



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
KLINIČKA MEDICINA



**ULOGA ŽUČNIH KISELINA U EPIGENETSKOJ REGULACIJI OKSIDATIVNOG  
STRESA I APOPTOZE U NORMALNIM I MALIGNIM ĆELIJAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Karmen Stankov

Kandidat:

Nebojša Pavlović

NOVI SAD, 2017.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nebojša Pavlović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Karmen Stankov, redovni professor
Naslov rada: NR	Uloga žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji oksidativnog stresa i apoptoze u normalnim i malignim ćelijama
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	<u>srp.</u> / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina

Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Vojvodina, Srbija
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja / 204 stranice / 10 slika / 73 grafikona / 48 tabela / 298 referenci
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmacija, Farmakologija sa toksikologijom
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	žučne kiseline i soli; apoptoza; antineoplastični lekovi; histon deacetilaza; epigenomika; neoplazme kolona; holestaza; inflamacija
UDK	547.93.03/.04:615.2.01 616.348-006.6-084
Čuva se: ČU	Univerzitet u Novom Sadu, Biblioteka Medicinskog fakulteta, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Vojvodina, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Žučne kiseline deluju kao signalni molekuli u organizmu i uključene su u regulaciju brojnih metaboličkih, inflamatornih i imunomodulatornih procesa. Ova endogena jedinjenja ostvaruju svoje efekte najvećim delom putem nuklearnih receptora. Farnezoid X receptor (FXR) je glavni regulator homeostaze žučnih kiselina, a pokazano je da je značajno uključen i u procese inflamacije i kancerogeneze, prevashodno u jetri i intestinalnom traktu. Aktivacija FXR receptora predstavlja značajnu farmakološku strategiju za terapiju holestatskih bolesti jetre, inflamatorne bolesti creva i karcinoma kolona. Definisana je uloga žučnih kiselina u signalnim putevima koji regulišu ćelijski ciklus i doprinose razvoju ili regresiji maligniteta, ali je malo poznat uticaj ovih jedinjenja na epigenetske mehanizme regulacije ključnih ćelijskih procesa. Imajući u vidu da su efekti žučnih kiselina determinisani njihovom polarnošću, cilj istraživanja je bio da se ispita uticaj sintetski dobijenog keto derivata holne kiseline, 12-monoketoholne kiseline

(MKH), u komparaciji sa prirodnim žučnim kiselinama, hidrofobnom henodeoksiholnom kiselinom (HDH) i hidrofilnom ursodeoksiholnom kiselinom (UDH), na ćelijske procese apoptoze, oksidativnog stresa i inflamacije, koji su od značaja za hemoprevenciju i terapiju karcinoma kolona, u *in vitro* i *in vivo* sistemima. Cilj istraživanja je takođe obuhvatao i ispitivanje uloge odabranih žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji ovih procesa u ćelijama karcinoma kolona. Na *in vivo* modelu intrahepatične holestaze kod eksperimentalnih životinja, pokazano je da UDH i MKH ispoljavaju antiapoptotski, antioksidativni i antiinflamatorni efekat u jetri i intestinumu. Utvrđeno je da UDH i MKH sprečavaju mitohondrijalni put aktivacije apoptoze u jetri, dok UDH ispoljava antiapoptotski efekat i u intestinumu eksperimentalnih životinja sa holestazom. Ove dve žučne kiseline su u značajnoj meri modulirale ekspresiju gena uključenih u antioksidativnu zaštitu, kao i aktivnost antioksidativnih enzima, u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa holestazom, ka nivoima ekspresije i aktivnosti kod zdravih, netretiranih životinja. Dok su UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg ispoljile antiinflamatorno dejstvo u jetri i intestinumu smanjenjem ekspresije gena za proinflamatorni transkripcioni faktor NF- $\kappa$ B, primena HDH i MKH u dozi od 20 mg/kg je imala suprotan efekat. Na modelu HT-29 ćelijske linije adenokarcinoma kolona, utvrđeno je da polusintetska žučna kiselina MKH ispoljava značajno manju citotoksičnost u odnosu na HDH i nešto veću citotoksičnost u odnosu na UDH. Epigenetski lek vorinostat je ispoljio sinergističko citotoksično dejstvo sa sve tri ispitivane žučne kiseline. Vorinostat je ostvario proapoptotski i antiproliferativni efekat u HT-29 ćelijama, koji je bio najizraženiji u kombinaciji sa MKH, s obzirom da je došlo do značajnog povećanja odnosa ekspresije *BAX* i *BCL2* gena i smanjenja ekspresije gena za marker proliferacije ciklin D1. Vorinostat je, takođe, značajno smanjio antioksidativni kapacitet HT-29 ćelija smanjenjem ekspresije *NRF2* gena i sledstvenim smanjenjem ekspresije gena za antioksidativne enzime. HDH je dodatno smanjila, a MKH poboljšala antioksidativni kapacitet HT-29 ćelija modulacijom ekspresije *NRF2* gena. U *in vitro* i *in vivo* sistemu u okviru ove doktorske disertacije je pokazano da, pored HDH kao poznatog endogenog agoniste FXR receptora, MKH takođe povećava ekspresiju gena za FXR i njegovog ciljnog gena za transkripcioni korepresor SHP, što ukazuje da ova polusintetska žučna kiselina može da aktivira FXR. Osim toga, utvrđeno je da žučne kiseline ispoljavaju različite efekte prema ekspresiji gena za histon deacetilaze HDAC1 i HDAC2 u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja, kao i u HT-29 ćelijama karcinoma kolona, a jedino je UDH značajno smanjila ekspresiju gena za oba ispitivana enzima uključena u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa, i u ispitivanim tkivima i HT-29 ćelijama. Rezultati našeg rada ukazuju da bi se UDH i MKH mogle koristiti u hemoprevenciji karcinoma kolona u niskim dozama, s obzirom na utvrđene efekte u modulaciji ekspresije gena uključenih u procese apoptoze, oksidativnog stresa i inflamacije. Takođe, s obzirom na ostvaren sinergistički efekat žučnih kiselina sa epigenetskim antitumorskim agensom vorinostatom, otvara se mogućnost kombinovane farmakološke strategije u terapiji solidnih tumora, koji u najvećem procentu pokazuju rezistenciju prema samom vorinostatu.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	23.06.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	Predsednik: Član: Član: Član: Član:

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**FACULTY OF MEDICINE**  
**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Nebojša Pavlović
Mentor: MN	Prof. Dr Karmen Stankov, MD, PhD, Full Professor
Title: TI	The role of bile acids in epigenetic regulation of oxidative stress and apoptosis in normal and malignant cells
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2017

Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Physical description: PD	7 chapters / 204 pages / 10 pictures / 73 graphs / 48 tables / 298 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pharmacy, Pharmacology and Toxicology
Subject, Key words SKW	Bile Acids and Salts; Apoptosis; Antineoplastic Agents; Histone Deacetylase; Epigenomics; Colonic Neoplasms; Cholestasis; Inflammation
UC	547.93.03/.04:615.2.01 616.348-006.6-084
Holding data: HD	University of Novi Sad, Library of the Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Vojvodina, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Bile acids act as signaling molecules in the organism and they are involved in the regulation of numerous metabolic, inflammatory and immunomodulatory processes. These endogenous compounds exert their effects mostly by binding and activation of nuclear receptors. Farnesoid X receptor (FXR) is the main regulator of bile acid homeostasis, and has been shown to be significantly involved in processes of inflammation and carcinogenesis, primarily in the liver and intestinal tract. Activation of FXR receptor represents a significant pharmacological strategy for the treatment of cholestatic liver disease, inflammatory bowel disease, and colon carcinoma. The role of bile acids in signaling pathways regulating the cell cycle and contributing to the development or regression of malignancies is well determined, but the effects of these compounds on epigenetic mechanisms of key cellular processes regulation is yet to be elucidated. Given that the effects of bile acids are mostly determined by their polarity, the aim of our study was to investigate <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> effects of semi-synthetic keto derivative of cholic acid, 12-monoketocholic acid (MKC), in comparison to natural bile acids, hydrophobic chenodeoxycholic acid (CDC) and hydrophilic ursodeoxycholic acid (UDC), on processes of apoptosis, oxidative stress and inflammation, which are significant for both</p>

chemoprevention and therapy of colon cancer. Besides, the aim of our study was to examine the role of selected bile acids in the epigenetic regulation of these processes in colon cancer cells. In *in vivo* model of intrahepatic cholestasis in experimental animals, it has been demonstrated that UDC and MKC exhibit antiapoptotic, antioxidant, and antiinflammatory effects in the liver and intestine. It was shown that UDC and MKC prevent the mitochondrial pathway of apoptosis activation in the liver, while UDC exhibits an antiapoptotic effect in the intestine of experimental animals with cholestasis as well. These two bile acids significantly modulated the expression of genes involved in antioxidant protection, as well as the activity of antioxidant enzymes, in the liver and intestine of experimental animals with cholestasis, towards levels of expression and activity in healthy, untreated animals. While UDC and MKC at a low dose of 4 mg/kg exhibited an antiinflammatory effect in the liver and intestine by reducing the expression of the gene encoding the proinflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B, the application of CDC and MKC at a high dose of 20 mg/kg exerted the opposite effect. In HT-29 human adenocarcinoma cell line, it has been demonstrated that semi-synthetic bile acid MKC exhibits significantly lower cytotoxicity than CDC and slightly higher cytotoxicity than UDC. The epigenetic drug vorinostat has exhibited a synergistic cytotoxic effect with all three investigated bile acids. Vorinostat exerted proapoptotic and antiproliferative effects in HT-29 cells, which were most pronounced in combination with MKC, as there was a significant increase in the ratio of *BAX* and *BCL2* genes expression and a decrease of the proliferation marker cyclin D1 gene expression. Vorinostat also significantly reduced the antioxidant capacity of HT-29 cells by reducing the expression of *NRF2* gene and consequently decreasing the expression of genes encoding antioxidant enzymes. CDC further reduced, while MKC improved the antioxidant capacity of HT-29 cells by modulating the expression of *NRF2* gene. In both *in vitro* and *in vivo* systems, it was demonstrated that, in addition to CDC as a known endogenous FXR agonist, MKC also increased the expression of the gene encoding FXR, and FXR target gene encoding transcriptional co-repressor SHP as well, indicating that this semi-synthetic bile acid can also activate FXR. Besides, bile acids have been shown to exert distinct effects on the expression of the histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 gene in the liver and intestine of experimental animals, and in HT-29 colon cancer cells. Only UDC significantly reduced the expression of the genes for both studied enzymes involved in the epigenetic regulation of cell processes, in both tissues and HT-29 cells. The results of our work indicate that UDC and MKC could be used in chemoprevention of colon cancer at low doses, considering determined effects in the modulation of expression of the genes involved in processes of apoptosis, oxidative stress and inflammation. Furthermore, synergistic effects of bile acids with the epigenetic antitumor agent vorinostat open up the possibility of a combined pharmacological strategy in the treatment of solid tumors, which are at the high percentage resistant to the effects of vorinostat alone.



Accepted on Senate on: AS	June 23, 2014
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: Member: Member: Member: Member:

*Ovu stranicu koristim da se zahvalim svima koji su dali doprinos izradi ove doktorske disertacije i koji su svojim nesebičnim trudom i zalaganjem usmeravali moj istraživački rad.*

*Na prvom mestu se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Karmen Stankov, koja je strpljivo od prvog dana našeg zajedničkog rada svojim znanjem, stručnošću, iskustvom, korisnim savetima i idejama usmeravala moj rad na disertaciji, kao i celokupan istraživački rad, pružajući neprestanu podršku i bezuslovno poverenje.*

*Izuzetnu zahvalnost na ukazanom poverenju, dragocenim savetima, posvećenom vremenu, razumevanju i podršci tokom celokupnog perioda rada na disertaciji dugujem prof. dr Momiru Mikovu, rukovodiocu projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom "Interakcije ksenobiotika i uticaj na sisteme u biomedicini", u okviru kog je urađena ova doktorska disertacija. Zahvaljujem mu se što mi je pružio privilegiju da postanem deo istraživačkog tima koji je doprineo mom usavršavanju i napredovanju u oblasti nauke.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Bojanu Stanimirovu na ukazanoj pomoći u okviru eksperimentalnog rada, na svim dragocenim stručnim savetima, sugestijama i prijateljskoj saradnji.*

*Zahvaljujem se dr Gordani Bogdanović i dr Vesni Kojić iz Instituta za onkologiju Vojvodine na ukazanoj pomoći i uloženom vremenu i trudu tokom eksperimenata sa ćelijskom kulturom, kao i na stručnim i korisnim savetima.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Mihajli Đan i prof. dr Jeleni Purać sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, kao i dr Ivi Barjaktarović iz Centra za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku u Novom Sadu na pomoći u realizovanju genetskih analiza u okviru ove disertacije i interpretaciji rezultata.*

*Srdačno se zahvaljujem svim članovima Katedre za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na divnoj saradnji, prijateljskoj atmosferi i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije. Posebno se zahvaljujem svojim koleginicama Maji Đanić i Vanesi Sekeruš na pomoći, savetima i podršci, koji su učinili da ceo proces izrade doktorske disertacije bude lakši.*

*Takođe se zahvaljujem članovima Katedre za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na saradnji i podršci. Iskrenu zahvalnost dugujem doc. dr Svetlani Goločorbin Kon na bezrezervnoj podršci u svakoj prilici, zalaganju, nesebičnom pružanju znanja i ukazanom poverenju, kao i doc. dr Mladeni Lalić Popović na razumevanju i lepoj saradnji.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezuslovnoj ljubavi, poverenju i podršci koju mi svakodnevno pružaju.*

*Nebojša Pavlović*

# Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Žučne kiseline kao signalni molekuli .....	4
1.1.1. Strukturne karakteristike žučnih kiselina.....	4
1.1.2. Fiziologija žučnih kiselina: biosinteza, transport, metabolizam .....	7
1.1.3. Receptori za žučne kiseline .....	11
1.2. Holestaza, inflamatorna bolest creva i karcinom kolona: molekularni patogenetski mehanizmi .....	20
1.2.1. Uloga žučnih kiselina u holestazi .....	28
1.2.2. Uloga žučnih kiselina u inflamatornoj bolesti creva .....	32
1.2.3. Uloga žučnih kiselina u razvoju karcinoma kolona.....	36
1.3. Epigenetski aspekti kancerogeneze.....	43
1.3.1. Uloga inhibitora histon deacetilaza (HDAC) u terapiji karcinoma.....	46
<b>2. Radne hipoteze i ciljevi istraživanja .....</b>	<b>52</b>
<b>3. Materijal i metode .....</b>	<b>54</b>
3.1. Materijal.....	54
3.1.1. Eksperimentalne životinje .....	54
3.1.2. HT-29 ćelijska linija .....	55
3.2. Metode .....	55
3.2.1. Tretman eksperimentalnih životinja .....	55
3.2.2. Priprema uzoraka seruma, tkiva jetre i intestinuma za genetske i biohemijske analize.....	56
3.2.3. Određivanje biohemijskih parametara u serumu eksperimentalnih životinja .....	57
3.2.4. Tretman HT-29 ćelija .....	58
3.2.5. Određivanje citotoksičnosti prema HT-29 ćelijskoj liniji.....	58
3.2.5.1. Test odbacivanja boje.....	58
3.2.5.2. MTT test.....	59
3.2.6. Analiza tipa interakcije u ostvarivanju citotoksičnog efekta .....	60
3.2.7. <i>In silico</i> analiza molekularnih deskriptora u proceni citotoksičnog efekta .....	60
3.2.8. Priprema uzoraka HT-29 ćelija za genetske i biohemijske analize .....	61
3.2.9. Biohemijske analize oksidativnog statusa u HT-29 ćelijama i uzorcima jetre i intestinuma eksperimentalnih životinja.....	62
3.2.9.1. Određivanje koncentracije proteina .....	62
3.2.9.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije .....	62
3.2.9.3. Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) .....	63
3.2.9.4. Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT).....	64
3.2.9.5. Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) .....	65
3.2.9.6. Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR) .....	66
3.2.9.7. Određivanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze (GST).....	67

