti da osim MDA koji je praćen u našem istraživanju, postoje i drugi pokazatelji oksidativnog oštećenja u dijabetesu, poput GSH/GSSG odnosa, izoprostana i završnih produkata glikozilacije (*advanced glycation end products* - AGE. AGE produkti su nestabilni i reaktivni, a pre svega utiču na funkciju strukturnih proteina ćelije poput kolagena. Iako se nalaze u svim tkivima dijabetičnih pacova, jetra, bubreg i eritrociti su podložniji formiranju AGE (97).

Sa svakodnevnom primenom EE kod jedinki sa aloksanskim dijabetesom, vrednosti MDA su porasle do nivoa koji pokazuje statističku značajnost u odnosu na kontrolnu grupu i jedinke grupe A. Ovakav rezultat sugerise veći intenzitet oksidativnog stresa primenom obe supstance, u odnosu na pojedinačnu primenu. Moglo bi se očekivati da bi i oštećenje usled oksidativnog stresa bilo veće kod pacijenata obolelih od dijabetesa sa poremećajem jetrene funkcije. Već smo pomenuli studiju Altomare i saradnika, gde je loša regulacija dijabetesa dovela do viših vrednosti MDA. Na to se nadovezuje i istraživanje Likidilid i saradnika, koji su ustanovili porast MDA od najnižih vrednosti kod dobro kontrolisanog T2DM, preko loše kontrolisanog T2DM do T2DM sa komplikacijama (246).

Primena ursodeoksiholne kiseline kod jedinki na ALX+EE tretmanu, dovela je do značajnog pada koncentracije MDA, u odnosu na AE grupu, ali nedovoljno da koncentraciju snizi na nivo kontrolne grupe. Većina autora je u svojim istraživanjima došla do sličnih rezultata koji ukazuju na UDK-posredovanu protekciju od oksidativnog oštećenja u dijabetesu (167, 242, 243). Lukivskaya i saradnici su počevši od petog dana nakon jednokratne doze aloksana, tokom narednih 30 dana aplikovali UDK (40mg/kg TM). Bez obzira na dugotrajan tretman, utvrdili su da UDK nije snizila koncentraciju MDA u jetri jedinki sa aloksanskim dijabetesom. Ipak, u mitohondrijama hepatocita je povoljno uticala na parametre oksidativne fosforilacije i aktivnost enzima respiratornog lanca, te smatraju da svoje antioksidativno dejstvo ostvaruje sprečavanjem disfunkcije mitohondrija (163), dok Mahmoud i saradnici tome pridodaju i antiinflamatorno dejstvo i redukciju AGE (167).

3 α ,7 α -dihidroksi-12-keto-5 β -holanska kiselina (12-MK) primenjena u grupi AE-MK kod jedinki na ALX+EE tretmanu, dovela je do pada koncentracije MDA, ali u znatno manjoj meri nego UDK. Koncentracija MDA je i dalje bila značajno viša od kontrolne grupe jedinki. Smanjeni intenzitet lipidne peroksidacije može se objasniti hipoglikemijskim i antiholestatskim delovanjem 12-MK koje je dokazano i u našem istraživanju. Regulacija glikemije i toksičnih ŽK, smanjila je produkciju ROS i redukovala intenzitet lipidne peroksidacije. Rašković i saradnici su na modelu streptozocin-indukovanog dijabetesa dokazali da primena soli 12-MK dovodi do najvećeg pada glikemije između 4. i 7. dana (90), što je u skladu sa našim nalazom petog dana primene MK. Kao slabo hidrofobna ŽK sa relativno većom CMC u odnosu na prirodne ŽK, 12-MK ima veoma slabo do nikakvo toksično dejstvo na ćelijske membrane, što je dokazano u istraživanjima Chen i saradnika i Yang i saradnika (84, 94).

5.6.2. Antioksidativni enzimi

Jetra je velik, kompleksan organ koji je savršeno dizajniran za centralnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti. Jetra ima bitnu ulogu u metabolizmu i detoksikaciji raznih ksenobiotika koji mogu dovesti do oštećenja organizma, pa i nje same (247). Oštećenje jetre često počinje sa oksidativnim stresom, a to je ujedno i tačka kada se može sprečiti dalja progresija njenog oštećenja. S obzirom na to da je u jetri najintenzivniji

metabolizam koji uključuje reakcije u prisustvu kiseonika, logično je da je ona vrlo podložna oštećenju izazvanom slobodnim radikalima (101). Izloženost jetre i čitavog organizma reaktivnim vrstama kiseonika, dovela je do razvoja niza odbrambenih mehanizama (preventivni mehanizmi, mehanizmi otklanjanja oštećenja, fizička odbrana i antioksidativna odbrana). Antioksidativna odbrana može biti enzimaska i neenzimska, o čemu je ranije pisano (97).

Porast koncentracije toksičnih ŽK u holestazi dovodi do produkcije ROS, i promene antioksidativne odbrane ćelije i organizma (102). U našem ispitivanju, kod jedinki sa EE-indukovanom holestazom, pored početka lipidne peroksidacije, dokazane su i promene u aktivnosti antioksidativnih enzima. Ovi podaci zajedno ukazuju na to da je došlo do promene oksidativne homeostaze jetrenih ćelija, što je u skladu sa nalazom drugih istraživača (30, 214, 241, 115). Antherieu i saradnici su čak dokazali da se povećano stvaranje ROS može dokazati i pre tipičnog oštećenja transportnih proteina na kanalikularnoj membrani u modelu intrahepatične holestaze (115).

Porast aktivnosti enzima CAT i GSH-Px kod jedinki sa holestazom je evidentan, ali nije značajan u odnosu na kontrolnu grupu. Ova dva enzima imaju isti supstrat, vodonik peroksid. Katalaza štiti ćelije od H_2O_2 stvorenog u samim ćelijama, neutrališući ga pre nego napusti ćeliju, i ima važnu ulogu u adaptaciji ćelije na oksidativni stres (248). Aktivnost GSH-Px determinišu a) rapoloživost selena za sintezu enzima, b) odgovarajuća količina GSH i c) aktivnost glutation reduktaze. GSH se u većoj količini nalazi u citosolu, mitohondrijama i jedru, i glavni je solubilni antioksidans u ovim kompartmanima. Smatra se najznačajnijim tioldisulfidnim redoks puferom u ćeliji, a zajedno sa GSH-Px, GSH-R, GSH-ST i NADPH čini antioksidativni sistem glutationa. S obzirom da CAT i GSH-Px razgrađuju isti supstrat, koji enzim će imati dominantno dejstvo zavisi od količine H_2O_2 i količine GSH. Pri niskim koncentracijama H_2O_2 i pri dovoljnoj količini GSH, peroksidaza ima ključnu ulogu (97, 100, 236). Iako GSH-Px ima veći afinitet za H_2O_2 , u nedostatku GSH čak i pri nižim koncentracijama H_2O_2 , CAT može imati vodeću ulogu (97, 100). Kako je u našem istraživanju došlo do blagog porasta aktivnosti oba enzima, može se pretpostaviti da je i produkcija ROS bila manjeg intenziteta. S druge strane, razlog za slabiju aktivnost GSH-Px može biti i smanjena količina GSH u ćeliji, ili njegovo veće korišćenje od strane drugih

enzima. Postoje istraživanja koja su dokazala pad koncentracije GSH i porast oksidovanog oblika glutationa u hepatocitima tokom oksidativnog oštećenja (207, 237).