3.2.10. Genska ekspresiona analiza u HT-29 ćelijama i uzorcima jetre i intestinuma eksperimentalnih životinja.....	68
3.2.10.1. Izolacija, kvantifikacija i procena kvaliteta RNA .....	68
3.2.10.2. Reverzna transkripcija.....	71
3.2.10.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR) .....	71
3.2.11. Statistička analiza rezultata .....	76
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>77</b>
4.1. Rezultati <i>in vivo</i> studije na životinjama .....	77
4.1.1. Uticaj eksperimentalnog tretmana na vrednosti telesne mase životinja .....	77
4.1.2. Uticaj žučnih kiselina na vrednosti biohemijskih parametara u serumu životinja.....	78
4.1.3. Uticaj žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u jetri i intestinumu životinja .....	80
4.1.4. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u jetri i intestinumu životinja.....	81
4.1.5. Uticaj žučnih kiselina na ekspresiju gena u jetri i intestinumu životinja.....	86
4.1.5.1. Ekspresiona analiza gena koji regulišu proces apoptoze.....	86
4.1.5.2. Ekspresiona analiza gena antioksidativne zaštite .....	91
4.1.5.3. Ekspresiona analiza gena koji regulišu proces inflamacije .....	97
4.1.5.4. Ekspresiona analiza gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina.....	103
4.1.5.5. Ekspresiona analiza gena uključenih u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa .....	107
4.2. Rezultati <i>in vitro</i> studije na HT-29 ćelijskoj liniji humanog kolorektalnog karcinoma.....	111
4.2.1. Citotoksičnost vorinostata, žučnih kiselina i pro- i antioksidanasa prema HT-29 ćelijskoj liniji.....	111
4.2.2. Uticaj žučnih kiselina, doksorubicina i antioksidanasa na citotoksičnost vorinostata prema HT-29 ćelijskoj liniji.....	116
4.2.3. <i>In silico</i> analiza vrednosti citotoksičnosti ursodeoksiholne kiseline (UDH) i henodeoksiholne kiseline (HDH) prema HT-29 ćelijskoj liniji .....	122
4.2.4. Uticaj žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj vorinostatom.....	124
4.2.5. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj vorinostatom.....	125
4.2.6. Uticaj žučnih kiselina na ekspresiju gena u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj vorinostatom .....	130
4.2.6.1. Ekspresiona analiza gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije .....	131
4.2.6.2. Ekspresiona analiza gena antioksidativne zaštite .....	137
4.2.6.3. Ekspresiona analiza gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina.....	142
4.2.6.4. Ekspresiona analiza gena uključenih u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa .....	145
<b>5. Diskusija .....</b>	<b>148</b>
<b>6. Zaključak .....</b>	<b>178</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>181</b>

## 1. Uvod

Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje kancera (IARC), kolorektalni karcinom je treći po učestalosti karcinom u svetu, kao i četvrti najčešći uzrok smrtnosti usled maligniteta, sa 1,36 miliona novih slučajeva i 694.000 smrtnih slučajeva usled kolorektalnog karcinoma godišnje. Ovaj karcinom čini oko 10% svih karcinoma, ali sa velikim varijacijama u incidenciji u zavisnosti od geografskog područja, sa većom učestalošću novih slučajeva u razvijenim zemljama. Najveća incidencija kolorektalnog karcinoma je u Severnoj Americi, Australiji, Novom Zelandu i zapadnoj Evropi (preko 40 slučajeva na 100.000 stanovnika), a najniža u nerazvijenim zemljama zapadne Afrike i ruralnim delovima Azije (manje od 5 slučajeva na 100.000 stanovnika) [1, 2].

Kolorektalni karcinom se razvija kroz postupnu akumulaciju genetskih i epigenetskih alteracija, često praćenu disbalansom crevne mikroflore, što sve dovodi do transformacije normalne mukoze kolona u invazivni karcinom. Do danas su utvrđena tri različita molekularna puta kancerogeneze u kolonu - hromozomska nestabilnost (CIN), mikrosatelitna nestabilnost (MIN) i epigenetski "CpG island" metilator fenotip [3]. Kao najznačajniji intracelularni signalni putevi uključeni u razvoj gastrointestinalnih tumora navode se Wnt/ $\beta$ -katenin i fosfatidilinozitol-3 kinaza (PI3K) put, a dokazana je i značajna uloga receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) i proinflamatornih molekula (TNF- $\alpha$  i COX-2). Svega oko 5% svih kolorektalnih karcinoma se razvija usled nasleđenih genskih mutacija. Najznačajnije su mutacije u tumor-supresornom *APC* (*adenomatous polyposis coli*) genu, a moguće su mutacije i u genima *TP53*, *SMAD2*, *KRas* itd [4].

Imajući u vidu stepen varijacije incidencije kolorektalnog karcinoma u zavisnosti od geografskog područja, pokazano je da su i faktori sredine u velikoj meri uključeni u patogenezu kolorektalnog karcinoma, pre svega način ishrane. Ovo je potvrđeno različitim studijama, uključujući i migracione studije. U jednoj od njih je pokazano da kod japanskih doseljenika na ostrva Havaji, već nakon jedne generacije, dolazi do promene u incidenciji karcinoma kolona, sa inicijalno niske stope japanske populacije na visok nivo koji postoji u nativnoj populaciji ostrva Havaji [5]. Meta-analize kohortnih i kontrolisanih kliničkih studija su pokazale da su ishrana bogata mastima, kao i povećani unos crvenog i konzervisanog mesa u pozitivnoj korelaciji sa incidencijom kolorektalnog karcinoma, dok unos nesvarljivih dijetetskih vlakana negativno korelira sa stopom nastanka ove bolesti [6]. U skladu sa tim je i

činjenica da je ishrana namirnicama sa visokim sadržajem zasićenih masti povezana sa povišenim nivoom žučnih kiselina u lumenu creva i u serumu, a kao posledica povećane sekrecije žuči. Takođe, kod pacijenata sa adenomima i karcinomima kolona su utvrđene povišene koncentracije sekundarnih žučnih kiselina, deoksiholne (DH) i litholne kiseline (LH), a epidemiološkim studijama je dokazan povećan rizik od nastajanja kolorektalnog karcinoma kod ljudi sa povišenim nivoom žučnih kiselina u intestinalnom lumenu i serumu. Imajući u vidu ove činjenice, jasno je da se žučne kiseline mogu smatrati promoterima razvoja kolorektalnog karcinoma [7].

Akumulacija i retencija toksičnih, hidrofobnih žučnih kiselina je konzistentno prisutna tokom holestaze i predstavlja glavni uzrok oštećenja hepatocita, ali je utvrđeno da dolazi do poremećaja i na nivou intestinalnog trakta, pre svega modulacijom oksidativnog statusa enterocita i iniciranjem proinflamatornih puteva. Danas je poznato da osim učestvovanja u apsorpciji lipida i u homeostazi holesterolu, žučne kiseline deluju i kao signalni molekuli, koji u najvećoj meri ostvaruju svoje efekte posredstvom nuklearnih receptora. Povezanost oboljenja jetre i gastrointestinalnog trakta, uključujući i maligne bolesti, u velikoj meri se objašnjava ekspresijom istih nuklearnih receptora u ćelijama ovih organa [8].

Ispitivanjem funkcije prirodnih žučnih kiselina, utvrđeno je da male strukturne razlike imaju za posledicu značajne razlike u afinitetu žučnih kiselina prema nuklearnim receptorima, a samim tim i u efektima koje ostvaruju [9]. Značaj stereospecifičnosti molekula žučnih kiselina u mehanizmu njihovog delovanja se najbolje ogleda u efektima henodeoksiholne (HDH) i ursodeoksiholne kiseline (UDH). Ove dve žučne kiseline predstavljaju epimere, odnosno jedina strukturna razlika im je prostorna orijentacija hidroksilne grupe u položaju C7, i dok HDH predstavlja hidrofobnu i citotoksičnu žučnu kiselinu, koja se smatra i promoterom kancerogeneze, UDH je citoprotektivni agens sa utvrđenim antiapoptotskim, antioksidativnim i antiinflamatornim dejstvom [10].

Imajući u vidu ove činjenice, intenzivno se razvijaju polusintetski derivati žučnih kiselina koji treba selektivno da deluju na odgovarajuće receptore, što otvara nove terapijske mogućnosti za prevenciju i terapiju bolesti jetre, ateroskleroze, gojaznosti i tipa 2 dijabetesa, a sve više se ispituje i mogućnost antitumorskog delovanja aktivacijom ili inhibicijom receptora za žučne kiseline [11]. Četiri žučne kiseline su već odobrene za kliničku primenu, a nekoliko njih je u završnim fazama kliničkih studija. Ursodiol (UDH) se već godinama koristi za rastvaranje radiolucentnih holesterolskih žučnih kamenaca, kao i u terapiji primarne bilijarne ciroze. Tokom 2015. i 2016. godine, tri žučne kiseline su odobrene za humanu upotrebu.

Holna kiselina je indicirana u terapiji retkog naslednog poremećaja sinteze žučnih kiselina usled enzimskog nedostatka, kao i u dopunskoj terapiji peroksizomalnih poremećaja, uključujući Zellweger-ov sindrom, dok je deoksiholna kiselina prvi odobreni injekcioni lek za konturisanje masnog tkiva submentalne regije [12, 13]. Jedina polusintetska žučna kiselina odobrena do sada za kliničku primenu jeste obetiholna kiselina, odnosno 6 $\alpha$ -etil-henodeoksiholna kiselina. Ova žučna kiselina je snažni i selektivni agonista farnezoid X receptora (FXR) i registrovana je za terapiju primarne bilijarne ciroze, u kombinaciji sa UDH, ali se u kliničkim studijama ispituje potencijalna primena ovog leka i u terapiji drugih oboljenja jetre [14].

S obzirom na uključenost žučnih kiselina u različite signalne puteve koji regulišu ćelijski ciklus i na njihovu ulogu u razvoju ili regresiji maligniteta, a sa druge strane na mogućnost modulacije njihove aktivnosti dejstvom na nuklearne receptore, postoji potreba za istraživanjem u pravcu hemoprevencije i terapije intestinalnih karcinoma primenom žučnih kiselina ili dejstvom na njihove receptore. Takođe, malo je poznata uloga žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji ćelijskih procesa apoptoze i proliferacije, oksidativnog stresa i inflamacije, što može biti od izuzetnog značaja u prevenciji i terapiji kolorektalnog karcinoma. Stoga je opravdano ispitati ulogu samih žučnih kiselina u epigenetskim modifikacijama ćelijskih procesa, kao i mogućnost istovremene primene žučnih kiselina sa odobrenim i registrovanim epigenetskim agensima za antitumorsku terapiju.

## 1.1. Žučne kiseline kao signalni molekuli

Žučne kiseline su decenijama smatrane isključivo biološkim surfaktantima, koji vrše solubilizaciju masti iz hrane i na taj način omogućavaju njihovu dalju razgradnju i apsorpciju. Nakon otkrića farnezoid X receptora (FXR) 1999. godine i žučnih kiselina kao prirodnih liganada ovog receptora, utvrđena su i endokrina i parakrina svojstva ovih jedinjenja. Danas je poznato da su žučne kiseline, kao signalni molekuli, uključeni u regulaciju metabolizma glukoze i lipida, termogeneze, inflamatornih i imunomodulatornih procesa, antibakterijske zaštite intestinalnog trakta itd [15].

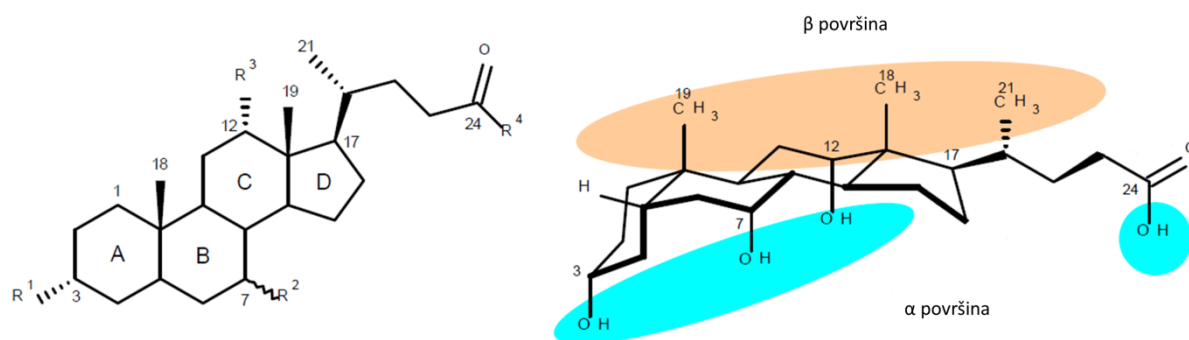
Najveći deo svojih efekata žučne kiseline ostvaruju posredstvom nuklearnog FXR receptora i membranskog TGR5 receptora. Utvrđeno je da se žučne kiseline vežu i za druge nuklearne receptore - vitamin D receptor (VDR), čiji je najznačajniji ligand kalcitriol, kao i za pregnan X receptor (PXR) i potencijalno za konstitutivni androstanski receptor (CAR), čiji su ligandi brojni, strukturno različiti ksenobiotici, koji se vezuju sa većim afinitetom u odnosu na žučne kiseline. Naučna oblast farmakologije žučnih kiselina se intenzivno razvija nakon otkrića receptora za koje se vezuju žučne kiseline i posebno nakon kristalografskih studija kojima je utvrđena trodimenzionalna struktura ligand-vezujućih domena ovih receptora. Na taj način, otvorena je mogućnost za razvoj polusintetskih derivata žučnih kiselina, ali i sintetskih jedinjenja nesteroidne strukture, koji će imati veći afinitet ka ovim receptorima, bolju selektivnost i poboljšane farmakokinetičke karakteristike. Ovi terapijski agensi bi ponudili nove farmakoterapijske mogućnosti kod različitih metaboličkih poremećaja, ali i kod malignih oboljenja [16].

### 1.1.1. Strukturne karakteristike žučnih kiselina

Žučne kiseline su amfifilni molekuli koji se sastoje iz hidrofobnog i rigidnog steroidnog jezgra na koje su vezane hidrofilne hidroksilne grupe, kao i fleksibilni kiseli alifatični bočni lanac. Broj, pozicija i orijentacija hidroksilnih grupa u molekulima žučnih kiselina može da varira. Steroidno jezgro žučnih kiselina čini zasićeni perhidrociklopentanofenantrenski ugljovodonični skelet, koji se sastoji iz tri šestočlana (A, B i C) i jednog petočlanog prstena (D). Kod viših vertebrata, prirodne žučne kiseline predstavljaju derivate 5 $\beta$ -holanske kiseline, gde su prstenovi A i B vezani u *cis*-konfiguraciji. Ovo ima za posledicu zakrivljenost steroidnog jezgra u strukturi žučnih kiselina, odnosno postojanje dve funkcionalno različite



molekulske površine. Angularne metil grupe u položajima 18 i 19 su orijentisane ka konveksnoj  $\beta$  strani steroidnog jezgra, koja je hidrofobna, dok je konkavna  $\alpha$  strana hidrofilna jer sadrži hidroksilne grupe [17]. Od prirodnih žučnih kiselina, izuzetak je UDH, koja čini manje od 3% ukupnog pula žučnih kiselina u organizmu i koja nastaje epimerizacijom hidroksilne grupe u položaju 7 iz HDH pod dejstvom intestinalne mikroflore. Hidroksilna grupa u položaju 7 kod UDH je orijentisana ka konveksnoj  $\beta$  strani steroidnog jezgra, tako da jedino ova prirodna žučna kiselina nema jasno izraženu amfipatičnu strukturu (Slika 1.1.) [18].



Žučna kiselina	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$
Holna kiselina (H)	OH	$\alpha$ -OH	OH	OH
Henodeoksiholna kiselina (HDH)	OH	$\alpha$ -OH	H	OH
Deoksiholna kiselina (DH)	OH	H	OH	OH
Ursodeoksiholna kiselina (UDH)	OH	$\beta$ -OH	H	OH
Litoholna kiselina (LH)	OH	H	H	OH

**Slika 1.1.** Hemijska struktura prirodnih žučnih kiselina kod ljudi i konformaciona formula holne kiseline sa obeleženom hidrofilnom  $\alpha$  površinom (plavo) i hidrofobnom  $\beta$  površinom (braon) [18]

Planarna amfifilna struktura žučnih kiselina, odnosno postojanje hidrofilne i hidrofobne površine molekula, utiče na njihove fizičko-hemijske karakteristike i uslovljava sposobnost samoagregacije. Proces agregacije žučnih kiselina je postupan i odvija se u širokom opsegu koncentracija, što ih razlikuje u odnosu na konvencionalne surfaktante. U vodenoj sredini, kada se nalaze u koncentraciji iznad tzv. kritične micelarne koncentracije (CMC), koja je karakteristika svake površinski aktivne materije, žučne kiseline formiraju micelle usled hidrofobnih interakcija nepolarnih  $\beta$ -strana steroidnog skeleta. Dodatna stabilizacija micela se postiže međumolekulskim vodoničnim vezama između hidroksilnih i/ili karboksilnih grupa, pri čemu pozicija i stereochemija hidroksilnih grupa određuju stepen rigidnosti ovih supramolekularnih agregata [19]. Primarne micelle žučnih kiselina se sastoje iz 2-10

monomera, ali veličina i oblik ovih agregata su direktna posledica jačine hidrofobnih interakcija i vodoničnih veza, koje zavise od prirode žučnih kiselina, njihove koncentracije i spoljašnjih faktora, kao što su temperatura, pH i jonska jačina rastvora [20]. Pojedini derivati žučnih kiselina pokazuju jedinstvenu sposobnost formiranja supramolekularnih agregata višeg stepena uređenosti, poput gelova i pH-senzitivnih jednoslojnih nanotuba [21].

Utvrđeno je da je vrednost CMC za žučne kiseline obrnuto srazmerna njihovoj hidrofobnosti, koja se može lako odrediti merenjem retencionih faktora kod reverzno-fazne hromatografije [22]. Hidrofobnije žučne kiseline, dakle, u nižim koncentracijama mogu da formiraju micelle i vrše solubilizaciju različitih jedinjenja. Osim toga, hidrofobnost je glavna determinanta i toksičnosti žučnih kiselina i zavisi od broja, pozicije i orijentacije (stereochemije) hidroksilnih grupa, kao i od amidacije na poziciji C24. Hidrofilnost žučnih kiselina opada prema sledećem rasporedu: ursodeoksiholna (UDH) > holna (H) > henodeoksiholna (HDH) > deoksiholna (DH) > litholna kiselina (LH). Konjugovane žučne kiseline su hidrofilnije od nekonjugovanih, pri čemu su konjugati sa taurinom hidrofilniji od konjugata sa glicinom. Sposobnost indukovanja apoptoze direktno zavisi od hidrofobnosti, ali i od koncentracije žučnih kiselina. Dok su hidrofobne žučne kiseline, poput DH i HDH, dobro poznati induktori apoptoze i oštećenja ćelija, hidrofilna UDH ima citoprotektivno dejstvo, što takođe ukazuje na značaj stereospecifičnosti u mehanizmu citotoksičnosti žučnih kiselina [23].

Sposobnost samoagregacije žučnih kiselina omogućuje im da ostvare svoje osnovne funkcije u organizmu. Žučne kiseline učestvuju u procesu digestije lipida tako što vrše njihovu solubilizaciju, odnosno lipofilni nutrijenti se inkorporiraju u hidrofobno jezgro micelle, i u toj formi se prenose do mesta dalje razgradnje i apsorpcije. Takođe, u žučnoj kesi, žučne kiseline formiraju mešane micelle sa fosfolipidima i holesterolom, čime se povećava rastvorljivost holesterola i smanjuje toksičnost žučnih kiselina [20]. S druge strane, žučne kiseline u koncentracijama iznad CMC mogu da vrše solubilizaciju fosfolipida iz ćelijskih membrana i tako ispolje svoj membranolitički i citotoksični efekat [24]. Pokazano je, međutim, da žučne kiseline i u submicelarnim koncentracijama interaguju sa fosfolipidnim dvoslojem bioloških membrana hidrofobnim vezama, odnosno da dolazi do particije žučnih kiselina između vodene sredine i membranskih lipida, što dovodi do povećanja fluidnosti i permeabilnosti ćelijske membrane. Na ovaj način, ali i dejstvom na ekspresiju membranskih transportnih proteina, žučne kiseline mogu da povećaju apsorpciju različitih ksenobiotika [25]. S obzirom na ulogu žučnih kiselina u regulaciji različitih metaboličkih signalnih puteva,

oni se danas ispituju kao novi terapijski agensi, ali i kao pomoćni agensi u kombinaciji sa lekovitim supstancama u cilju povećanja njihove bioraspoloživosti. Savremeni terapijski sistemi na bazi žučnih kiselina obuhvataju mešane micele, žučnim kiselinama stabilisane liposome (bilozomi) i konjugate žučnih kiselina sa lekovitim supstancama [26]. Formulisanjem različitih lekovitih supstanci u sisteme sa žučnim kiselinama kao nosačima može se obezbediti organotropizam, odnosno selektivno ciljanje jetre i intestinuma kao mesta dejstva, ali i povećati intestinalna apsorpcija i metabolička stabilnost lekovite supstance [18].

### 1.1.2. Fiziologija žučnih kiselina: biosinteza, transport, metabolizam

Primarne žučne kiseline, holna (H) i henodeoksiholna kiselina (HDH), sintetišu se u jetri iz holesterola kroz niz enzimskih reakcija. Konverzija holesterola u žučne kiseline obuhvata modifikaciju steroidnog jezgra kroz reakcije hidroksilacije, saturacije dvostruke veze između atoma C5 i C6, epimerizacije hidroksilne grupe u položaju 3 i oksidativnog skraćanja bočnog lanca za tri ugljenikova atoma, što doprinosi većoj hidrofilnosti žučnih kiselina u odnosu na holesterol. Ovaj proces katalizuje 17 enzima, koji su lokalizovani u različitim intracelularnim kompartmanima u hepatocitima (mikrozomi, mitohondrije, citosol i peroksizomi) [27].

Biosinteza žučnih kiselina u jetri se odvija na dva načina, preko klasičnog (neutralnog) puta ili alternativnog (kiselog) puta sinteze, koji se razlikuju u prirodi nastalih intermedijera i enzima uključenih u prvoj fazi biosinteze. Klasični put je zaslužan za sintezu preko 90% žučnih kiselina u organizmu i ovim putem nastaju primarne žučne kiseline u približno jednakim količinama, dok se alternativnim putem, kojim se produkuje manje od 10% ukupnog pula žučnih kiselina, sintetiše samo HDH [28].

U klasičnom putu biosinteze, prva i ključna reakcija je konverzija holesterola u  $7\alpha$ -hidroksiholesterol i nju katalizuje mikrozomalni citohrom P450 7A1 (CYP7A1) ili holesterol  $7\alpha$ -hidroksilaza. Ovaj enzim je glavni regulator katabolizma holesterola, odnosno biosinteze žučnih kiselina. Pokazano je da 85% Cyp7a1-deficijentnih miševa ne preživi prve tri postnatalne nedelje usled disfunkcije jetre i malapsorpcije lipida i vitamina, što je bilo delimično ublaženo suplementacijom žučnim kiselinama [29]. Naknadne studije su utvrdile da, dok se kod miševa sa inaktiviranim *Cyp7a1* genom spontano razvija hiperholesterolemija [30], kod *Cyp7a1* transgenih miševa je povećan katabolizam holesterola i ne dolazi do razvoja hiperholesterolemije, ateroskleroze i metaboličkih poremećaja nakon aterogene ishrane sa

visokim sadržajem lipida tokom 24 nedelje [31]. U kliničkim studijama je utvrđeno da su polimorfizmi *CYP7A1* gena u pozitivnoj korelaciji sa rizikom od nastanka žučnih kamenaca, nivoom LDL holesterola u plazmi i sa kardiovaskularnim rizikom [32].

Iz  $7\alpha$ -hidroksiholesterola nastaje intermedijer  $7\alpha$ -hidroksi-4-holesten-3on (C4), koji može da podleže reakciji hidroksilacije u položaju 12 pod dejstvom enzima sterol  $12\alpha$ -hidroksilaze (CYP8B1), što vodi ka formiranju holne kiseline nakon odvajanja bočnog lanca pod dejstvom mitohondrijalne sterol  $27$ -hidroksilaze (CYP27A1). Frakcija C4 intermedijera koja izbegne  $12\alpha$ -hidroksilaciju se pod dejstvom CYP27A1 transformiše u HDH. Stoga, aktivnost CYP8B1 enzima u hepatocitima reguliše odnos holne kiseline i HDH u pulu žučnih kiselina u organizmu. U alternativnom putu biosinteze, najpre se odvija reakcija hidroksilacije u položaju 27 pod dejstvom enzima CYP27A1, pri čemu nastaje  $27$ -hidroksiholesterol. Naknadnu hidroksilaciju u položaju 7 katalizuje oksisterol  $7\alpha$ -hidroksilaza (CYP7B1) i na taj način nastaje HDH. Osim holesterola, oksisteroli nastali u perifernim tkivima mogu da se uključe u alternativni put sinteze žučnih kiselina nakon transporta u jetru [33].

Nakon biosinteze, primarne žučne kiseline se u hepatocitima konjuguju sa aminokiselinama glicinom (75%) ili taurinom (25%) pod dejstvom enzima žučna kiselina-CoA sintaze (*bile acid CoA synthase*, BACS) i žučna kiselina-CoA:amino kiselina N-acetiltransferaze (*bile acid-CoA:amino acid N-acetyltransferase*, BAAT). Ovi konjugati žučnih kiselina su jonizovani pri fiziološkim pH vrednostima i označavaju se kao žučne soli. Konjugacijom žučnih kiselina sa glicinom i taurinom se povećava rastvorljivost u vodi, a smanjuje se citotoksično dejstvo. Žučne soli se sekretuju u žučne kanaliće u najvećoj meri preko efluks pumpe za žučne kiseline (*bile salt export pump*, BSEP/ABCB11) na apikalnoj membrani hepatocita. Osim BSEP transportnog proteina, MRP2 (ABCC2) takođe može da vrši kanalikularnu sekreciju određenih sulfatisanih i konjugovanih žučnih kiselina, ali i konjugovanog bilirubina, konjugata glutationa i različitih lekova. U slučajevima kad je sprečen kanalikularni transport žučnih soli, aktivira se alternativni put eliminacije preko OST $\alpha$ /OST $\beta$ , MRP3 i MRP4 transportera na bazolateralnoj membrani hepatocita u sistemsku cirkulaciju, što dalje dovodi do renalne ekskrecije. Pored BSEP i MRP2 proteina, eksport pumpe za fosfatidilholin (MDR3/ABCB4) i holesterol (heterodimer ABCG5-ABCG8) se takođe nalaze na apikalnoj membrani hepatocita, čija zajednička aktivnost ima za posledicu formiranje mešanih micela holesterola, fosfatidilholina i žučnih soli u bilijarnom traktu. Na ovaj način se holesterol održava u rastvorenom obliku, a žučne kiseline imaju nižu toksičnost [34].

Žučne soli u formi mešanih micela su skladištene u žučnoj kesi. Unos hrane stimuliše enteroendokrine ćelije duodenuma da sekretuju peptidni hormon holecistokinin, koji dalje dovodi do kontrakcije glatkih mišića zida žučne kese i oslobađanja žuči u intestinalni trakt, kao i do sekrecije digestivnih enzima pankreasa u cilju što efikasnijeg varenja. Žučne soli emulguju lipide iz hrane i tako olakšavaju njihovu dalju digestiju i apsorpciju. Žučne soli podležu enterohepatičnoj recirkulaciji, jer nakon što obave svoju fiziološku ulogu, vrlo efikasno (95%) se reapsorbuju preko apikalnog natrijum-zavisnog transportera za žučne soli (*apical sodium-dependent bile salt transporter*, ASBT) na membrani enterocita. Reapsorpcija se uglavnom odvija u terminalnom ileumu, gde je ekspresija ovog transportnog proteina najveća. U enterocitima se pomoću intestinalnog vezujućeg proteina za žučne kiseline (*intestinal bile acid-binding protein*, IBABP) vrši transport apsorbovanih žučnih kiselina do OST $\alpha$ /OST $\beta$  efluks sistema na bazolateralnoj membrani, koji sekretuje žučne kiseline u portalnu cirkulaciju i dalje do hepatocita. Konjugovane žučne kiseline ponovo prelaze u hepatocite aktivnim transportom, u najvećoj meri preko natrijum-zavisnog tauroholat kotransportnog polipeptida (*Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide*, NTCP) na sinusoidalnoj membrani, čime se jedan enterohepatički ciklus zatvara. Nekoliko izoformi transportera za organske anjone (*organic anion transporter*, OATP) na bazolateralnoj strani hepatocita, uključujući OATP1A2, OATP1B1 i OATP1B3, mogu da vrše i natrijum-nezavisno preuzimanje žučnih kiselina iz portalnog krvotoka. Ovaj vid transporta je uglavnom odgovoran za preuzimanje nekonjugovanih žučnih kiselina [28].