Redukovani GSH neophodan za aktivnost enzima, a osim u enzimskim reakcijama, troši se (tj prelazi u oksidisani oblik) i direktnom neutralizacijom ROS i tokom regeneracije ne enzimskih antioksidanasa (npr vitamina C i E), i kao takav nema mogućnost antioksidativne zaštite (97). Enzim GSH-R je u prisustvu NADPH odgovoran za redukciju oksidovanog GSSG u redukovani GSH. Porast aktivnosti ovog enzima u jetri jedinki sa holestazom, na nivo značajno viši od kontrolne grupe, predstavlja indirektnu potvrdu smanjene količine GSH u hepatocitima. Glutation-S-transferaza (GSH-ST) je još jedan od enzima koji za pravilnu aktivnost zahteva redukovani glutation. Katališe konjugaciju GSH sa različitim supstratima, između ostalog i sa produktima oksidativnih oštećenja organizma i uklanja nastale toksične proizvode (100, 248). Jedan od najjačih induktora GSH-ST su upravo ROS, što je u skladu sa našim rezultatima gde je značajno veća aktivnost GSH-ST zabeležena upravo u grupi tretiranoj samo etinilestradiolom. S obzirom na ovakav odgovor GSH-ST, može se pretpostaviti da je veća količina redukovanog glutationa bila uključena u aktivnost ovog enzima, na račun GSH-Px.

Literaturni podaci o promeni aktivnosti antioksidativnih enzima u holestazi variraju. Određeni broj publikacija beleži značajno smanjene aktivnosti CAT i GSH-Px u holestazi (70, 235, 239, 240). Wang i saradnici su utvrdili da nema statističke značajnosti u promeni antioksidativnih enzima, što je u saglasnosti i sa delom naših rezultata (249). Porast aktivnosti enzima i mRNK enzima kao odgovor na oksidativni stres je takođe zabeležen u istraživanjima (100, 116, 250). Veruje se da manja produkcija slobodnih radikala aktivira zaštitne mehanizme organizma, između ostalog povećanom ekspresijom gena i/ili ushodnom regulacijom datih enzima. U skladu sa tim je i nalaz Nomoto i saradnika da se u holestazi povećava translacija mRNK koja kodira enzime oksidativne zaštite, što se može smatrati adaptacijom ćelije na oksidativni stres (116). Važno je napomenuti da usled razlika u poreklu ispitivanog materijala (animalni, humani), eksperimentalnom modelu (*in vivo*, *in vitro*, pretretman, doze, supstance, vreme određivanja aktivnosti enzima), starosti životinja i drugim parametrima studija, treba biti oprezan kod poređenja očekivanih i dobijenih rezultata.

Primena UDK snizila je aktivnost CAT i GSH-Px značajno u odnosu na jedinke tretirane sa EE, ali i u odnosu na kontrolnu grupu, što sugeriše snažno antioksidativno dejstvo. Pad

aktivnosti enzima verovatna je posledica manje produkcije supstrata za ove enzime (H_2O_2). Podršku za ovakvu pretpostavku pružaju rezultati studije Serviddio i saradnika, koji su nakon primene UDK dokazali smanjenu produkciju H_2O_2 u mitohondrijama. Do 21.dana nakon podvezivanja žučnih puteva, UDK je u potpunosti neutralisala produkciju H_2O_2 , koja je kod ne tretiranih jedinki bila dva puta veća nego u mitohondrijama kontrolnih životinja (207). Do istog rezultata došli su i Guarino i saradnici. Njihovo istraživanje baziralo se na ispitivanju uticaja UDK na kontraktilnost, lipidnu peroksidaciju, produkciju H_2O_2 i aktivnost CAT u mišićnim ćelijama žučne kese pacijenata sa akutnom holestazom i holesterolskim kalkulusima. UDK je značajno smanjila intenzitet lipidne peroksidacije (ocenjivan putem koncentracije MDA). Takođe, snizila je produkciju H_2O_2 , aktivnost CAT i markere inflamacije (241). Osim redukcije stvaranja kiseoničnih radikala, Saad i saradnici su dokazali da primena UDK redukuje stvaranje i reaktivnih azotnih vrsta (149).

Primena 12-monoketoholne kiseline kod jedinki na EE tretmanu, dovela je do statistički gledano, identičnih promena u aktivnosti enzima kao i UDK. Aktivnost je smanjena u odnosu na EE i K1 grupu, što govori u prilog jakog antioksidativnog delovanja. Nedovoljno je poznato da li i 12-MK utiče na redukciju H_2O_2 kao što je slučaj sa UDK, ili direktno utiče na aktivnost,transkripciju i/ili translaciju enzima.

Aktivnost glutation reduktaze značajno je opala nakon primene UDK kod jedinki sa holestazom, i ne pokazuje značajne razlike u poređenju sa aktivnosti GSH-R kod jedinki kontrolne grupe. Pad aktivnosti GSH-R, može biti posledica uplitanja UDK u sintezu redukovanog glutationa. Naime, holestaza dovodi do redukcije mRNK koja kodira enzime za sintezu GSH (γ -glutamilstein sintetaze- γ GCS, i γ -cistationaze). *In vivo* primena UDK dovela je do veće sinteze GSH, ali je utvrđeno da je uloga UDK u indukciji sinteze GSH limitirana. Ustanovljeno je da UDK sprečava redukciju mRNK γ -GCS, ali ne utiče na γ -cistationazu (207). U *in vitro* istraživanjima na kulturi hepatocita došlo se do sličnih podataka. Hepatocitima u kulturi je dodavan H_2O_2 , što je dovelo do oksidativnog stresa, oštećenja ćelija i smanjene vitalnosti. Prepretman sa UDK je sprečio redukciju vitalnosti hepatocita, povećana je sinteza GSH indukcijom mRNK γ -GCS. U ovoj studiji nije uočena promena aktivnosti antioksidativnih enzima, ali treba uzeti u obzir da je UDK data kao pretretman oksidativnom oštećenju, što je omogućilo ćelijama da stvore određen višak neenzimskih antioksidanasa poput GSH, koji bi kupirali inicijalni porast ROS (102, 251).

Monoketoholna kiselina primenjena kod pacova uz EE, nije dovela do značajne promene aktivnosti enzima GSH-R. Izostanak pada aktivnosti glutation reduktaze sugerise da je u ćelijama još uvek povećana potreba za GSH, odnosno da MK nije u mogućnosti da indukuje enzime uključene u sintezu GSH. Eksperimentalni podaci koji bi potkrepili ovakve tvrdnje nedostaju i predstavljaju neophodan pravac daljih istraživanja. Uz primenu UDK i MK aktivnost GSH-ST je niža u poređenju sa EE grupom, i ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu jedinki. Ukoliko se uzme u obzir da GSH-ST učestvuje u eliminaciji produkata oštećenja ćelije, vrlo je verovatno da su UDK i MK redukcijom MDA i drugih produkata lipidne peroksidacije, smanjile količinu supstrata za ovaj enzim.

Dijabetes je hronično oboljenje ljudi i širom sveta predstavlja ozbiljan zdravstveni problem zbog teških komplikacija. Procenjuje se da će broj ljudi obolelih od nekog oblika dijabetesa do 2030.godine iznositi 366 miliona. Regulacija nivoa šećera u krvi je presudno za sprečavanje komplikacija dijabetesa, a uz regulisanje glikemije, važno je i smanjenje oksidativnog oštećenja (97, 102, 252). Oksidativni stres u dijabetesu doprinosi nastanku komplikacija, a autooksidacija glukoze i ne-enzimska glikozilacija proteina su važni izvori ROS u dijabetesu. Oksidativni stres i hiperglikemija smatraju se glavnim uzrocima oštećenja jetre, komplikacije koja nastaje najčešće u insulin-zavisnom dijabetesu (105). Iz navedenog je jasno zašto se konstantno pored postojećih lekova za lečenje dijabetesa, traga za novim terapeutima koji objedinjuju hipoglikemijsko i antioksidativno delovanje (105, 252).