Tokom intestinalnog tranzita, žučne kiseline podležu strukturnim modifikacijama pod dejstvom bakterijske flore. Prva reakcija koja se odvija u intestinumu jeste dekonjugacija žučnih soli, odnosno hidroliza amidne veze u položaju 24, koju katalizuje enzim hidrolaza žučnih soli (*bile salt hydrolase*, BSH). Ova reakcija je preduslov da bi došlo do sledstvene 7 $\alpha$ -dehidroksilacije, koja se odvija samo kod nekonjugovanih žučnih kiselina, i na ovaj način iz holne kiseline nastaje DH, a iz HDH se formira LH [35]. Sekundarne žučne kiseline DH i LH su hidrofobne i toksične. Nekonjugovana DH se u najvećoj meri reapsorbuje pasivnom difuzijom u kolonu i transportuje u jetru, gde može preći u konjugovanu formu. U normalnim uslovima, LH podleže sulfataciji u kolonu i eksretuje se putem fecesa, a samo neznatni deo ove žučne kiseline se transportuje u jetru, gde se takođe konjuguje sa sulfatima u položaju C3 dejstvom sulfotransferaza, i u toj formi može da se eliminiše putem bubrega. U intestinumu, enzimi grupa CYP3A i CYP2 mogu da metabolišu LH u rastvorljivije i manje toksične

hiholnu kiselinu i UDH. UDH može da nastane i epimerizacijom hidroksilne grupe u položaju 7 iz HDH pod dejstvom enzima crevne mikroflore [36].

Dok se najveći deo žučnih kiselina reapsorbuje pomoću ASBT proteina u ileumu, a mali deo i pasivnom difuzijom u nižim partijama intestinuma, približno 3% ukupnog pula žučnih kiselina stiže u kolon. To predstavlja 400 do 800 mg žučnih kiselina dnevno, odnosno ostvaruje se koncentracija žučnih kiselina u kolonu od 200 do 1000  $\mu\text{M}$ , pri čemu su to žučne kiseline čija je struktura modifikovana pod dejstvom intestinalnih bakterija. Iako se najčešće samo DH i LH, a ponekad i UDH, spominju kao sekundarne žučne kiseline, do danas je identifikovano preko 50 različitih sekundarnih žučnih kiselina u fecesu kod ljudi. Postoje značajne interindividualne varijacije u apsolutnim i relativnim količinama pojedinačnih žučnih kiselina u kolonu, pre svega zbog velikih razlika u ishrani i mikrobiomu kod ljudi. Koncentracije DH u kolonu stoga variraju u opsegu 30-700  $\mu\text{M}$ , a LH u opsegu 1-450  $\mu\text{M}$ . S obzirom da su žučne kiseline prisutne u kolonu u visokim mikromolarnim koncentracijama, pojedinačne sekundarne žučne kiseline i sa 1% udela se nalaze u biološki relevantnim koncentracijama, te je opravdano ispitati i njihov uticaj na različite ćelijske procese [37].

Iako se u istraživanju fiziologije i farmakologije žučnih kiselina u velikoj meri koriste vrste miševa i pacova kao eksperimentalni modeli, treba imati u vidu da se polarnost i kompozicija pula žučnih kiselina razlikuju u odnosu na čoveka. Kod ovih životinjskih vrsta, najveći deo HDH se transformiše u hidrofilne  $\alpha$ -muriholnu i  $\beta$ -muriholnu kiselinu u jetri, što se ne dešava u organizmu čoveka. Kod ljudi se pul žučnih kiselina sastoji od približno 40% holne kiseline, 40% HDH i 20% DH i značajno je hidrofobniji u odnosu na pul žučnih kiselina kod miševa, gde su predominantne holna i muriholne kiseline, sa niskim udelom HDH i DH. Dok se u humanom organizmu najveći deo žučnih kiselina nalazi u formi konjugata sa glicinom, kod miševa i pacova se žučne kiseline konjuguju skoro isključivo sa taurinom. Takođe, drugačiji sastav intestinalne mikroflore kod ovih životinjskih vrsta u odnosu na čoveka uslovljava i nastanak različitih sekundarnih žučnih kiselina, koje mogu imati specifične uloge, naročito u kolonu. Osim toga, pacovi nemaju žučnu kesu i sekretuju žuč direktno u duodenum nezavisno od unosa hrane, što takođe treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata *in vivo* ispitivanja na ovoj životinjskoj vrsti [36].

### 1.1.3. Receptori za žučne kiseline

Poznato je da žučne kiseline ostvaruju svoje efekte najvećim delom putem nuklearnih receptora za koje se vežu, pre svega putem farnezoid X receptora (FXR), ali i vitamin D receptora (VDR), pregnan X receptora (PXR) i konstitutivnog androstanskog receptora (CAR). Nuklearni receptori obezbeđuju mrežu mehanizama negativne i pozitivne povratne sprege, pre svega u cilju odbrane jetrenih i intestinalnih ćelija od akumulacije žučnih kiselina, sprečavajući njihovu sintezu i preuzimanje u ćelije, a istovremeno indukujući detoksikacione i eksport sisteme za žučne kiseline [8]. Sa identifikacijom receptora za žučne kiseline izvan enterohepatičnog sistema u organizmu čoveka, lista funkcija ovih jedinjenja je značajno proširena i neprestano raste. To se prevashodno odnosi na otkriće membranskog TGR5 (*Takeda G-protein-coupled receptor 5*) receptora u tkivima koja ne učestvuju u procesu enterohepatične recirkulacije žučnih kiselina, kao što su mišići, mozak, masno tkivo. Od nedavno je poznato da se žučne kiseline vezuju i za  $\alpha 5\beta 1$  integrin i sfingozin-1-fosfat receptor 2 (S1PR2), koji poput TGR5 receptora, spadaju u membranske receptore vezane za G-protein [38].

S obzirom na citotoksičnost žučnih kiselina i ulogu u promociji kancerogeneze, stroga kontrola njihovih intracelularnih i sistemskih, serumskih koncentracija je neophodna pod normalnim uslovima. Najzaslužniji receptor za održavanje homeostaze žučnih kiselina u organizmu jeste FXR. Ovaj nuklearni receptor je biološki senzor žučnih kiselina, koji se aktivira kod povećanja njihove koncentracije u organizmu i transkripciono reguliše ekspresiju gena uključenih u sintezu, transport i metabolizam žučnih kiselina. Stoga je FXR jedna od najznačajnijih farmakoloških meta u farmakoterapiji holestatskih poremećaja jetre [34].

Identifikovana su dva gena za FXR. *NR1H4* gen kodira FXR $\alpha$ , dok se *NR1H5* gen za FXR $\beta$  smatra pseudogenom kod ljudi, jer FXR $\beta$  nema funkciju receptora za žučne kiseline. FXR $\alpha$  se zbog toga najčešće označava samo kao FXR i postoji u 4 funkcionalne izoforme koje se razlikuju u tkivnoj distribuciji i transaktivacionom potencijalu [39]. FXR je najviše eksprimiran u tkivima izloženim visokim koncentracijama žučnih kiselina, odnosno u hepatocitima, bilijarnom epitelu i enterocitima, pre svega u ileumu. Osim toga, nalazi se i u renalnim tubularnim ćelijama i adrenalnim žlezdama. Nizak nivo ekspresije je detektovan i u adipocitima,  $\beta$ -ćelijama pankreasa, miokardu, vaskularnim endotelnim i glatkim mišićnim ćelijama, limfocitima i monocitima, a nedavno i u intersticijalnim (Lejdigovim) ćelijama testisa gde učestvuje u kontroli procesa steroidogeneze [40].

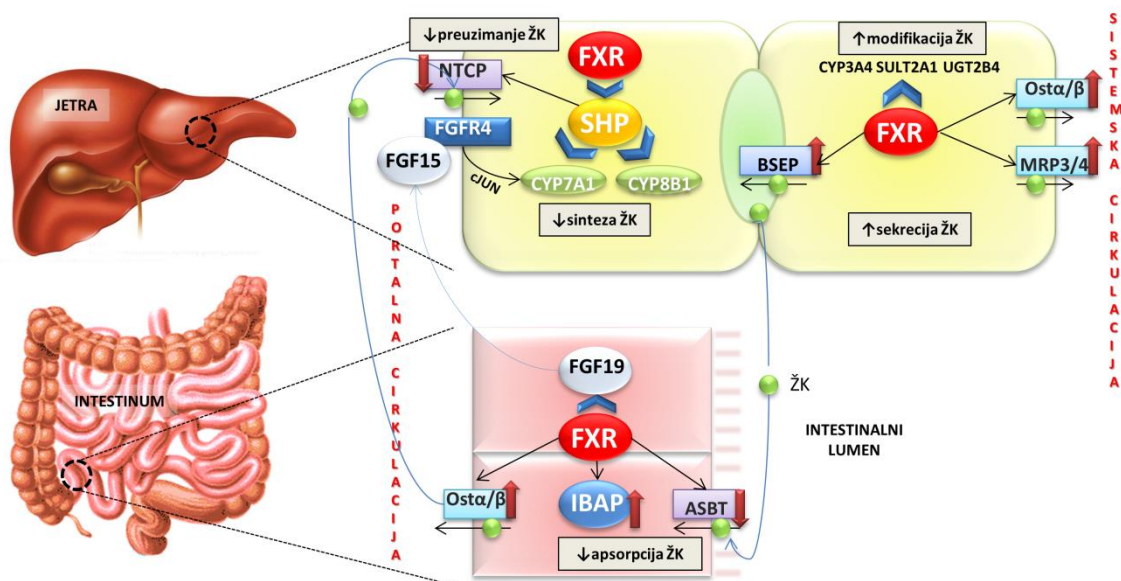
Poput drugih nuklearnih receptora, FXR protein poseduje strukturu u kojoj se razlikuju visoko konzervisani DNA-vezujući domen u N-terminalnom regionu i ligand-vezujući domen na C-terminusu, koji je umereno konzervisan u pogledu sekvence, a visoko strukturno konzervisan. Ova dva domena FXR su međusobno povezana fleksibilnim *hinge* regionom. FXR se kao monomer ili češće kao heterodimer sa receptorom za retinoičnu kiselinu (RXR) vezuje svojim DNA-vezujućim domenom za specifične sekvence DNA u promoterima svojih ciljnih gena. U odsustvu liganda, FXR/RXR heterodimer se nalazi u kompleksu sa ko-represorima i tada su ciljni geni utišani. Nakon vezivanja liganda, dolazi do konformacionih promena FXR i heterodimera sa RXR, što ima za posledicu oslobađanje ko-represornih proteina i vezivanje ko-aktivatora koji epigenetskim mehanizmima, prevashodno acetilacijom histona, transkripciono aktiviraju ciljne gene. Za razliku od direktne indukcije ekspresije ciljnih gena, FXR vrši represiju transkripcije češće indirektno, preko atipičnog nuklearnog receptora SHP (*small heterodimer partner*, SHP/NR0B2). FXR indukuje ekspresiju SHP receptora, koji nema DNA-vezujući domen, a koji vrši transkripcionu represiju tako što formira nefunkcionalne heterodimere sa različitim ko-aktivatorima, uključujući i nuklearne receptore, i na taj način inhibira njihovu transkripcionu aktivnost [41].

Jedini endogeni ligandi za FXR jesu žučne kiseline, i u konjugovanoj i u slobodnoj formi. *In vitro* studijama je utvrđeno da prirodne žučne kiseline deluju kao agonisti ovog receptora i da najveći afinitet ka FXR ima HDH ( $EC_{50} \sim 10 \mu M$ ), u značajno manjoj meri DH i LH, a neznatno i holna kiselina. Konjugati sa glicinom i taurinom pokazuju veći afinitet ka FXR u odnosu na nekonjugovane analoge. UDH, kao hidrofilna žučna kiselina, nije ligand za FXR. Danas se razvijaju polusintetski derivati žučnih kiselina, kao i ligandi nesteroidne strukture, sa većim afinitetom i selektivnošću prema FXR receptoru u odnosu na žučne kiseline. Najpoznatiji polusintetski agonista FXR receptora je obetiholna kiselina (6 $\alpha$ -etil-HDH,  $EC_{50} \sim 100 \text{ nM}$ ), koja je od nedavno registrovani lek za terapiju primarne bilijarne ciroze. Sintetski agonista GW4064 sa veoma visokim afinitetom i specifičnošću za FXR ( $EC_{50} \sim 15 \text{ nM}$ ) se koristi u brojnim *in vitro* i *in vivo* prekliničkim studijama za ispitivanje funkcije ovog nuklearnog receptora [16, 42].

FXR je glavni regulator homeostaze žučnih kiselina u organizmu. Pod fiziološkim uslovima, žučne kiseline aktiviraju FXR u jetri. FXR indukuje SHP, koji dalje inhibira transkripciju ključnog *CYP7A1* gena u sintezi žučnih kiselina, kao i *CYP8B1* gena, čija ekspresija određuje odnos holne kiseline i HDH, odnosno hidrofilnost pula žučnih kiselina u organizmu. Žučne kiseline inhibiraju sopstvenu sintezu na još jedan način, aktivacijom FXR



receptora u enterocitima. Aktivirani FXR indukuje fibroblastni faktor rasta 19 (*fibroblast growth factor 19*, FGF19) u enterocitima kod ljudi, odnosno Fgf15 kod glodara. Ovaj peptidni hormon se transportuje portalnim krvotokom u hepatocite, u kojima se vezuje za FGFR4 receptor i dalje vrši represiju *CYP7A1* gena c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) zavisnim signalnim putem. Pored toga što dovodi do inhibicije sinteze žučnih kiselina, aktivacija FXR ima za posledicu i indukciju BACS i BAAT enzima u hepatocitima, koji prevodi žučne kiseline u hidrofilniji i manje toksičan konjugovani oblik. Takođe, dolazi i do aktivacije eksport transportnih sistema na membrani hepatocita i enterocita. U jetri, FXR indukuje ekspresiju BSEP i MRP2 transporterera na kanalikularnoj membrani hepatocita, a u uslovima smanjenog ortogradnog transporta žučnih kiselina u bilijarni trakt, FXR aktivira i eksport pumpe na bazolateralnoj membrani hepatocita ( $OST\alpha/OST\beta$ , MRP3 i MRP4). U ileumu, aktivacija FXR dovodi do smanjenja reapsorpcije žučnih kiselina, tako što smanjuje ekspresiju ASBT transportnog proteina na apikalnoj membrani enterocita. S druge strane, FXR indukuje ekspresiju IBABP proteina koji vrši intracelularni transport žučnih kiselina do bazolateralne membrane, kao i  $OST\alpha/OST\beta$  transportnog sistema, koji vrši njihov efluks u portalni krvotok. FXR, putem SHP, vrši represiju *NTCP* gena za transporter na sinusoidalnoj membrani hepatocita, koji je zaslužan za preuzimanje žučnih kiselina iz portalne cirkulacije. Enzimi uključeni u biotransformaciju i eliminaciju žučnih kiselina (*CYP3A4*, *SULT2A1*, *UGT2B4*), naročito u patološkim uslovima, su takođe pozitivno regulisani od strane FXR (Slika 1.2.) [36, 43].



**Slika 1.2.** Najznačajnije funkcije FXR u jetri i intestinumu kod ljudi u regulaciji homeostaze žučnih kiselina [43]

FXR je uključen i u regulaciju metabolizma lipida i ugljenih hidrata. Poznato je da prekidom enterohepatične recirkulacije žučnih kiselina, upotrebom sekvestranata žučnih kiselina kod pacijenata sa hiperholesterolemijom ili nakon ilealne resekcije, dolazi do povećanja nivoa triglicerida u plazmi. Utvrđeno je da upravo FXR povezuje metabolizam žučnih kiselina i triglicerida, tako što preko SHP proteina smanjuje ekspresiju transkripcionog faktora sterol regulatorni element-vezujućeg proteina 1c (SREBP-1c) i njegovih ciljnih gena za acetyl-CoA sintetazu (AceCS), malik enzim (ME) i stearoil-CoA desaturazu 1 (SCD-1), koji su uključeni u biosintezu masnih kiselina i triglicerida. Osim toga, aktivacija FXR stimuliše i  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i dovodi do smanjenja nivoa lipida u jetri [44]. Nasuprot ulozi u metabolizmu triglicerida, stimulacija FXR dejstvom agonista, i steroidne i nesteroidne strukture, dovodi do povećanja nivoa LDL, a sniženja nivoa HDL holesterola [45]. Potvrđeno je i kod ljudi da dugotrajna primena HDH dovodi do blagog povećanja serumskih koncentracija LDL holesterola. Ovo je posledica, pre svega, inhibirane konverzije holesterola u žučne kiseline dejstvom FXR na ekspresiju CYP7A1 enzima [43]. Primena agonista FXR ima pozitivan uticaj na metabolizam glukoze, jer smanjuje insulinsku rezistenciju i koncentraciju glukoze u krvi životinja [46]. Poznato je i da je metabolizam žučnih kiselina izmenjen kod pacijenata sa tipom 2 dijabetesa, ali i da modifikacija pula žučnih kiselina može da poboljša glikemijsku kontrolu kod takvih pacijenata. Uočeno je da je nivo ekspresije FXR u jetri smanjen kod dijabetičnih životinja [47], ali sa druge strane aktivacija FXR preko SHP dovodi do smanjenja ekspresije gena za fosfoenolpiruvat karboksikinazu (PEPCK) i glukoza-6-fosfatazu (G6Paza), enzime uključene u proces glukoneogeneze [34].

Osim u regulaciji metaboličkih procesa, FXR je značajno uključen i u procese inflamacije i kancerogeneze, pre svega u jetri i intestinalnom traktu. Utvrđeno je da su žučnim kiselinama aktivisani nuklearni receptori, prvenstveno FXR, sniženi u ćelijama kolorektalnog karcinoma. Takođe, pronađena je veza i između gubitka ekspresije FXR i kancerogeneze u jetri i intestinumu [48]. Pokazano je da aktivacijom FXR može da se suprimira kancerogeneza u jetri posredstvom nekoliko mehanizama. Kao prvo, FXR održava homeostazu žučnih kiselina, glukoze i lipida u jetri, a ima značajnu ulogu i u procesu regeneracije jetre, s obzirom da aktivacija FXR u hepatocitima dovodi do indukcije signalnih puteva koji promovišu preživljavanje ćelija. Pokazano je i da FXR suprimira hepatičnu inflamaciju i sprečava inflamatorno oštećenje jetre, a pored toga FXR može direktno da vrši indukciju pojedinih tumor-supresornih gena i represiju onkogenih gena u hepatocitima [49].

Vitamin D receptor (VDR; NR1H1) ima centralnu ulogu u regulaciji homeostaze kalcijuma i metabolizma kostiju, ali je utvrđena uloga ovog nuklearnog receptora i u procesima ćelijske diferencijacije i proliferacije, imunomodulacije, kao i u metabolizmu žučnih kiselina. VDR je najviše eksprimiran u osteoblastima, u bubrezima i intestinumu, kao i u monocitima i imunokompetentnim ćelijama. U niskom nivou nalazi se i u  $\beta$ -ćelijama pankreasa, adipocitima i vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, a kod ljudi i u hepatocitima [50]. U odsustvu liganda, VDR se nalazi u kaveolinskim domenima ćelijske membrane. Nakon vezivanja liganda, dolazi do heterodimerizacije sa RXR i translokacije ovog kompleksa u nukleus, gde se veže za specifične sekvence DNA na promoterima ciljnih gena i daljeg regrutovanja ko-aktivatora ili ko-represora u cilju transaktivacije ili transrepresije ciljnog gena [51]. Najvažniji endogeni ligand je calcitriol (1,25-dihidroksiholekalciferol), hormonski aktivni metabolit vitamina D izmenjene steroidne strukture. Od prirodnih žučnih kiselina jedino LH deluje kao agonista VDR ( $EC_{50} \sim 8 \mu M$ ). Nešto veći afinitet ka VDR pokazuju derivati LH, 3-keto-LH i naročito LH-acetat i LH-propionat [52].

U enterocitima, VDR, između ostalog, ima ulogu senzora za LH, kao toksičnu sekundarnu žučnu kiselinu. Dokazan je protektivni efekat VDR prema dejstvu LH, koji se sprovodi aktivacijom enzima CYP3A4, koji vrši hidroksilaciju LH, i enzima SULT2A1, koji katalizuje sledstvenu sulfataciju hidroksi derivata LH. Osim toga, aktivacija VDR u enterocitima dovodi i do povećanja ekspresije MRP3 transportera koji vrši efluks LH i njenih metabolita iz ćelija, sprečavajući njihovu intracelularnu akumulaciju [38]. Uprkos niskoj ekspresiji VDR u jetri, utvrđeno je da aktivacija VDR calcitriolom u primarnim humanim hepatocitima dovodi do indukcije metaboličkih enzima CYP3A, CYP2B i CYP2C, kao i do supresije *CYP7A1* gena, odnosno do inhibicije biosinteze žučnih kiselina u jetri [53]. Ovo otvara mogućnost primene agonista VDR u terapiji holestaze. Osim toga, pokazano je da je intestinalni VDR uključen i u signalne puteve patogeneze inflamatorne bolesti creva (IBC), kao i da je deficijencija vitamina D povezana sa povećanim rizikom od nastanka ove bolesti [54]. Takođe, vitamin D i njegovi analozi imaju protektivno dejstvo prema inicijaciji i progresiji tumora, uključujući i karcinom kolona, što je potvrđeno u različitim životinjskim modelima tretiranim kancerogenim jedinjenjima [55].

Pregnan X receptor (PXR; NR1H2) i konstitutivni androstanski receptor (CAR; NR1H3) su nuklearni receptori koji se najčešće označavaju kao senzori za ksenobiotike, jer za razliku od drugih nuklearnih receptora koji selektivno interaguju sa svojim fiziološkim ligandima, velika ligand-vezujuća šupljina PXR i CAR im omogućava da stupe u interakciju sa velikim

brojem strukturno različitih, hidrofobnih liganada, uključujući i pojedine žučne kiseline. Ovi receptori su najviše eksprimirani u jetri i intestinalnom traktu i uključeni su u detoksikaciju ksenobiotika kroz regulaciju enzima I i II faze metabolizma ksenobiotika i efluks transportera, i na taj način štite hepatocite i enterocite od akumulacije štetnih ksenobiotika. Aktivacijom PXR i CAR dolazi do indukcije brojnih citohroma koji učestvuju u procesu oksidacije ksenobiotika, kao na primer CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, kao i do povećanja ekspresije enzima sulfotransferaza, UDP-glukuronozil transferaze i glutation-S-transferaze, koji vrše konjugaciju ksenobiotika. U transportne proteine koji su pozitivno regulisani od strane PXR i CAR spadaju P-glikoprotein (MDR1), MRP2, MRP3 itd. Mnogi ciljni geni za PXR i CAR su isti, ali ovi receptori imaju različit afinitet za vezivanje na promotere tih gena, pa tako, na primer, PXR utiče prevashodno na indukciju metabolizma preko CYP3A4, a CAR u većoj meri indukuje CYP2B6. PXR i CAR se, poput većine drugih nuklearnih receptora, vezuju za promotere ciljnih gena u vidu heterodimera sa RXR. CAR se razlikuje od drugih nuklearnih receptora po tome što u odsustvu liganda deluje kao transkripcioni aktivator [56, 57].

Veliki broj strukturno različitih lekova, biljnih jedinjenja, pesticida i drugih ksenobiotika može da se veže za PXR i CAR. U istraživanjima se kao agonista za PXR najčešće koristi lek rifampicin, dok je fenobarbiton najznačajniji aktivator CAR u studijama na ljudima i životinjama. Fenobarbiton ne deluje kao agonista CAR, nego kao indirektni aktivator ovog receptora, u odsustvu liganda. Sintetisana su i jedinjenja koja deluju kao selektivni agonisti za CAR kod ljudi (CITCO) i miševa (TCPOBOP) i koja se koriste u istraživanjima mehanizama dejstva ovog nuklearnog receptora [58].

Utvrđeno je i da žučne kiseline kao endogene supstance mogu da se vežu za PXR i CAR. LH i njen oksidovani metabolit 3-keto-LH su agonisti za PXR ( $EC_{50} \sim 10 \mu M$ ). Serumske koncentracije LH, čak i u uslovima holestaze retko prelaze 100 nM, i jedino u slučajevima rupture intrahepatičnih žučnih kanalića hepatociti mogu biti izloženi koncentracijama LH koje bi mogle aktivirati PXR [38]. Ovaj receptor ima ulogu u održavanju homeostaze žučnih kiselina tako što njegovom aktivacijom dolazi do indukcije citohroma koji vrše konverziju žučnih kiselina u hidrofilnije i manje toksične derivate, kao i do povećanja ekspresije enzima koji vrše konjugaciju hidroksilovanih metabolita žučnih kiselina [59]. Osim toga, aktivacija PXR ima za posledicu i značajnu inhibiciju biosinteze žučnih kiselina smanjenjem ekspresije CYP7A1 enzima [60]. Od prirodnih žučnih kiselina, CAR interaguje sa holnom kiselinom, ali i sa keto derivatima LH (6-keto-LH i 7-keto-LH) i pokazano je da

žučne kiseline mogu da deluju kao inverzni agonisti CAR receptora [61]. S druge strane, pojedine studije pokazuju da žučne kiseline ne aktiviraju CAR, ali da je ovaj receptor uključen u regulaciju metabolizma i transporta ovih endogenih jedinjenja [62]. S obzirom da CAR, poput PXR, aktivira detoksikacione mehanizme u ćelijama jetre i intestinuma, potencijalni efekti žučnih kiselina ostvareni posredstvom CAR treba da budu detaljnije razjašnjeni.

PXR i CAR su uključeni i u regulaciju metabolizma glukoze i lipida. Aktivacija oba receptora ima za posledicu hipoglikemijski efekat, koji potiče prevashodno od supresije gena za enzime PEPCCK i G6Pazu, uključene u proces glukoneogeneze [63]. S druge strane, kod ljudi je utvrđeno da izloženost pojedinim pesticidima i polihlorovanim bifenilima (PCB), a koji su aktivatori PXR, ima hiperglikemijski efekat, mada treba imati u vidu da su u pitanju slabi aktivatori, a takođe i ligandi za druge receptore, tako da uloga PXR u signalnim putevima od značaja za razvoj dijabetesa treba da bude dodatno ispitana [64]. PXR i CAR imaju različite efekte u pogledu regulacije metabolizma lipida. Dok aktivacija PXR promoviše dislipidemiju, uglavnom kroz indukciju lipogeneze i supresiju  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina [65], CAR ostvaruje hipolipemijsko dejstvo, prvenstveno indukcijom Insig-1 proteina koji dovodi do smanjenja nivoa aktivne forme SREBP-1, koji je značajan za proces lipogeneze [66]. Pored uloge u metabolizmu glukoze i lipida, pokazano je da aktivacijom PXR dolazi do ubrzanog katabolizma vitamina D, kao i da dugotrajna primena rifampicina ili fenobarbitona dovodi do deficijencije vitamina D ili osteomalacije [67]. CAR je uključen i u energetske metabolizam, tako što njegova aktivacija ima za posledicu sniženje nivoa hormona tireoidne žlezde u organizmu. Utvrđeno je da CAR zapravo indukuje D1 tip enzima dejodinaze, koja konvertuje T4 u reverzni trijodtironin (rT3), najmanje aktivnu formu hormona T3 [68]. Aktivacija CAR može da dovede i do proliferacije hepatocita, hiperplazije jetre i hepatomegalije, kao odgovor na toksikante, što je najverovatnije adaptivni mehanizam kako bi se toksični agensi što efikasnije eliminisali [58]. S druge strane, uloga PXR u hepatokancerogenezi nije potpuno jasna, a pokazano je da aktivacija PXR može da bude od koristi u inhibiciji inflamatornih procesa, pre svega kod IBC [69].

Žučne kiseline ostvaruju najveći deo svojih efekata modulacijom ekspresije gena posredstvom nuklearnih receptora, kao transkripcionih faktora. Utvrđeno je, međutim, da ova jedinjenja mogu da stimulišu i brz porast cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) u ćelijama, što je sugerisalo da žučne kiseline mogu da aktiviraju različite intracelularne signalne puteve nezavisno od uticaja na ekspresiju gena [38]. Ovo je dobilo potvrdu 2002. godine otkrićem

TGR5 receptora, koji spada u grupu membranskih receptora vezanih za G-protein. TGR5 aktivira adenilat ciklazu koja proizvodi cAMP, a koji dalje dovodi do aktivacije signalnih puteva protein kinaze A (PKA) i sledstvene fosforilacije brojnih regulatornih metaboličkih enzima, ali i do aktivacije CREB (*cAMP response element-binding protein*) transkripcionog faktora, koji indukuje ekspresiju različitih ciljnih gena [34].

TGR5 je široko rasprostranjen u organizmu. Ekspimiran je u hepatobilijarnom sistemu, celom gastrointestinalnom, slezini, mišićima, mozgu, bubrezima, plućima, masnom tkivu, različitim endokrinim žlezdama i placenti. U jetri, TGR5 je ekspimiran u sinusoidalnim endotelnim ćelijama, epitelnim ćelijama žučnih kanalića i Kupferovim ćelijama, ali ne i u hepatocitima. S obzirom da su žučne kiseline najznačajniji ligandi ovog receptora, ubikvitarno prisustvo TGR5 u organizmu jasno upućuje da žučne kiseline imaju brojne fiziološke funkcije, pored osnovne funkcije u digestiji i održavanju sopstvene homeostaze [70]. Od prirodnih žučnih kiselina, LH i DH deluju kao najsnažniji agonisti za TGR5, zatim HDH, a holna kiselina ispoljava najslabiji afinitet ka TGR5 receptoru. Dok konjugati sa glicinom imaju nešto manji afinitet ka TGR5 u odnosu na odgovarajuće slobodne forme, konjugati sa taurinom pokazuju najizraženije agonističko delovanje, pa je tako taurolitoholna kiselina (TLH) najsnažniji prirodni agonista TGR5 ( $EC_{50} \sim 0,3 \mu\text{M}$ ) [71]. Imajući u vidu da su žučne kiseline snažni, ali neselektivni agonisti TGR5 receptora, odnosno da deluju pre svega na nuklearne receptore, izoluju se i sintetišu novi, selektivniji ligandi za TGR5. U istraživanjima se najčešće koriste polusintetska žučna kiselina 6 $\alpha$ -etil-23(S)-metilholna kiselina (INT-777) i triterpenoid biljnog porekla oleanolinska kiselina [72].