Hipoglikemijsko delovanje UDK i 12-MK je dokazano u našem istraživanju. Takođe, dokazano je da tretman aloksanom i aloksanom uz etinilestradiol dovodi do porasta koncentracije MDA, tj do oksidativnog oštećenja hepatocita. Izazivanje dijabetesa jednokratnom dozom aloksana, nakon 5 dana dovelo je do pada aktivnosti svih antioksidativnih enzima, ali je samo pad aktivnosti GSH-ST bio značajan u poređenju sa kontrolnom grupom. Nasuprot tome, kotretman ALX+EE doveo je do značajne promene aktivnosti svih enzima u odnosu na kontrolnu grupu. Naši rezultati su u skladu sa istraživanjima drugih autora koji su ustanovili pad aktivnosti antioksidativnih enzima kako kod ljudi, tako i na animalnim modelima dijabetesa. Pojedini autori poredili su antioksidativne mehanizme kod pacijenata sa i bez komplikacija dijabetesa, i ustanovili da je veći pad antioksidativne enzimske odbrane povezan sa jačim oksidativnim oštećenjem prisutnim kod pacijenata sa komplikacijama dijabetesa (105, 167, 245, 246, 252, 253, 254).

Ovaj aspekt njihovih istraživanja podržavaju i naši rezultati. Potsetimo na slab uticaj aloksana na aktivnost enzima, kao i da primena EE nije značajno uticala na CAT i GSH-Px. Međutim, aloksanski dijabetes uz holestatsko oštećenje jetre (ALX+EE tretman) doveo je do intenzivnijeg oksidativnog oštećenja i statistički značajne promene aktivnosti svih analiziranih enzima u odnosu na kontrolu i EE tretman. Prema Szaleczky i saradnicima, aktivnost antioksidativnih enzima u dijabetesu može biti i povećana i smanjena. Prisustvo manje količine ROS može dovesti do indukcije ekspresije enzima na transkripcionom nivou, kao vid adaptacije ćelija. Pad aktivnosti antioksidativnih enzima može biti posledica promene dostupnosti mikronutritijenata (Zn, Cu, Se, Fe, Na, K) ili vezivanja glukoze za molekul enzima čime dovodi do strukturnih i funkcionalnih promena enzima (250). Valko i saradnici dovode u pitanje prirodu uticaja dijabetesa na GSH-Px, u zavisnosti od primenjenog modela i ispitivanog tkiva (97).

Ursodeoksiholna kiselina uz ALX+EE tretman, dovela je do značajnog porasta aktivnosti enzima CAT i GSH-Px, što govori u prilog izraženog antioksidativnog delovanja. Do sličnih rezultata došli su i Osorio i saradnici (106, 255). O tačnom mehanizmu delovanja UDK ne možemo govoriti na osnovu naše studije, ali se tu najverovatnije mogu ubrojati redukcija hiperglikemije, redukcija količine hidrofobnih ŽK, smanjena produkcija ROS i povećanje sinteze GSH. Slično, ali malo slabije dejstvo je ispoljila i primena monoketoholne kiseline. Aktivnost oba enzima kod AE-MK grupe je bila značajno viša u odnosu na AE grupu, ali ipak niža u odnosu na AE-UDK. Značajno je ipak, da su obe kiseline dovele aktivnost enzima na nivo kontrolne grupe, tj bez značajnih razlika u poređenju sa K1. Aktivnost GSH-R je značajno snižena u odnosu na AE grupu primenom UDK, ali ne i MK. Aktivnost ovog enzima pojačana je kada nema dovoljno redukovanog oblika glutationa (99). Kako MK nije imala uticaj na GSH-R ni kod jedinki na EE tretmanu ni kod jedinki na ALX+EE tretmanu, može se pretpostaviti da nema uticaja na sintezu GSH, te da je redukcija oksidovanog GSSG putem GSH-R glavni izvor redukovanog GSH. S druge strane, Valko i saradnici navode da hiperglikemija nije uticala na aktivnost GSH-R, te da se čini da GSH-R ne igra ulogu u nastanku komplikacija dijabetesa. MK je ispoljila slabije dejstvo i na drugi enzim koji koristi GSH kao supstrat a to je GSH-ST. Iako je MK aktivnost ovog enzima značajno smanjila u odnosu na AE grupu, ipak je delovanje značajno slabije od delovanja UDK. Slično stavu prethodno imenovanih autora, Atalay i saradnici tvrde da su podaci o

promeni aktivnosti glutation-zavisnih enzima u životinjskim modelima dijabetesa vrlo kontradiktorni. Ništa manje nego podaci dobijeni na ispitivanju ljudi obolelih od dijabetesa (242).

Naši rezultati u pogledu antioksidativnog i hipoglikemijskog delovanja UDK podudaraju se sa istraživanjima drugih autora (162, 163, 239, 256). Iako u našem istraživanju nije direktno određivan nivo GSH, Mahmoud i saradnici su utvrdili da je i u dijabetesu i metaboličkom sindromu smanjena količina GSH u hepatocitima (167). Novija istraživanja opisuju još jedan put antioksidativnog delovanja UDK. Naime, doprinos antioksidativnoj zaštiti UDK daje i stimulacijom redoks-senzitivnog transkripcionog faktora Nrf2 (nuclear factor-E2-related factor 2), što je dokazano kod miševa i ljudi. Na ovaj način, dolazi do porasta nivoa katalaze, peroksidaze i superoksid dismutase (65, 183, 255). Izvori ROS i RNS u dijabetesu su brojni (mitohondrije, NAD(P)H, auto-oksidacija glukoze i drugi), tako da ostaje veliko područje ispitivanja u pogledu tačnog načina na koji MK ostvaruje antioksidativnu zaštitu u dijabetesu.

Od ranije je poznato da je antioksidativna odbrana, pre svega enzimska, tkivno specifična (248). Tkiva i organi imaju različit nivo metaboličke aktivnosti i potrošnje kiseonika, pa tako i različit nivo antioksidanasa. Istraživanja antioksidativne odbrane u *in vivo* modelima sugerišu na različit odgovor i osetljivost na oksidativni stress među vrstama. Smatra se da rezultate studija na životinjama treba uzeti sa rezervom, i da treba težiti tome da se istraživanja vrše na kulturama humanih hepatocita (99).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenog istraživanja i prikazanih rezultata mogu se izvući sledeći zaključci:

1. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina pomažu očuvanje telesne mase u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
2. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina značajno utiču na regulisanje šećera u krvi u aloksanskom dijabetesu kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
3. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina povoljno utiču na parametre jetrene funkcije u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
4. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina značajno povećavaju proliferaciju hepatocita u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
5. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina ne utiču značajno na ekspresiju proteinskih produkata gena uključenih u process apoptoze u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
6. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina smanjuju redukuju ekspresiju nuklearnog farnesoid X receptora u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.
7. Ursodeoksiholna i monoketoholna kiselina u značajnoj meri pojačavaju enzimsku antioksidativnu odbranu hepatocita u holestazi i aloksanskom dijabetesu, kod laboratorijskih pacova soja Wistar.