Osnovni efekti posredovani TGR5 receptorom u organizmu nisu vezani za održavanje homeostaze žučnih kiselina, već prvenstveno za energetske metabolizam i homeostazu glukoze, mada utiču i na funkciju bilijarnog trakta, enteričnog nervnog sistema i imunološkog sistema. TGR5 se smatra značajnom farmakološkom metom za terapiju metaboličkog sindroma, odnosno hiperglikemije i gojaznosti. Pokazano je da aktivacija TGR5 dovodi do hipoglikemijskog efekta stimulacijom sinteze i oslobađanja GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) iz enteroendokrinih L-ćelija na kalcijum-zavisni način [73]. Ovaj inkretin smanjuje sekreciju glukagona, a povećava oslobađanje insulina, mada i sama aktivacija TGR5 na  $\beta$ -ćelijama pankreasa ima za posledicu smanjenje oslobađanja insulina na cAMP- i kalcijum-zavisni način [74]. Žučne kiseline posredstvom TGR5 receptora promovišu i energetske metabolizam, tako što aktiviraju enzim jodotironin dejodinu 2 (DIO2), koja konvertuje T4 hormon tireoidne žlezde u T3 aktivnu formu, koja stimuliše  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina u mrkom

masnom tkivu kod miševa, odnosno u skeletnim mišićima kod ljudi. Na taj način, primena žučnih kiselina može da spreči, ali i da umanja gojaznost indukovanu ishranom sa visokim sadržajem lipida [75].

Aktivacija TGR5 ima i imunomodulatorni efekat. Pokazano je da je TGR5 odgovoran za supresiju aktivacije makrofaga od strane žučnih kiselina, inhibicijom signalnog puta nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [76]. Od ostalih efekata posredovanih TGR5 receptorom, treba napomenuti aktivaciju CFTR hloridnog kanala u bilijarnim epitelnim ćelijama i sekreciju bikarbonata koji povećavaju pH vrednost žuči i održavaju žučne kiseline u jonizovanoj formi, odnosno sprečavaju njihov transmembranski transport u ćelije [77]. Takođe, aktivacija TGR5 dovodi do boljeg punjenja žučne kese usled otvaranja ATP-zavisnih kalijumovih kanala u glatkim mišićnim ćelijama žučne kese, odnosno relaksacije njenog mišićnog zida [78]. Pokazano je i da TGR5 stimuliše proliferaciju holangiocita mehanizmom koji uključuje i receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), kao i da je povećana ekspresija TGR5 receptora u ćelijama humanog holangiokarcinoma [79].

TGR5 je eksprimiran i u nervnim ćelijama. Aktivacija ovog receptora u enteričnom nervnom sistemu dovodi do oslobađanja serotonina i CGRP neuropeptida (*calcitonin gene-related peptide*), koji stimulišu intestinalni motilitet [80]. Pokazano je i da aktivacijom TGR5 u senzornim neuronima kože dolazi do otvaranja TRPA1 katjonskih kanala (*transient receptor potential ankyrin 1*) i hiperekscitabilnosti neurona i osećaja svraba, koji je čest simptom holestatskih oboljenja jetre i povišene koncentracije žučnih kiselina u organizmu [81].

Pored TGR5, žučne kiseline mogu da se vezuju i za membranske receptore  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin i sfingozin-1-fosfat receptor 2 (S1PR2). Utvrđeno je da UDH stimuliše holerezu tako što se u formi konjugata sa taurinom (TUDH) veže za  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin u hepatocitima. TUDH aktivira ovaj integrin mehanizmom koji obuhvata ulazak u hepatocite putem NTCP transportera, vezivanje za intracelularni domen  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrina i sledstvene konformacione promene ovog proteina, koje iniciraju dalju intracelularnu signalizaciju ERK1/2 i p38 mitogenom-aktivisanih protein kinaza (MAPK) [82]. U hepatocitima, konjugovane žučne kiseline mogu da aktiviraju S1PR2, koji transaktivira EGFR i insulinski receptor (IR), što dalje dovodi do aktivacije signalnih puteva ERK1/2 i protein kinaze B (PKB/Akt). Posledica ove ćelijske signalizacije može da bude povećana sinteza glikogena i smanjena glukoneogeneza, povećana ekspresija proinflamatornih gena i supresija *CYP7A1* gena u sintezi žučnih kiselina [83].

## 1.2. Holestaza, inflamatorna bolest creva i karcinom kolona: molekularni patogenetski mehanizmi

Holestaza, inflamatorna bolest creva (IBC) i karcinom kolona su zasebni patofiziološki entiteti, ali ih odlikuje povezanost u brojnim signalnim putevima, uključujući i one posredovane receptorima na koje deluju žučne kiseline. Jetra i intestinalni trakt su u bliskoj vezi i u pogledu anatomske strukture i fizioloških funkcija i predstavljaju posebnu metaboličku jedinicu. Poznato je da različiti intestinalni peptidi direktno utiču na signalne puteve i metaboličke procese u jetri. S druge strane, žučne kiseline kao endogene supstance, ali i veliki broj lekova i toksina nakon metabolizma u jetri, podležu enterohepatičnoj recirkulaciji i direktno utiču na funkcionisanje intestinalnog trakta. Ova jedinjenja pokazuju organotropizam ka jetri i intestinumu, dok se u sistemske cirkulaciji nalaze u niskim koncentracijama. Takođe, održavanje imunološke homeostaze organizma podrazumeva fiziološke interakcije između imunološkog sistema intestinalnog trakta (intraepitelni limfociti, IgA-produkujuće B-ćelije, Pejerove ploče, mezenterijalni limfni čvorovi) i jetre (sinusoidalni limfociti, dendritične ćelije, Kupferove ćelije, bilijarni epitel) [84].

Poremećaji u funkcionisanju veze između jetre i intestinuma mogu imati za posledicu razvoj različitih oboljenja ovih organa. Gastrointestinalni simptomi, poput mučnine, povraćanja i dijareje, često se javljaju kod pacijenata sa uznapredovalim bolestima jetre. Hronične intestinalne bolesti, poput IBC, glutenske enteropatije i sindroma kratkog creva, mogu da indukuju pojavu nealkoholnog steatohepatitisa i ciroze jetre [85]. S druge strane, hronične bolesti jetre mogu da dovedu do poremećaja intestinalnog motiliteta, barijerne disfunkcije intestinuma i do prekomernog rasta bakterija u lumenu creva. Eksperimentalno je pokazano da indukovanjem hroničnog holestatskog oštećenja jetre primenom 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidina (DDC) tokom tri nedelje kod miševa dolazi i do hipoplazije intestinalne mukoze usled indukcije apoptoze i inhibicije proliferacije enterocita [86].

Holestaza predstavlja poremećaj u transportu žuči iz jetre u intestinalni trakt, što dovodi pre svega do akumulacije žučnih kiselina u jetri, krvi i ekstrahepatičnim tkivima. Intrahepatična holestaza podrazumeva poremećaje sekrecije žuči koji nastaju na nivou hepatocita ili žučnih kanalića unutar jetre. Osnovni mehanizam nastanka intrahepatične holestaze jeste poremećaj ekspresije i/ili funkcije kanalikularnih transportnih proteina. Benigna i progresivna forma nasledne intrahepatične holestaze tipa 2 kod ljudi uzrokovane su



defektima *ABCB11* gena, koji kodira BSEP efluks transporter žučnih kiselina u hepatocitima. Brojni lekovi, poput oralnih kontraceptiva, psihotropnih lekova, antibiotika i nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), mogu da izazovu intrahepatičnu holestazu, pre svega kompetitivnom inhibicijom funkcije BSEP proteina [87].

Osim alteracija u funkciji transportnih proteina, i citoskeletne promene i prekid međucelijskih veza u jetri mogu da doprinesu razvoju intrahepatične holestaze. Proteini tesne veze (*tight junctions*) formiraju paracelularnu barijeru koja održava elektrohemijski gradijent, neophodan za transepitelni transport. U uslovima narušene ove paracelularne barijere, zbog nedostatka elektrohemijskog gradijenta, odnosno jonske pokretačke sile kroz membranu, smanjen je kanalikularni transport žučnih kiselina i dolazi do holestaze. Utvrđeno je da kod ljudi povećana paracelularna permeabilnost i sledstvena regurgitacija žuči mogu imati različitu lokalizaciju u jetri. Kod primarne bilijarne ciroze (PBC), značajne alteracije proteina uključenih u održavanje tesnih veza se uočavaju prevashodno u žučnim kanalima, dok su te promene kod primarnog sklerozirajućeg holangitisa (PSH) uglavnom na nivou hepatocita [88].

U morfološkom smislu, holestaza podrazumeva prisustvo vidljive žuči prevashodno u hepatocitima, ali i u kanalikulima i Kupferovim ćelijama. Ova hepatocelularna karakteristika holestaze se označava i kao bilirubinostaza, jer je bilirubin glavna komponenta žuči koja se vidi pod svetlosnim mikroskopom u vidu braon pigmentacije. Dok je bilirubinostaza lako uočljiva kod ekstrahepatične bilijarne opstrukcije, hronična intrahepatična holestaza može da se razvija godinama bez ove morfološke karakteristike [89].

Klinički znaci holestatskih oboljenja jetre se dele na primarne, koji su direktna posledica akumulacije komponenta žuči (žučnih kiselina, bilirubina i lipida) u organizmu, i na sekundarne, koji nastaju usled neadekvatne postprandijalne koncentracije žučnih kiselina u tankom crevu. Najznačajniji biohemijski pokazatelji holestaze u serumu su alkalna fosfataza (ALP), gama-glutamil transferaza (GGT) i 5'-nukleotidaza. Povećanje njihovih aktivnosti u serumu su najraniji znak holestatskih bolesti. Iako se žutica, odnosno hiperbilirubinemija, često povezuje sa holestatskim oboljenjima jetre, ona je znak uznapredovale bolesti. Kod holestaze, hiperbilirubinemija je uglavnom konjugovanog tipa. Iako određivanje koncentracije bilirubina u serumu nema veliki dijagnostički značaj za samu holestazu, ima prognostički značaj pre svega kod PBC i PSH [90].

Pruritus je jedan od najčešćih simptoma kod holestaze. Iako se žučne kiseline u visokim koncentracijama smatraju pruritogenim supstancama kod pacijenata sa holestazom, treba

imati u vidu da je pruritus kod holestaze intermitentan uprkos malim varijacijama koncentracije žučnih kiselina u organizmu. Svrab se najčešće javlja uveče i noću i može značajno da utiče na kvalitet života, kao i malaksalost, koja je takođe klinički znak uznapredovalih holestatskih oboljenja. Patogeneza malaksalosti nije u potpunosti razjašnjena, ali uključuje izmenjenu neuroendokrinu funkciju i serotonergičnu neurotransmisiju. Kao primarni klinički znaci holestaze mogu da se jave i holesterolski depoziti, ksantelazme i ksantomi, kao posledica hronične hiperlipidemije. S druge strane, međutim, nije pronađena veza između holestaze i rizika od nastanka ateroskleroze i ishemijske bolesti srca. Sekundarni klinički znaci holestaze se javljaju samo u slučajevima uznapredovale hronične bolesti i podrazumevaju malapsorpciju masti i liposolubilnih vitamina, kao i pojavu bilijarne steatoreje [89].

Holestatski poremećaji jetre imaju za posledicu najpre oštećenje hepatocita i proliferaciju žučnih kanala, a kod netretirane hronične holestaze može doći i do fibroznih promena u jetri, razvoja ciroze i, na kraju, gubitka funkcije jetre. Utvrđeno je da se razvija stanje oksidativnog stresa u hepatocitima kod holestaze. Iako i same žučne kiseline mogu da produkuju reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS) u hepatocitima, glavni izvor oksidativnog stresa su prevashodno inflamatorne ćelije koje se akumuliraju u jetri u ranim fazama holestatskog oboljenja. Nastale reaktivne vrste kiseonika ne samo da oštećuju hepatocite, nego doprinose i nastanku produkata lipidne peroksidacije koji aktiviraju stelatne ćelije u jetri [91]. Ove ćelije imaju ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji fibroze jetre, jer sekretuju fibrogene faktore koji stimulišu portalne fibrocite, fibroblaste i miofibroblaste kostne srži da produkuju kolagen [92].

Dva najznačajnija hronična holestatska oboljenja jetre predstavljaju PBC i PSH. PBC je autoimuno oboljenje jetre, koje se karakteriše progresivnim oštećenjem malih žučnih kanala. Dijagnostikuje se na osnovu biohemijskih i patoloških karakteristika holestaze, kao i na osnovu prisustva antimitohondrijalnih antitela (AMA) u serumu. PSH je retka bolest koja se odlikuje nespecifičnom inflamatornom fibrozom intrahepatičnih i/ili ekstrahepatičnih bilijarnih duktusa. Dijagnoza PSH je zasnovana na specifičnim holangiografskim promenama u kombinaciji sa biohemijskom profilom u serumu i histološkim nalazom jetre karakterističnim za holestazu, ali i na prisustvu pridruženih ekstrahepatičnih bolesti, pre svega IBC, koja se javlja kod 60-80% pacijenata sa PSH [93].

IBC predstavlja skup hroničnih inflamatornih poremećaja gastrointestinalnog trakta i obuhvata dva osnovna tipa: ulcerozni kolitis i Kronovu bolest. Etiologija IBC nije u

potpunosti razjašnjena, ali je generalno prihvaćena teorija da IBC nastaje kombinovanim uticajem faktora sredine i disfunkcije mukoznog imunološkog sistema kod genetski predodređenih osoba [94].

Kronova bolest može da zahvati bilo koji deo intestinuma, dok je ulcerozni kolitis najčešće ograničen na rektum i deo kolona. Oba tipa IBC se karakterišu dijarejom, abdominalnim bolom, malaksalošću i gubitkom telesne mase. Osnovna karakteristika IBC je povećana permeabilnost intestinalnog epitela, što rezultuje kontinuiranom stimulacijom mukoznog imunološkog sistema, regrutovanjem neutrofila i inflamatornim odgovorom [95].

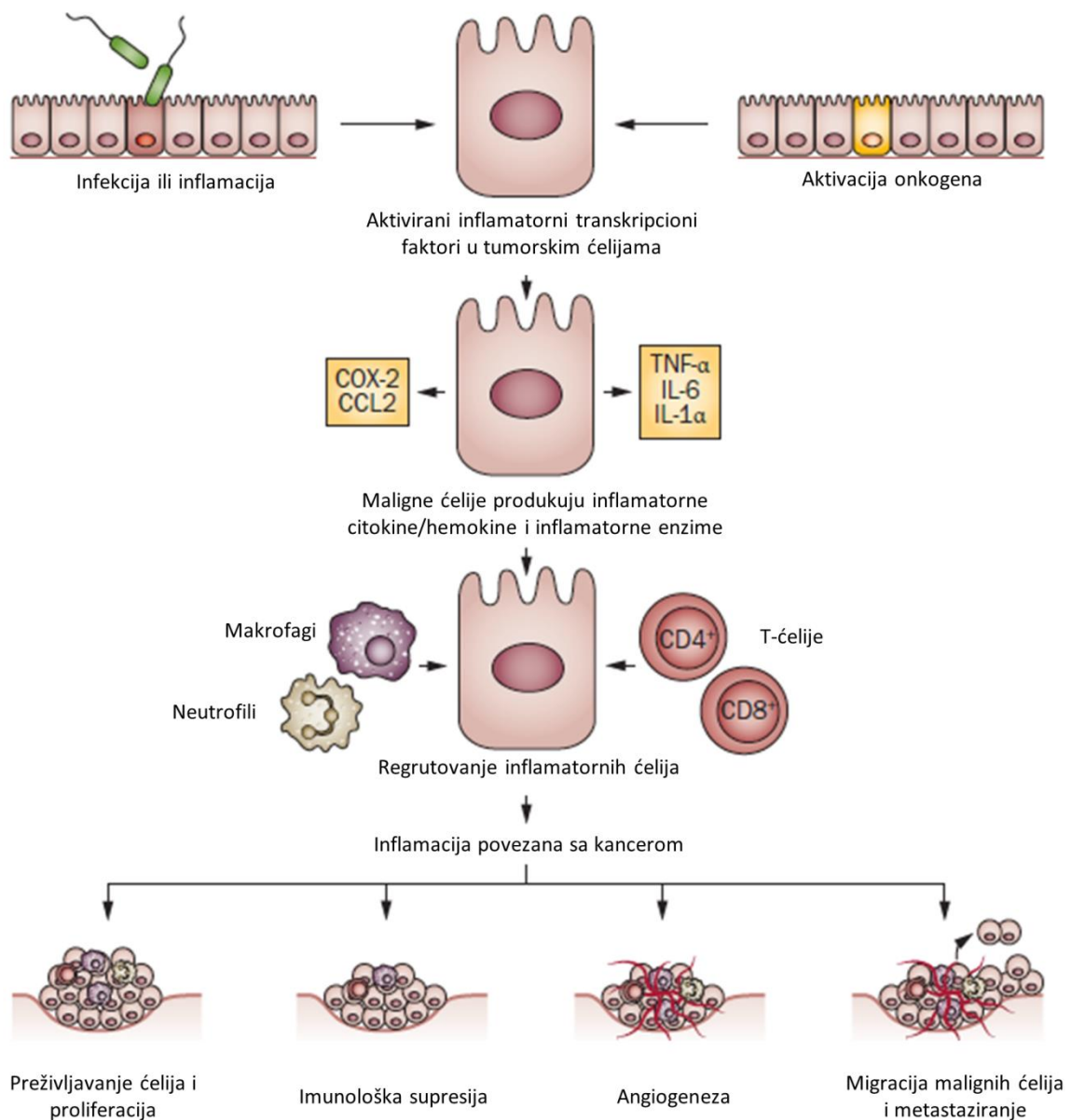
Molekularni mehanizmi koji doprinose povećanoj intestinalnoj permeabilnosti su alteracije u proteinima tesne veze i povećana apoptoza enterocita. Pojedini citokini mogu da povećaju permeabilnost intestinalnog epitela modulacijom ekspresije i lokalizacije proteina tesne veze [96]. Imunološki odgovor organizma se razlikuje kod Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Kod Kronove bolesti je zasnovan na aktivnosti tipa 1 T-helper ćelija (Th1), koje proizvode interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-12 (IL-12), a koji dalje stimulišu celularni imunološki odgovor putem makrofaga. Nasuprot tome, u ulceroznom kolitisu se aktiviraju Th2 ćelije koje proizvode IL-5, IL-10 i IL-13, koji su odgovorni za produkciju specifičnih antitela, aktivaciju eozinofila i inhibiciju funkcije makrofaga [97].

Iako su dokazani brojni genski polimorfizmi povezani sa povećanim rizikom od nastanka IBC, sam genotip nije dovoljan da objasni sve fenotipske manifestacije ove bolesti. Danas je poznato da mnogi faktori sredine mogu da uzrokuju disbiozu crevne mikroflore, što dovodi do aktivacije različitih proinflamatornih puteva u intestinumu. Na značaj intestinalne bakterijske flore ukazuje i činjenica da pacijenti sa IBC imaju smanjen mikrobni diverzitet u odnosu na zdrave osobe [98].

IBC je bolest koja se javlja kod mladih ljudi i poseban problem predstavljaju komplikacije ove bolesti koje se razvijaju u visokom procentu, od kojih je najznačajnija razvoj kolorektalnog karcinoma. Ovo je posebno značajno kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom, kod kojih je rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma 10-30 puta veći u odnosu na zdravu populaciju, a zavisi od dužine trajanja bolesti i intenziteta inflamacije. Kao komplikacije IBC mogu da se jave još i intestinalne strikture, fistule i apscesi, infektivni kolitis, perforacija kolona i toksični megakolon, a mogu da se jave komplikacije i na nivou jetre, poput periholangitisa i PSH [99].

Dok je nespecifična inflamacija najčešće samoregulisana u organizmu i doprinosi homeostazi tkiva kroz regulaciju apoptoze, perzistentna i neregulirana inflamacija povećava rizik od maligne transformacije ćelija. Oko 20% svih humanih karcinoma su u vezi sa prethodnom hroničnom inflamacijom, koju mogu da uzrokuju infekcije, izloženost određenim iritansima ili autoimuna oboljenja [100]. Kolorektalni karcinom je jedan od najbolje opisanih primera karcinoma koji nastaju kao direktna posledica hronične inflamacije kod pacijenata sa IBC. S druge strane, dok naslednim tipovima kolorektalnog karcinoma retko prethodi vidljiva hronična inflamacija intestinuma, pokazano je da i oni mogu biti sprečeni ili odloženi primenom antiinflamatornih lekova, što ukazuje na značaj aktivacije proinflamatornih signalnih puteva u procesu kancerogeneze [101].

Ćelije i medijatori nespecifičnog imunološkog sistema se detektuju u većini karcinoma, bez obzira da li je ekstrinzična inflamacija uključena u njihov razvoj. Pored infekcije i inflamacije, i aktivacija onkogeni u ćeliji može da ima za posledicu indukciju inflamatornih signalnih puteva u pre-malignim i malignim ćelijama, tako da ne samo da inflamacija može da uzrokuje nastanak karcinoma, nego i karcinomi dovode do inflamatornog odgovora. U tumorskim ćelijama je najčešće povećana ekspresija proinflamatornih transkripcionih faktora NF- $\kappa$ B, STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) i HIF1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ), koji dalje dovode do povećanja ekspresije ključnih inflamatornih citokina i hemokina, kao i inflamatornih enzima, što stvara kompleksnu mrežu inflamatornih signala unutar tumorske mikrosredine. Aktiviraju se TNF- $\alpha$ , multifunkcionalni citokin sa plejotropnim efektima u regulaciji imunološkog odgovora, IL-6 koji ima značajnu ulogu u promociji razvoja tumora, inflamatorni hemokin CCL2 koji direktno stimuliše proliferaciju, preživljavanje i migraciju tumorskih ćelija, a deluje i kao hemotaktički faktor za monocite. Inflamatorni enzim ciklooksigenaza-2 (COX-2), koji katalizuje sintezu prostaglandina, je takođe povišen u tumorskim ćelijama, u kojima može delovati antiapoptotski. Dejstvom hemokina, regrutuju se inflamatorne ćelije, uključujući neutrofile, makrofage, dendritične ćelije, mastocite i T-ćelije, koje infiltriraju stromu tumora i učestvuju u imunološkom odgovoru. Ove imunološke ćelije u tumorima imaju dualnu ulogu, ili dovode do antitumorskog odgovora ili naprotiv promovišu kancerogenezu, u zavisnosti od sastava tumorske inflamatorne mikrosredine i odnosa pojedinih medijatora inflamacije (Slika 1.3.) [102].



**Slika 1.3.** Molekularni mehanizmi nastanka inflamacije povezane sa kancerom [102]

Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B ima najznačajniju ulogu u tranziciji iz IBC u karcinom kolona. Na modelu transgenih miševa sa konstitutivnom aktivnošću I $\kappa$ B kinaze  $\beta$  (IKK $\beta$ ) u intestinalnim epitelnim ćelijama, pokazano je da konstitutivna aktivacija NF- $\kappa$ B usled fosforilacije i inhibicije aktivnosti I $\kappa$ B, dovodi do ubranog razvoja kolorektalnog tumora, uzrokovanog oštećenjem DNA, ali bez vidljivih pokazatelja inflamacije [103]. Jedan od najvažnijih citokina indukovanih aktivacijom NF- $\kappa$ B je IL-6, koji proizvode ćelije mukoznog imunološkog sistema i koji doprinosi inicijaciji i progresiji kolorektalnog karcinoma, prevashodno kroz aktivaciju STAT3 faktora i sledstvenu stimulaciju proliferacije epitelnih ćelija i inhibiciju apoptoze [104]. Na modelu kolorektalnog karcinoma indukovanih hroničnom inflamacijom kod miševa je pokazano da aktivacija Wnt indukuje TNF- $\alpha$ , što ima

za posledicu pojačanu aktivnost NF- $\kappa$ B, de-diferencijaciju epitelnih ćelija creva i olakšanu inicijaciju razvoja karcinoma [105]. Produžena aktivnost NF- $\kappa$ B može da indukuje oštećenje DNA i povećanjem nivoa oksidativnog stresa, što je dodatna veza između hronične inflamacije i inicijacije kancerogeneze [106]. NF- $\kappa$ B se aktivira i nakon mutacije *TP53* gena i gubitka funkcije p53 tumor supresora u intestinalnim epitelnim ćelijama. Ova mutacija se javlja u oko 50% humanih kolorektalnih karcinoma i predstavlja važan korak u tranziciji iz benignog adenoma u maligni karcinom. Dok se kod sporadičnih tipova kolorektalnog karcinoma gubitak funkcije p53 dešava u završnim fazama razvoja karcinoma, najčešće nakon mutacija u *APC* tumor-supresornom genu i *KRAS* onkogenu, kod kolorektalnog karcinoma nastalog usled IBC, mutacije u genu za p53 se dešavaju u ranoj fazi tumorigeneze, što dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B, smanjenja barijerne funkcije intestinalnog epitela, pogoršanja inflamacije i daljeg razvoja karcinoma [107].

Molekularni mehanizmi koji povezuju proces inflamacije intestinuma sa kancerogenezom su u velikoj meri razjašnjeni. Pokazano je, međutim, da pacijenti sa PSH i udruženom IBC imaju značajno veći rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma u odnosu na pacijente samo sa IBC, što ukazuje da ovo holestatsko oboljenje jetre doprinosi razvoju kolorektalnog karcinoma nezavisno od inflamacije intestinuma [108]. Žučne kiseline su uključene u intracelularnu signalizaciju procesa od značaja i za holestazu i kolorektalni karcinom, kako direktnim uticajem preko svojih receptora, tako i modulacijom sastava intestinalne mikroflore. Ključni faktor koji povezuje holestazu, inflamaciju creva i karcinom kolona jeste nuklearni receptor za žučne kiseline FXR. Poznato je da se aktivacijom ovog receptora organizam štiti od štetnog uticaja visokih intracelularnih koncentracija žučnih kiselina, jer FXR smanjuje njihovu sintezu u jetri i indukuje detoksikacione i eksport sisteme [109]. FXR je i regulator nespecifičnog intestinalnog imuniteta s obzirom na regulatornu ulogu kod makrofaga, a na taj način utiče i na intestinalnu inflamaciju. Pokazano je da je ćelijska ekspresija FXR veoma niska u delovima kolona zahvaćenim vidljivom inflamacijom kod pacijenata sa Kronovom bolešću [110]. Osim toga, pronađena je veza između gubitka ekspresije FXR i kancerogeneze u jetri i crevima i utvrđeno je da su nuklearni receptori za žučne kiseline, prvenstveno FXR, sniženi u ćelijama kolorektalnog karcinoma [48]. Sve navedeno jasno ukazuje na to da je FXR uključen u patogenetske mehanizme holestaze, inflamatorne bolesti creva i kolorektalnog karcinoma i da predstavlja atraktivnu terapijsku metu za ove bolesti.

Žučne kiseline utiču na inflamaciju intestinuma i razvoj karcinoma kolona i uticajem na sastav crevne mikroflore. Poznato je da žučne kiseline imaju antibakterijsko dejstvo, prvenstveno HDH i DH, i da zahvaljujući tome sprečavaju preveliki razvoj mikroorganizama u lumenu creva i čuvaju integritet intestinalne barijere [111]. Pokazano je da osim što poseduju antimikrobna svojstva *per se*, žučne kiseline aktivacijom FXR receptora u enterocitima regulišu ekspresiju gena čiji su produkti uključeni u odbranu od intestinalnih bakterija. Kod miševa sa inaktiviranim FXR se razvija preveliki broj mikroorganizama u lumenu creva, dolazi do povećanja intestinalne permeabilnosti sa velikom količinom bakterija u mezenteričnim limfnim čvorovima i do intenzivne inflamacije zida creva [112]. Slabljenje intestinalne barijere, koje je karakteristično za pacijente sa holestazom, se stoga može objasniti nedovoljnom aktivacijom FXR u enterocitima zbog male količine žučnih kiselina u lumenu creva. Bakterijska translokacija i spontani bakterijski peritonitis predstavljaju ozbiljnu komplikaciju ciroze jetre. Na modelu opstruktivne holestaze kod pacova, utvrđeno je da indukovanjem holestaze dolazi do smanjenja ekspresije FXR u jejunumu i ileumu i povećanja intestinalne permeabilnosti usled pojačane ekspresije kladina-2, proteina tesne veze koji formira paracelularne kanale. Pokazano je da dolazi i do regrutovanja NK (*natural killer*) ćelija i makrofaga i povećanja ekspresije inflamatornog citokina IFN- $\gamma$ , za koji je poznato da podstiče paracelularni transport dejstvom na proteine tesne veze. Peroralna primena obetiholne kiseline, selektivnog agoniste FXR receptora, imala je za posledicu selektivnu reaktivaciju FXR u ileumu, uspostavljanje normalnog intestinalnog integriteta u ovom delu intestinuma, kao i smanjenje intenziteta bakterijske translokacije. Obetiholna kiselina je ispoljila antiinflamatorni efekat u intestinumu, jer je dovela do smanjenja broja NK ćelija i makrofaga u mezenteričnim limfnim čvorovima i u slezini, što je bilo praćeno smanjenjem nivoa IFN- $\gamma$  [113].

Treba imati u vidu da je i genetska predispozicija značajan faktor koji određuje u kojoj meri će se ispoljiti neželjeni efekti od strane intestinalnog trakta tokom holestaze. Ovo je potvrđeno u studiji na dva soja miševa za koje je poznato da imaju različitu sklonost ka inflamaciji, iako imaju sličnu ekspresiju FXR u tankom crevu. Indukovanjem holestaze podvezivanjem žučovoda kod miševa, došlo je do smanjenja ekspresije okcludina, proteina tesne veze koji sprečava paracelularni transport, i nivo ovog proteina je bio značajno niži kod miševa soja B6 u odnosu na A/J miševе, i pre i nakon indukovanja holestaze. Zbog toga su bakterijska translokacija i mortalitet B6 miševa sa holestazom bili značajno veći u odnosu na A/J miševе. I ova studija je utvrdila da slabljenje intestinalne barijere nastaje delovanjem

IFN- $\gamma$ , u većoj meri kod B6 miševa. Pokazano je i da indukcija holestaze samo kod soja B6 dovodi do izmena u sastavu intestinalne mikroflore, što ukazuje da je podložnost disbiozi kod holestaze takođe genetski uslovljena [114]. Imajući u vidu da je sastav i hidrofилnost pula žučnih kiselina u organizmu direktna posledica aktivnosti intestinalnih bakterija, jasno je da uloge žučnih kiselina u organizmu treba uvek posmatrati i u svetlu potencijalnih interakcija sa mikrobiomom, ali i genetske predodređenosti samog organizma [115].