7. LITERATURA

1. Anđelković Z, Somer Lj, Avramović V, Milosavljević Z, Tanasković I, Matavulj M, et al. *Histologija*. Niš: Impresum; 2009.
2. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997.
3. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije: tekst i atlas*. Beograd: Data status; 2005.
4. Milkiewicz P, Roma MG, Elias E, Coleman R. Pathobiology and experimental therapeutics in hepatocellular cholestasis: lessons from the hepatocyte couplet model. *Clin Sci*. 2002;102:603-14.
5. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 2004;126(1):322-42.
6. Mikov M, Facet JP, editors. *Bile acid: Chemistry, biosynthesis, analysis, chemical and metabolic transformations and pharmacology*. 1st ed. Geneva: Mediset Publisher; 2007.
7. Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. *Medicinska biohemija*. 1. izdanje. Beograd: S. Spasić, Z. Jelić-Ivanović, V. Spasojević-Kalimanovska; 2003.
8. Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, Granner DK. *Harperov pregled biohemije*. 2. izdanje. Beograd: Savremena administracija; 1989.
9. Majkić-Sing N. *Medicinska biohemija*. 2. izdanje. Beograd: Društvo medicinskih biohemičara Jugoslavije; 1994.
10. Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm*. 2006;3(3):231-51.
11. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine function of bile acids. *EMBO J*. 2006;25(7):1419-25.
12. Halilbasic E, Baghdasaryan A, Trauner M. Nuclear receptors as drug targets in cholestatic liver diseases. *Clin Liver Dis*. 2013;17(2):161-89.
13. Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev*. 2010;62(1):1-96.
14. Morgan RE, van Staden CJ, Chen Y, Kalyanaraman N, Kalanzi J, Dunn RT, et al. A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicol Sci*. 2013;136(1):216-41.
15. Gartung C, Matern S. Molecular regulation of sinusoidal liver bile acid transporters during cholestasis. *Yale J Biol Med*. 1997;70(4):355-63.
16. Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res*. 2007;24(10):1803-23.
17. Song X, Chen Y, Valanejad L, Kaimal R, Yan B, Stoner M, et al. Mechanistic insights into isoform-dependent and species-specific regulation of bile salt export pump by farnesoid X receptor. *J Lipid Res*. 2013;54(11):3030-44.
18. Crocenzi F, D'Andrea V, Catania V, Luquita M, Pellegrino J, Ochoa E, et al. Prevention of MRP2 activity impairment in ethinylestradiol-induced cholestasis by ursodeoxycholate in the rat. *Drug Metab Dispos*. 2005;33:888-91.
19. Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptor regulation of the adaptive response of bile acid transporters in cholestasis. *Semin Liver Dis*. 2010;30:160-77.

20. Atanacković M. Patologija. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta, Katedra za patološku anatomiju; 2003.
21. Rubin R, Strayer DS. Rubin`s pathology: clinicopathologic foundations of medicine. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2011.
22. Begić-Janeva A. Patologija jetre, žučne bešike i žučnih vodova. 1. izdanje. Gornji Milanovac : Dečje novine; 1991.
23. Suriawinata AA, Thung N. Liver pathology: an atlas and concise guide. 1st ed. New York: Demos Medical Publishing; 2011.
24. Geller SA, Petrovic LM. Biopsy interpretation of the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2009.
25. Kawaguchi T, Sakisaka S, Sata M, Mori M, Tanikawa K. Different lobular distributions of altered hepatocyte tight junctions in rat models of intrahepatic and extrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 1999;29(1):205-16.
26. Padda MS, Sanchez M, Akhtar AJ, Boyer JL. Drug-induced cholestasis. *Hepatology*. 2011;53(4):1377-87.
27. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol*. 2009;62:481-92.
28. Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis*. 2000;4(2):357-85.
29. Rodríguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol*. 2003; 2(4):150-8.
30. El-Sisi A, Hegazy S, El-Khateeb E. Effects of three different fibrates on intrahepatic cholestasis experimentally induced in rats. *PPAR Res*. 2013;2013:781348.
31. Henriques-Hernandez LA, Flores-Morales A, Santana-Farre R, Axelson M, Nilsson P, Norstedt G. Role of pituitary hormones on 17 alpha ethinylestradiol-induced cholestasis in rat. *JPET*. 2007;320:695-705.
32. Simon FR, Fortune J, Iwahashi M, Gartung C, Wolkoff A, Sutherland E. Ethinyl estradiol cholestasis involves alternations in expression of liver sinusoidal transporters. *Am J Physiol*. 1996;271(6):1043-52.
33. Berr F, Simon FR, Reichen J. Ethinylestradiol impairs bile salt uptake and Na-K pump function of rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1984;10(4):437-43.
34. Toler SM. Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of drug-induced retinopathy. *Exp Biol Med*. 2004;229(7):607-15.
35. Hussein MA, Abdel-Gawad SM. Protective effect of Jasoniamontana against ethinylestradiol-induced cholestasis in rats. *Saudi Pharm J*. 2010;18(1):27-33.
36. Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 2005;433:397-412.
37. Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ, Boyer JL. Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology*. 2000;118:163-72.
38. Simon FR, Fortune J, Iwahashi M, Qadri I, Sutherland E. Multihormonal regulation of hepatic sinusoidal Ntcp gene expression. *Am J Physiol*. 2004;287:782-94.
39. Elias E, Iqbal S, Knutton S, Hickey A, Coleman R. Increased tight junction permeability: a possible mechanism of estrogen cholestasis. *Eur J Clin Investig*. 1983;13:383-90.

40. Yamamoto Y, Moore R, Hess HA, Guo GL, Gonzalez FJ, Korach KS, Maronpot RR, Negishi M. Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J Biol Chem.* 2006;281(24):16625-31.
41. Larson AM. Drug-induced liver injury. UpToDate. 2014 (Literature review current through: Nov 2014. This topic last updated: Mar 11, 2014).
42. Keitel V, Kubitz R, Haussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol.* 2008;14(37):5620-9.
43. Sharma R, Long A, Gilmer JF. Advances in bile acid medicinal chemistry. *Curr Med Chem.* 2011;18(26):4029-52.
44. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Pleiotropic functions of bile acids mediated by the farnesoid X receptor. *Acta Gastro-Ent Belg.* 2012;75:389-98.
45. Pellicciari R, Constantino G, Fiorucci S. Farnesoid X receptor: form structure to potential clinical applications. *J Med Chem.* 2005;48:5383-403.
46. Häussinger D, Schmitt M, Weiergräber O, Kubitz R. Shortterm regulation of canalicular transport. *Semin Liver Dis.* 2000;20(3):307-21.
47. Haussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG, Schliess F. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med.* 2004;25:221-360.
48. Prawitt J, Caron S, Staels B. Bile acid metabolism and the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2011;11:160-6.
49. Garg A, Grundy SM. Cholestyramine therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A short-term, double-blind, crossover trial. *Ann Intern Med.* 1994;121:416-22.
50. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, et al. Glucose regulates the expression of the Farnesoid X receptor in liver. *Diabetes.* 2004;53:890-8.
51. Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzales FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* 2004 Jan 15;18(2):157-69.
52. Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protect against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J Lipid Res.* 2010;51:771-84.
53. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(4):1006-11.
54. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329:386-90.
55. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 2006;439(7075):484-9.
56. 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;31:237-51.

57. Mikov M, Al-Salami H, Golocorbin-Kon S, Skrbic R, Raskovic A, Fawcett JP. The influence of 3 α ,7 α -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanate on gliclazide pharmacokinetics and glucose levels in a rat model of diabetes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;33(3):137-42.
58. Kojic-Damjanov S, Djerić M, Mikov M, Kuhajda K, Kevresan S. Influence of sodium monoketocholate on the hypolipidemic activity of lovastatin in healthy and diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;33:77-84.
59. Tahrani AA, Bailey C, del Prato S, Barnett A. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *Lancet.* 2011;378:182-97.
60. Wang YM, Lin W, Chai S, Wu J, Ong SS, Schuetz EG, et al. Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P450 and multidrug resistance protein 1. *Toxicol Appl Pharm.* 2013;272:96-107.
61. Shizu R, Benoki S, Numakura Y, Kodama S, Miyata M, Yamazoe Y, Yoshinari K. Xenobiotic-induced hepatocyte proliferation associated with constitutive active/androstane receptor (CAR) or peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is enhanced by pregnane X receptor (PXR) activation in mice. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e61802.
62. Chow EC, Magomedova L, Quach HP, Patel RH, Durk MR, Fan J, et al. Vitamin D receptor activation down-regulates small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol. *Gastroenterology.* 2014;146(4):1048-59.
63. Leuenberger N, Pradervand S, Wahli W. Sumoylated PPAR α mediates sex-specific gene repression and protects the liver from estrogen-induced toxicity in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:3138–48.
64. Poupon R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012;36(1 Suppl):S3–12.
65. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(12):523-44.
66. Copaci I, Micu L, Iliescu L, Voiculescu M. New therapeutical indications of ursodeoxycholic acid. *Rom J Gastroenterol.* 2005;14(3):259-66.
67. Geenes V, Lovgren-Sandblom A, Benthin L, Lawrence D, Chambers J, Gurung V, et al. The reversed feto-amternal bile acid gradient in intrahepatic cholestasis of pregnancy is corrected by ursodeoxycholic acid. *PLoS One.* 2014;9(1):e83828.
68. Zoller G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol.* 2009;156:7-27.
69. Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insights into mechanism of cholestatic liver injury. *World J Gastroenterol.* 2012;18(36):4985-93.
70. Sokolovic D, Nikolic J, Kocic G, Jevtovic-Stoimenov T, Veljkovic A, Stojanovic M, et al. The effect of ursodeoxycholic acid on oxidative stress level and DNase activity in rat liver after bile duct ligation. *Drug Chem Toxicol.* 2013;36(2):141-8.

71. Kagawa T, Orii T, Hirose S, Arase Y, Shiraishi K, Mizutani A, et al. Ursodeoxycholic acid stabilizes the bile salt export pump in the apical membrane in MDCK II cells. *J Gastroenterol.* 2014;49(5):890-9.
72. Vaquero J, Monte MJ, Dominguez M, Muntane J, Marin JG. Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition. *Biochem Pharmacol.* 2013;86:926–39.
73. Modica S, Petruzzelli M, Bellafante E, Murzili S, Salvatore L, Celli N, et al. Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protect mice against cholestasis. *Gastroenterology.* 2012;142:355-65.
74. Eloranta JJ, Jung D, Kullak-Ublick GA. The human Na-auricholate cotransporting polypeptide gene is activated by glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, and suppressed by bile acids via a small heterodimer partner-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 2006;20:65-79.
75. Lee JM, Gang GT, Kim DK, Kim YD, Koo SH, Lee CH, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits liver X receptor α -mediated hepatic lipogenesis via induction of the nuclear corepressor SMILE. *J Biol Chem.* 2014;289:1079-91.
76. 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.
77. Dosa PI, Ward T, Castro RE, Rodrigues CM, Steer CJ. Synthesis and evaluation of water-soluble prodrugs of ursodeoxycholic acid (UDCA), an anti-apoptotic bile acid. *Chem Med Chem.* 2013;8(6):1002-11.
78. Patel T, Bronk SF, Gores GJ. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest.* 1994;94:2183-92.
79. Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272:930-8.
80. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol.* 30 May 2013 doi: 10.3389/fphys.2013.00126.
81. Amaral JD, Castro RE, Solá S, Steer CJ, Rodrigues CMP. p53 is a key molecular target of ursodeoxycholic acid in regulating apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282:34250–9.
82. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of mitochondrial permeability transition. *Hepatology.* 2001;33(3):616-26.
83. Posa M, Guzsvany V, Csanadi J. Determination of critical micellar concentrations of two monoketo derivatives of cholic acid. *Colloid Surface B.* 2009;74:84-90.
84. Yang L, Zhang H, Mikov M, Tucker IG. Physicochemical and biological characterization of monoketo cholic acid, a novel permeability enhancer. *Mol Pharmaceut.* 2009;6(2):448–56.

85. Posa M, Kevresan S, Mikov M, Cirin-Novta V, Sârbu C, Kuhajda K. Determination of critical micellar concentrations of cholic acid and its keto derivatives. *Colloid Surface B*. 2007;59(2):179-83.
86. 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.
87. 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;207:21-30.
88. Mikov M, Boni NS, Al-Salami H, Kuhajda K, Kevresan S, Golocorbin-Kon S, et al. Bioavailability and hypoglycemic activity of the semisynthetic bile acid salt, sodium 3alpha, 7alpha-dihydroxy-12-oxo-5beta-cholanate, in healthy and diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2007;32(1):7-12.
89. Mikov M, Al-Salami H, Golocorbin-Kon S, Skrbic R, Raskovic A, Fawcett JP. The influence of 3alpha,7alpha-dihydroxy-12-keto-5beta-cholanate on gliclazide pharmacokinetics and glucose levels in a rat model of diabetes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;33(3):137-42.
90. Raskovic A, Mikov M, Skrbic R, Jakovljevic V, Vasovic V, Posa M, et al. Effect of stevioside and sodium salt of monoketocholic acid on glycemia in normoglycemic and diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;33:17-22.
91. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Mikov M. The influence of the symisynthetic bile acids, MKC on gliclazide PKs and glucose levels in healthy and diabetic rats after pre-treatment with probiotics. *Med Hypothes Res*. 2008;4(2):1-9.
92. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Mikov M. The influence of probiotics pre-treatment, on the ileal permeation of gliclazide, in healthy and diabetic rats. *Arch Drug Inf*. 2008;1(1):35-41.
93. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Golocorbin-Kon S, Mikov M. Probiotics decreased the bioavailability of the bile acid analog, monoketocholic acid, when coadministered with gliclazide, in healthy but not diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2012;37:99-108.
94. Chen G, Yang L, Zhang H, Tucker I, Fawcett JP. Effect of ketocholate derivatives on metotrexate uptake in Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharmaceut*. 2012;433:89-93.
95. Kuhajda K, Cvjetičanin S, Đurendić E, Sakač M, Penov Gaši K, Kojić V, et al. Synthesis and cytotoxic activity of a series of bile acid derivatives. *Hem Ind*. 2009;63(4):313-8.
96. Robins, Cotran. *Pathologic basis of disease*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
97. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radical and antioxidant in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B*. 2007;39:44-84.
98. Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports*. 2012;1:413.

99. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009;674 (1-2) :137-47.
100. Srđenović B. Uticaj fulerenola C60(OH) na oksidativni status bubrega, pluća i testisa pacova nakon jednokratne primene doksorubicina [doktorska disertacija]. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2010.
101. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res.* 2012;42(8):741-9.
102. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009;15:1677–89.
103. Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002;84:131–41.
104. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(2):216–26.
105. Rashid K, Das J, Sil PC. Taurine ameliorate alloxan induced oxidative stress and intrinsic apoptotic pathway in the hepatic tissue of diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:317–29.
106. Osorio H, Coronel I, Arellano A, Franco M, Escalante B, Bautista R. Ursodeoxycholic acid decreases sodium-glucose cotransporter (SGLT2) expression and oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pr.* 2012;97(2):276-82.
107. Lukivskaya O, Egorov LR, Naruta A, Tauschel E, Buko VU. The protective effect of ursodeoxycholic acid in alloxan-induced diabetes. *Cell Biochem Funct.* 2004;22:97-103.
108. Lukivskaya O, Patsenker E, Buko V. Protective effect of ursodeoxycholic acid on liver mitochondrial function in rats with alloxan-induced diabetes: link with oxidative stress. *Life Sci.* 2007;80:2397-402.
109. Gaspar JM, Martins A, Cruz R, Rodrigues CM, Ambrósio AF, Santiago AR. Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience.* 2013;253:380-8.
110. Denisov ET, Afanas'ev IB. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Boca Raton: Taylor&Francis Group; 2005.
111. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. Biohemija slobodnih radikala. Niš: Medicinski fakultet; 2000.
112. Gilbert LD, Colton CA. Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach. New York: Kluwer Academic Publishers; 2002.
113. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J.* 2011;434:201–10.
114. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Bio Med.* 2000;29(3-4):323-33.
115. Anthérieu S, Bachour-El Azzi P, Dumont J, Abdel-Razzak Z, Guguen-Guillouzo C, Fromenty B, et al. Oxidative stress plays a major role in chlorpromazine-induced cholestasis in human HepaRG cells. *Hepatology.* 2013;57(4):1518-29.

116. Nomoto M, Miyata M, Yin S, Kurata Y, Shimada M, Yoshinari K, et al. Bile acid-induced elevated oxidative stress in the absence of farnesoid X receptor. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(2):172-8.
117. Duprez L, Wirawan E, Vanden Bergh T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 2009;11:1050-62.
118. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death. Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.
119. Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem.* 2014;115:632-40.
120. Dunai Z, Bauer PI, Mihalik R. Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathol Oncol Res.* 2011;17:791-800.
121. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis.* 2014;19(4):555-66.
122. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol.* 2000;38:31-40.
123. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
124. Voehringer DW, Mc Conkey DJ, Mc Donnell TJ, Brisbay S, Meyn RE. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:2956-60.
125. Hall AG. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 1999;29:238-45.
126. Yoshihide T, Shigeomi S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis.* 2007;12:835-40.
127. Ehrlich E. Regulation of BAX mediated apoptosis by BCL2 family members. [homepage on the Internet]. Created: June 17, 2011. Available from: <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/apoptosis.php>
128. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med.* 2010;9(45):145-52.
129. Tomko RJ, Bansal P, Lazo JS. Airing out an antioxidant role for the tumor suppressor p53. *Mol Interv.* 2006;6:23-5.
130. Müllauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res.* 2001 Jul;488(3):211-31.
131. National Toxicology Program [homepage on the Internet]. North Carolina: National Institute of Environmental Health Sciences. Necrotic, inflammatory and vascular lesions of the liver: The digitized atlas of mouse lesions. 2014. Available from: <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/liverpath/necrotic/index.cfm>.

132. Weaver DC, Barry CD, McDaniel ML, Marshall GR, Lacy PE. Molecular requirements for recognition at glucoreceptor for insulin release. *Mol Pharmacol.* 1979 Sep;16(2):361-8.
133. Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J.* 1982 Nov 15;208(2):513-5.
134. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008 Feb;51(2):216-26.
135. Chen J, Zhao KN, Liu GB. Estrogen-induced cholestasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Hepato-Gastroenterol.* 2013 Sep;60(126):1289-96.
136. Radzikowska E, Luszczewska-Sierakowska I, Madej B, Burdan F, Mandziuk S, Sokoluk M, et al. Estrogen-induced hepatotoxicity in rats. *JPCCR.* 2012;6(1):10-3.
137. Mottino AD, Hoffman T, Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG, Vore M. Disruption of function and localization of tight junctional structures and Mrp2 in sustained estradiol-17 β -D-glucuronide-induced cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jul;293(1):G391-402.
138. Higashiyama H, Kinoshita M, Asano S. Immunolocalization of farnesoid X receptor (FXR) in mouse tissues using tissue microarray. *Acta Histochem.* 2008;110(1):86–93.
139. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978 May;86(1):271-8.
140. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
141. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974. p. 673-7.
142. Beutler E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods.* 3rd ed. New York: Grune&Stratton; 1984.
143. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics.* [Internet]. 5th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2012 [cited 2015 Oct 15]. Available from: google books.
144. Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, et al. Early indicator of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.* 2014;39(5):775–84.
145. Bossard R, Stieger B, O'Neill B, Fricker G, Meier PJ. Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest.* 1993 Jun; 91(6):2714-4.
146. Ozkan S, Ceylan Y, Ozkan OV, Yildirim S. Review of a challenging clinical issue: Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol.* 2015 Jun 21;21(23):7134–41.

147. Mališová L, Kováčová Z, Koc M, Kračmerová J, Stich V, Rossmeislová L. Ursodeoxycholic acid but not tauroursodeoxycholic acid inhibits proliferation and differentiation of human subcutaneous adipocytes. *PLoS One*. 2013;8(12):e82086
148. Fu ZD, Klaassen CD. Increased bile acids in enterohepatic circulation by short-term calorie restriction in male mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Dec 15;273(3):680–90.
149. Saad RA, Mahmoud YI. Ursodeoxycholic acid alleviates cholestasis-induced histophysiological alterations in the male reproductive system of bile duct-ligated rats. *Reprod Toxicol*. 2014 Dec;50:87–97.
150. Xiang Z, Chen Y, Ma K, Ye Y, Zheng L, Yang Y, et al. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:140.
151. Kim JO, Lee GD, Kwon JH, Kim KS. Anti-diabetic effects of new herbal formula in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull*. 2009 Mar;32(3):421–6.
152. Stilinović N. Farmakološke, toksikološke i biohemijske osobine preparata gljive *Coprinus Comatus*. [dissertation]: Novi Sad: Medicinski fakultet; 2014.
153. Mattison DR, Karyakina N, Goodman M, LaKind JS. Pharmacokinetics and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: a review of the data and identification of knowledge gaps. *Crit Rev Toxicol*. 2014 Sep;44(8):696–724.
154. Kharbanda EO, Parker ED, Sinaiko AR, Daley MF, Margolis KL, Becker M, et al. Initiation of oral contraceptives and changes in blood pressure and body mass index in healthy adolescents. *J Pediatr*. 2014 Nov;165(5):1029–33.
155. Kojima T, Lindheim SR, Duffy DM, Vijod MA, Stanczyk FZ, Lobo RA. Insulin sensitivity is decreased in normal women by doses of ethinyl estradiol used in oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Dec;169(6):1540–4.
156. Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, et al. Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet*. 2008 Jun 27;4(6):e1000108.
157. Đanić M, Pavlović N, Stanimirov B, Vukmirović S, Nikolić K, Agbaba D, et al. The influence of bile salts on the distribution of simvastatin in the octanol/buffer system. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015 Jul 27;1–7.
158. Rizzo G, Passeri D, De Franco F, Ciaccioli G, Donadio L, Rizzo G, et al. Functional characterization of the semisynthetic bile acid derivative INT-767, a dual farnesoid X receptor and TGR5 agonist. *Mol Pharmacol*. 2010 Oct;78(4):617–30.
159. Cagnacci A, Piacenti I, Zanin R, Xholli A, Tirelli A. Influence of an oral contraceptive containing drospirenone on insulin sensitivity of healthy women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 Jul;178:48–50.

160. Jin Y, Lin X, Miao W, Wu T, Shen H, Chen S, et al. Chronic exposure of mice to environmental endocrine-disrupting chemicals disturbs their energy metabolism. *Toxicol Lett.* 2014 Mar 21;225(3):392–400.
161. King A, Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol.* 2015 Oct 15. pii: S0006-2952(15)00567-5.
162. Lukivskaya O, Patsenker E, Buko VU. Protective effect of ursodeoxycholic acid on liver mitochondrial function in rats with alloxan-induced diabetes: link with oxidative stress. *Life Sci.* 2007; 80(26):2397–402.
163. Lukivskaya O, Lis R, Egorov A, Naruta E, Tauschel HD, Buko VU. The protective effect of ursodeoxycholic acid in alloxan-induced diabetes. *Cell Biochem Funct.* 2004;22(2):97–103.
164. Esmerino LA, Ranali J, Rodrigues AL. Blood glucose determination in normal and alloxan-diabetic rats after administration of local anesthetics containing vasoconstrictors. *Braz Dent J.* 1998;9(1):33–7.
165. Tenji A. Hypoglycemic effect of sodium salt of monoketocholic acid in diabetic rats. *Med Pregl.* 2000;53(11-12):635–9.
166. Raskovic A, Jakovljevic V, Mikov M, Gavrilovic M. Joint effect of commercial preparations of *Stevia rebaudiana* Bertoni and sodium monoketocholate on glycemia in mice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;29(2):83–6.
167. Mahmoud AA, Elshazly SM. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PloS One.* 2014;9(9):e106993
168. Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christie ME, et al. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology.* 2005; 146(3):984–91.
169. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1102–9.
170. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, et al. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem.* 2004; 279(22):23158–65.
171. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(4):1006–11.
172. Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A, Vandewalle B, Dumont J, Bouchaert E, et al. The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett.* 2010;584(13):2845–51.

173. Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V, Fiorucci S. The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1802(3):363–72.
174. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005;172(3):367–79.
175. Rodríguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol*. 2003;2(4):150–8.
176. Masubuchi N, Nishiya T, Imaoka M, Mizumaki K, Okazaki O. Promising toxicological biomarkers for the diagnosis of liver injury types: Bile acid metabolic profiles and oxidative stress marker as screening tools in drug development. *Chem Biol Interact*. 2015 Sep 11; doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.012. [Epub ahead of print].
177. Asgharpour A, Kumar D, Sanyal A. Bile acids: emerging role in management of liver diseases. *Hepatol Int*. 2015 Oct;9(4):527–33.
178. Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(1 Suppl):S25–37.
179. Sepe V, Renga B, Festa C, D'Amore C, Masullo D, Cipriani S, et al. Modification on ursodeoxycholic acid (UDCA) scaffold. Discovery of bile acid derivatives as selective agonists of cell-surface G-protein coupled bile acid receptor 1 (GP-BAR1). *J Med Chem*. 2014 Sep 25;57(18):7687–701.
180. Buryova H, Chalupsky K, Zbodakova O, Kanchev I, Jirouskova M, Gregor M, et al. Liver protective effect of ursodeoxycholic acid includes regulation of ADAM17 activity. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:155.
181. Lapenna D, Ciofani G, Festi D, Neri M, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, et al. Anti-oxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochem Pharmacol*. 2002 Dec 1;64(11):1661–7.
182. Stedman C, Liddle C, Coulter S, Sonoda J, Alvarez JG, Evans RM, et al. Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jul 25;103(30):11323–8.
183. Kuntz E, Kuntz HD. *Hepatology: principles and practice: history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy*. 2nd ed. Heidelberg: Springer; 2006.
184. Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Mikov M. Influence of the semisynthetic bile acid (MKC) on the ileal permeation of gliclazide in healthy and diabetic rats. *Pharmacol Rep*. 2008 Aug;60(4):532–41.
185. Onyekwere CA, Ogbera AO, Samaila AA, Balogun BO, Abdulkareem FB. Nonalcoholic fatty liver disease: Synopsis of current developments. *Niger J Clin Pract*. 2015 Nov-Dec; 18(6):703–12.

186. Nakajima T, Naito H. Mechanism analysis and prevention of pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. 2015;70(3):197–204.
187. 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 Mar 14;385(9972):956–65.
188. Danchenko E, Petermann H, Chirkin A, Dargel R. Effect of bile acids on the proliferative activity and apoptosis of rat hepatocytes. *Exp Toxicol Pathol*. 2001 Jun;53(2-3):227–33.
189. Martinez-Diez MC, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ. Comparison of the effects of bile acids on cell viability and DNA synthesis by rat hepatocytes in primary culture. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Feb 21;1500(2):153–60.
190. Chen L, McNulty J, Anderson D, Liu Y, Nystrom C, Bullard S, et al. Cholestyramine reverses hyperglycemia and enhances glucose-stimulated glucagon-like peptide 1 release in Zucker diabetic fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Jul;334(1):164–70.
191. Barone M, Francavilla A, Polimeno L, Ierardi E, Romanelli D, Berloco P, et al. Modulation of rat hepatocyte proliferation by bile salts: in vitro and in vivo studies. *Hepatology*. 1996 May;23(5):1159–66.
192. Zhang L, Wang Y-D, Chen W-D, Wang X, Lou G, Liu N, et al. Promotion of liver regeneration/repair by farnesoid X receptor in both liver and intestine in mice. *Hepatology*. 2012 Dec;56(6):2336–43.
193. Marin JJ, Barbero ER, Herrera MC, Tabertero A, Monte MJ. Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology*. 1993 Nov;18(5):1182–92.
194. Barone M, Panella C, Angelini A, Romanelli D, Francavilla A. Studies in vitro on the influence of ursodeoxycholate sodium salt (UDC) on hepatocyte proliferation. *J Surg Oncol Suppl*. 1993;3:8–13.
195. Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology*. 1991 Nov;14(5):920–6.
196. Uzun MA, Koksal N, Aktas S, Gunerhan Y, Kadioglu H, Dursun N, et al. The effect of ursodeoxycholic acid on liver regeneration after partial hepatectomy in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2009 Aug;39(8):814–21.
197. Bagheri SA, Bolt MG, Boyer JL, Palmer RH. Stimulation of thymidine incorporation in mouse liver and biliary tract epithelium by lithocholate and deoxycholate. *Gastroenterology*. 1978 Feb;74(2 Pt 1):188–92.

198. Deschner EE, Cohen BI, Raicht RF. Acute and chronic effect of dietary cholic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Digestion*. 1981;21(6):290–6.
199. Hays T, Rusyn I, Burns AM, Kennett MJ, Ward JM, Gonzalez FJ, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis. *Carcinogenesis*. 2005 Jan;26(1):219–27.
200. Zhang L, Huang X, Meng Z, Dong B, Shiah S, Moore DD, et al. Significance and mechanism of CYP7a1 gene regulation during the acute phase of liver regeneration. *Mol Endocrinol*. 2009 Feb;23(2):137–45.
201. Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, Moschetta A. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2008 Dec 1;68(23):9589–94.
202. van Heumen BWH, Roelofs HMJ, Vink-Börger ME, Dekker E, Mathus-Vliegen EMH, Dees J, et al. Ursodeoxycholic acid counteracts celecoxib in reduction of duodenal polyps in patients with familial adenomatous polyposis: a multicentre, randomized controlled trial. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Aug 6;8:118.
203. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):107–20.
204. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005 Jul;54(7):1024–33.
205. Kroemer G, Bravo-San Pedro JM, Galluzzi L. Novel function of cytoplasmic p53 at the interface between mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Death Dis*. 2015 Mar 19;6(3):e1698.
206. Giorgi C, Bonora M, Sorrentino G, Missiroli S, Poletti F, Suski JM, et al. p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Feb 10;112(6):1779–84.
207. Serviddio G, Pereda J, Pallardó FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, et al. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology*. 2004 Mar;39(3):711–20.
208. 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 Aug;41(2):235–43.
209. Ezejiofor AN, Orish CN, Orisakwe OE. Cytological and biochemical studies during the progression of alloxan-induced diabetes and possible protection of an aqueous leaf extract of *Costus afer*. *Chin J Nat Med*. 2014 Oct;12(10):745–52.

210. Lucchesi AN, Cassettari LL, Spadella CT. Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. *J Diabetes Res.* 2015;2015:494578.
211. Zou C, Qiu Q, Chen H, Dou L, Liang J. Hepatoprotective effects of selenium during diabetes in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2015 Mar 27; pii: 0960327115579207.
212. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EAG. Comparison of immuno histochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003 Feb;199(2):221–8.
213. Gumprich E, Devereaux MW, Dahl R, Soden JS, Sparagna GC, Leonard SW, et al. Resistance of young rat hepatic mitochondria to bile acid-induced permeability transition: potential role of alphotocopherol. *Pediatr Res.* 2008 Nov;64(5):498–504.
214. Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis.* 2010 Jun; 42(6):409–18.
215. 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 Oct;42(4):925–34.
216. Rose AJ, Berriel Díaz M, Reimann A, Klement J, Walcher T, Kronen-Herzig A, et al. Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor. *Cell Metab.* 2011 Jul 6;14(1):123–30.
217. Weitzel C, Stark D, Kullmann F, Schölmerich J, Holstege A, Falk W. Ursodeoxycholic acid induced activation of the glucocorticoid receptor in primary rat hepatocytes. *Eur J Gastro-enterol Hepatol.* 2005 Feb;17(2):169–77.
218. Tanaka H, Makino I. Ursodeoxycholic acid-dependent activation of the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Oct 30;188(2):942–8.
219. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):98–103.
220. Liu H, Qin C-Y, Han G-Q, Xu H-W, Meng M, Yang Z. Mechanism of apoptotic effects induced selectively by ursodeoxycholic acid on human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 2007 Mar 21;13(11):1652–8.
221. Fimognari C, Lenzi M, Cantelli-Forti G, Hrelia P. Apoptosis and modulation of cell cycle control by bile acids in human leukemia T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Aug;1171:264–9.
222. Tarao K, Fujiyama S, Ohkawa S, Miyakawa K, Tamai S, Hirokawa S, et al. Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in

- hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jan;14(1):164–9.
223. Im E, Choi S-H, Suh H, Choi YH, Yoo YH, Kim ND. Synthetic bile acid derivatives induce apoptosis through a c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent process in human cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2005 Nov 8;229(1):49–57.
224. Kim ND, Im E, Yoo YH, Choi YH. Modulation of the cell cycle and induction of apoptosis in human cancer cells by synthetic bile acids. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006 Dec;6(8):681–9.
225. Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med.* 2007 Jul;13(7):298–309.
226. Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver disease. *Br J Pharmacol.* 2009 Jan;156(1):7–27.
227. Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Pellicciari R, Fiorucci S. Role of FXR in regulating bile acid homeostasis and relevance for human diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord.* 2005 Sep;5(3):289–303.
228. Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, et al. Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(11):1678–87.
229. 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 May;313(2):604–12.
230. Siow Y, Schurr A, Vitale GC. Diabetes-induced bile acid composition changes in rat bile determined by high performance liquid chromatography. *Life Sci.* 1991;49(18):1301–8.
231. Icarte MA, Pizarro M, Accatino L. Adaptive regulation of hepatic bile salt transport: effects of alloxan diabetes in the rat. *Hepatology.* 1991 Oct;14(4 Pt 1):671–8.
232. Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S, Accili D, Ferrannini E. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids. *Diabetes.* 2013 Dec;62(12):4184–91.
233. Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Welch CL, Klaassen CD, Accili D. Impaired generation of 12-hydroxylated bile acids links hepatic insulin signaling with dyslipidemia. *Cell Metab.* 2012 Jan 4;15(1):65–74.
234. Lívero FA, Stolf AM, Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Chicorski R, de Oliveira LG, et al. The FXR agonist 6ECDCA reduces hepatic steatosis and oxidative stress induced by ethanol and low-protein diet in mice. *Chem Biol Interact.* 2014 Jun 25;217:19–27.

235. Jin F, Cheng D, Tao J-Y, Zhang S-L, Pang R, Guo Y-J, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis. *BMC Gastroenterol.* 2013; 13:79.
236. Qi H-P, Wei S-Q, Gao X-C, Yu N-N, Hu W-Z, Bi S, et al. Ursodeoxycholic acid prevents selenite-induced oxidative stress and alleviates cataract formation: In vitro and in vivo studies. *Mol Vis.* 2012;18:151–60.
237. El-Sherbiny GA, Taye A, Abdel-Raheem IT. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of hepatotoxicity caused by amoxicillin-clavulanic acid in rats. *Ann Hepatol.* 2009 Jun; 8(2): 134–40.
238. Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, Vejrazka M, et al. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress. *J Cell Mol Med.* 2011 May;15(5):1156–65.
239. Perez MJ, Macias RIR, Marin JJG. Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Placenta.* 2006 Jan;27(1):34–41.
240. Oguz S, Kanter M, Erbogga M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. *J Mol Histol.* 2012 Apr;43(2):151–9.
241. Guarino MPL, Cong P, Cicala M, Alloni R, Carotti S, Behar J. Ursodeoxycholic acid improves muscle contractility and inflammation in symptomatic gallbladders with cholesterol gallstones. *Gut.* 2007 Jun;56(6):815–20.
242. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *J Sports Sci Med.* 2002 Mar;1(1):1–14.
243. Ceretta LB, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, et al. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:302682.
244. Pittaluga M, Sgadari A, Dimauro I, Tavazzi B, Parisi P, Caporossi D. Physical exercise and redox balance in type 2 diabetics: effects of moderate training on biomarkers of oxidative stress and DNA damage evaluated through comet assay. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:981242.
245. Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabète Métabolisme.* 1992 Aug;18(4):264–71.
246. Likidilid A, Patchanans N, Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thail.* 2010 Jun;93(6):682–93.

247. Soares AA, de Sá-Nakanishi AB, Bracht A, da Costa SMG, Koehnlein EA, de Souza CGM, et al. Hepatoprotective effects of mushrooms. *Molecules*. 2013;18(7):7609–30.
248. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci*. 1999 Mar 15;4:D339–45.
249. Wang T, Zhou Z, Sun L, Li X, Xu Z, Chen M, et al. Resveratrol effectively attenuates α -naphthylisothiocyanate-induced acute cholestasis and liver injury through choleretic and anti-inflammatory mechanisms. *Acta Pharmacol Sin*. 2014 Dec;35(12):1527–36.
250. Szaleczky E, Prechl J, Fehér J, Somogyi A. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus—a rational approach. *Postgrad Med J*. 1999 Jan;75(879):13–7.
251. Mitsuyoshi H, Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, et al. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Sep 24;263(2):537–42.
252. Go H-K, Rahman MM, Kim G-B, Na C-S, Song C-H, Kim J-S, et al. Antidiabetic effects of yam (*Dioscorea batatas*) and its active constituent, allantoin, in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Nutrients*. 2015;7(10):8532–44.
253. Kovačević S, Nestorov J, Matić G, Elaković I. Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats. *Eur J Nutr*. 2015 Oct 3;
254. Gupta S, Gambhir JK, Kalra O, Gautam A, Shukla K, Mehndiratta M, et al. Association of biomarkers of inflammation and oxidative stress with the risk of chronic kidney disease in Type 2 diabetes mellitus in North Indian population. *J Diabetes Complications*. 2013 Dec;27(6):548–52.
255. Kawata K, Kobayashi Y, Souda K, Kawamura K, Sumiyoshi S, Takahashi Y, et al. Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Aug 1;13(3):259–68.
256. Akbulut S, Elbe H, Eris C, Dogan Z, Toprak G, Yalcin E, et al. Effects of antioxidant agents against cyclosporine-induced hepatotoxicity. *J Surg Res*. 2015 Feb;193(2):658–66.