### 1.2.1. Uloga žučnih kiselina u holestazi

Akumulacija i retencija hidrofobnih žučnih kiselina je konzistentno prisutna tokom holestaze i predstavlja osnovni uzrok oštećenja hepatocita. FXR je glavni regulator homeostaze žučnih kiselina u organizmu u fiziološkim uslovima, ali i najznačajniji medijator protektivnih mehanizama u uslovima povišenih koncentracija žučnih kiselina u organizmu tokom holestaze. Utvrđena je aktivacija i drugih receptora za žučne kiseline u holestazi, koji zajedničkim delovanjem dovode do smanjenja sinteze žučnih kiselina i preuzimanja u ćelije, kao i do indukcije metaboličkih i eksport sistema, što predstavlja adaptivni mehanizam odbrane prvenstveno hepatičnih i intestinalnih ćelija od toksičnih efekata žučnih kiselina.

U uslovima povišenih intrahepatičnih i sistemskih koncentracija žučnih kiselina aktivira se FXR receptor i dovodi do smanjenja biosinteze žučnih kiselina smanjenjem ekspresije CYP7A1 i CYP8B1 enzima, kao i do smanjenja njihovog preuzimanja u hepatocite putem NTCP transportera i povećanja bilijarne ekskrecije putem BSEP i MRP2 transportera. Osim toga, aktivacijom FXR u uslovima holestaze se povećava ekskrecija žučnih kiselina iz hepatocita i preko eksport pumpi na bazolateralnoj membrani (OST $\alpha$ /OST $\beta$ , MRP3 i MRP4), što zajedno sa aktivacijom enzima uključenih u njihovu biotransformaciju (CYP3A4, SULT2A1, UGT2B4) od strane FXR, stimuliše renalnu ekskreciju žučnih kiselina. Osnovni terapijski cilj u holestazi je smanjiti količinu žučnih kiselina u organizmu i povećati hidrofилnost pula žučnih kiselina. Aktivacijom FXR se postižu oba cilja, smanjenjem biosinteze i stimulacijom konjugacije žučnih kiselina [43].

Pored BSEP i MRP2 transportera za žučne kiseline, FXR indukuje aktivnost i MDR3 eksport pumpe za fosfatidilholin na apikalnoj membrani hepatocita, čija zajednička aktivnost ima za posledicu održavanje holesterola u rastvorenom obliku u bilijarnom traktu, formiranjem mešovityh micela sa fosfatidilholinom i žučnim kiselinama. Pokazano je da primena HDH, koji je najsnažniji endogeni agonista humanog FXR receptora, dovodi do



rastvaranja holesterolskih žučnih kamenaca kod ljudi, ali se HDH ipak ne primenjuje, jer je u pitanju hidrofobna žučna kiselina, koja može da indukuje značajnu hepatotoksičnost kod pojedinih pacijenata [116]. Utvrđeno je i da se kod miševa sa inaktiviranim FXR češće razvijaju holesterolski žučni kamenci, kao i da aktivacija FXR specifičnim sintetskim agonistom GW4064, kod miševa koji eksprimiraju FXR, dovodi do povećanja ekspresije BSEP i MDR3 transportera i rastvaranja žučnih kamenaca [117].

Ubrzo nakon otkrića FXR i njegovih fizioloških funkcija u organizmu, kao i nakon sinteze selektivnih agonista za FXR, ispitana je mogućnost aktivacije ovog receptora u cilju terapije holestatskih oboljenja. Primena obetiholne kiseline, polusintetskog derivata HDH sa selektivnim dejstvom prema FXR, i selektivnog sintetskog agoniste nesteroidne strukture GW4064, dovela je do smanjenja oštećenja jetre u životinjskim modelima intrahepatične holestaze indukovane etinil-estradiolom i  $\alpha$ -naftil-izotiocijanatom (ANIT) [118, 119]. Obetiholna kiselina je od nedavno registrovani lek za terapiju primarne bilijarne ciroze, zbog dokazane delotvornosti u terapiji ovog holestatskog oboljenja jetre u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima [14]. Međutim, upotreba UDH, polarne žučne kiseline koja nije agonista FXR, ali koja smanjuje hidrofobnost i toksičnost ukupnog pula žučnih kiselina u organizmu, predstavlja i dalje najznačajniju farmakološku opciju za terapiju holestatskih bolesti [120].

Dok primena agonista za FXR kod intrahepatične holestaze ima višestruku korist i predstavlja ustanovljenu farmakoterapijsku opciju, aktivacija FXR kod ekstrahepatične opstruktivne holestaze ima negativan efekat, jer pojačana ekskrecija žučnih kiselina u blokirani žučni kanal dodatno pogoršava stanje. Ekstrahepatična holestaza nastaje usled opstrukcije žučnog kanala izvan jetre, što je najčešće uzrokovano kamenom u žuči ili tumorom pankreasa, jetre ili žučnih kanala. Utvrđeno je da se kod miševa sa inaktiviranim FXR javlja manje oštećenje jetre nakon indukcije holestaze podvezivanjem žučnog kanala, u odnosu na miševe koji eksprimiraju FXR [121]. Pokazano je, međutim, da selektivna aktivacija FXR receptora u intestinumu ima protektivan efekat i kod opstruktivne holestaze. Ovo je posledica, pre svega, indukcije FGF15/19 peptida u enterocitima i sledstvene inhibicije sinteze žučnih kiselina putem represije *CYP7A1* gena. Osim smanjenja količine i hidrofobnosti pula žučnih kiselina u organizmu, selektivna aktivacija FXR u intestinumu dovodi i do očuvanja integriteta intestinalne mukoze i smanjenja bakterijske translokacije i inflamacije. Pored toga, utvrđeno je da aktivacija intestinalnog FXR receptora može biti efikasna i kod naslednih formi holestatskih oboljenja, jer je primenom transgenih miševa sa konstitutivno aktivnim FXR u intestinumu, pokazano da inaktivacija *Mdr2* transportnog

proteina ne dovodi do značajnog oštećenja jetre. Mdr2 je homolog humanog MDR3 proteina i gubitak funkcije ovog transportera kod ljudi je uzrok retke, ali veoma ozbiljne progresivne nasledne intrahepatične holestaze tipa 3, koja zahteva transplantaciju jetre [122].

Pored FXR, i drugi nuklearni receptori za koji se vezuju žučne kiseline, učestvuju u odbrani hepatocita od štetnog uticaja visokih koncentracija žučnih kiselina tokom holestaze. PXR i CAR indukuju hidroksilaciju i konjugaciju žučnih kiselina, transport nastalih hidrofilijskih i manje toksičnih derivata iz hepatocita u sistemsku cirkulaciju i njihovu dalju renalnu ekskreciju. Pokazano je takođe da aktivacija PXR dovodi i do smanjenja sinteze žučnih kiselina uticajem na ekspresiju CYP7A1 enzima [60]. Rifampicin i kantarion su se godinama empirijski koristili u terapiji holestatskog pruritusa, a danas se zna da su rifampicin i hiperforin iz kantariona agonisti PXR receptora. Pokazano je da primena rifampicina kod ljudi sa holestatskim oboljenjem jetre dovodi do povećanja ekspresije CYP3A4, UGT1A1 i MRP2 u hepatocitima, što je praćeno smanjenjem koncentracije žučnih kiselina i bilirubina u serumu. S druge strane, primena rifampicina nije promenila nivo ekspresije CYP7A1, što ukazuje da PXR nije značajan regulator biosinteze žučnih kiselina kod ljudi [123]. Rezultati ispitivanja uticaja aktivacije CAR na metabolizam žučnih kiselina tokom holestaze nisu konzistentni. Pokazano je, međutim, da iako deli veliki broj funkcija sa PXR, gubitak jednog od ova dva nuklearna receptora ne može da kompenzuje drugi, što ima za posledicu povećanu osetljivost prema toksičnosti žučnih kiselina [61]. Takođe, utvrđeno je da CAR učestvuje u metabolizmu žučnih kiselina i u koordinaciji sa FXR, odnosno da utiče na ekspresiju FXR. Kod miševa sa genetski inaktivisanim CAR, ekspresija FXR je značajno niža u odnosu na genetski neizmenjene miševе [124]. S obzirom na malu ekspresiju VDR u hepatocitima, uloga ovog receptora u holestazi najverovatnije nije značajna, na šta ukazuju i rezultati studije u kojoj aktivacija VDR primenom kalcitriola kod miševa sa indukovanom holestazom nije promenila nivo žučnih kiselina u jetri i serumu [125]. S druge strane, primena kalcitriola kod miševa sa holestazom je smanjila ekspresiju proinflamatornih citokina, što ukazuje na antiinflamatorni efekat aktivacije VDR, što takođe može biti od koristi tokom holestaze [126].

Osim hepatocita, receptori za žučne kiseline štite i holangiocyte od toksičnog dejstva žučnih kiselina tokom holestaze. Holangiociti su epitelne ćelije koje ograničavaju intra- i ekstrahepatične kanale bilijarnog stabla i koje su kontinuirano izložene vrlo visokim, milimolarnim koncentracijama žučnih kiselina. Ove ćelije sekretuju tečnost bogatu bikarbonatima u lumen žučnih kanala, kao odgovor na intestinalne hormone sekretin, vazoaktivni intestinalni peptid i bombezin, a štite se od toksičnog dejstva žučnih kiselina

prevashodno formiranjem sloja mukusa bogatog bikarbonatima na apikalnoj membrani, koji jonizuje žučne kiseline i sprečava njihovu difuziju u ćelije [127].

U uslovima holestaze, dolazi do proliferacije holangiocita, što predstavlja adaptivni mehanizam kako bi se sekrecija žuči održala na prethodnom nivou. Danas je poznato da TGR5 receptor za žučne kiseline stimuliše proliferaciju holangiocita EGFR-zavisnim mehanizmom [79]. Osim povećanja broja holangiocita, žučne kiseline povećavaju i sekretorni kapacitet već postojećih holangiocita. Aktivacija TGR5 u holangiocitima dovodi do stimulacije adenilat ciklaze i povećanja nivoa cAMP, koji dalje aktivira CFTR hloridni kanal [128]. Pored toga, FXR transaktivira receptor za vazoaktivni intestinalni peptid 1 (VPAC1) u holangiocitima, koji dalje posredstvom cAMP takođe stimuliše sekreciju hloridnih jona putem CFTR kanala. Žučne kiseline mogu da aktiviraju sekreciju hlorida i putem kalcijum-zavisnih hloridnih kanala (CaCC), a hloridni joni iz lumena žučnih kanalića se vraćaju u holangiocyte posredstvom antiportera AE2 (*anion exchanger 2*), što dovodi do sekrecije bikarbonata u žučne kanaliće [89].

Iako su mehanizmi oštećenja jetre tokom holestaze multifaktorijalni, kao glavni faktori oštećenja se navode oksidativni stres i inflamacija, koji nastaju i kao direktna posledica akumulacije hidrofobnih žučnih kiselina, ali i usled infiltracije inflamatornih ćelija u jetri [129]. Nedavno je na genetskom modelu holestaze kod *Mdr2<sup>-/-</sup>* miševa pokazano da se paralelno sa porastom koncentracije žučnih kiselina u serumu povećava ekspresija proinflamatornih hemokina *Cxcl1*, *Cxcl2* i *Ccl2* u jetri, koji deluju kao hemotaktički faktor za neutrofile i monocite [130]. Utvrđeno je i da žučne kiseline povećavaju ekspresiju i intercelularnog adhezionog molekula-1 (ICAM-1), koji je odgovoran za ekstravazaciju neutrofila i infiltraciju na mesto inflamacije u jetri. Dokazano je da nivo ekspresije ovog adhezionog molekula, kao i stepen akumulacije neutrofila u jetri, direktno koreliraju sa stepenom holestatskog oštećenja jetre [131].

Hronični oksidativni stres i inflamacija u jetri tokom holestaze mogu dovesti do fibroznih promena. Pokazano je u *in vitro* i *in vivo* modelima da FXR deluje kao negativni modulator inflamatornog procesa u jetri posredovanog transkripcionim faktorom NF- $\kappa$ B, odnosno da sprečava povećanje nivoa inflamatornih citokina i enzima u hepatocitima [132]. Osim toga, FXR utiče i na proces razvoja fibroze jetre, u koordinaciji sa PPAR- $\gamma$  receptorom. Kod hronične inflamacije, stelatne ćelije jetre podležu trans-diferencijaciji i poprimaju fenotip nalik miofibroblastima. Na modelu fibroze jetre kod pacova, utvrđeno je da je proces trans-diferencijacije praćen smanjenjem ekspresije PPAR- $\gamma$ . Primena obetiholne kiseline, kao

snažnog agoniste FXR receptora, dovela je do značajnog povećanja ekspresije PPAR- $\gamma$ , kao i do sniženja nivoa kolagena u jetri [119].

Iako je FXR glavni regulator većine procesa od značaja za terapiju holestaze, i dalje najznačajniju farmakološku opciju za terapiju holestatskih bolesti jetre predstavlja UDH, koja nije agonista FXR. UDH se već godinama koristi za rastvaranje holesterolskih žučnih kamenaca, kao i u terapiji PBC, i utvrđeni su brojni mehanizmi dejstva. Primena UDH kod ljudi, pre svega, povećava polarnost, ali ne i veličinu ukupnog pula žučnih kiselina, jer kompetitivno inhibira reapsorpciju endogenih žučnih kiselina i postaje dominantna žučna kiselina u organizmu. Iako ne aktivira FXR, UDH povećava kanalikularnu ekskreciju žučnih kiselina povećanjem ekspresije BSEP i MRP2 transportera u hepatocitima. Takođe, UDH podstiče sekreciju i u holangiocitima. Pokazano je da UDH stimuliše transport adenozin trifosfata (ATP) iz hepatocita u žuč, gde se vezuje za P2Y<sub>2</sub> purinergične receptore na apikalnoj membrani holangiocita i stimuliše njihovu sekretornu funkciju. Pacijenti sa PBC imaju sniženu ekspresiju AE2 transportera na membrani holangiocita, a terapija ursodiolom dovodi do normalizacije ekspresije AE2 i bilijarne sekrecije bikarbonata. Osim navedenih mehanizama, značajna je i direktna citoprotektivna uloga UDH i prema hepatocitima i holangiocitima, kao i uloga u imunomodulaciji [133].

### 1.2.2. Uloga žučnih kiselina u inflamatornoj bolesti creva

Žučne kiseline mogu da utiču na inflamatorni odgovor u intestinumu ili direktnim dejstvom na intracelularne inflamatorne procese u enterocitima ili nakon interakcije sa mikrobiomom creva. FXR ima centralnu ulogu u regulaciji inflamatornih puteva od strane žučnih kiselina. Poznato je da je ekspresija ovog receptora veoma niska u delovima kolona zahvaćenim vidljivom inflamacijom kod pacijenata sa Kronovom bolešću [110]. Na značaj FXR u regulaciji inflamatornih procesa u enterocitima ukazuju i brojna istraživanja na eksperimentalnim životinjama. Pokazano je da je kod miševa sa genetski inaktiviranim FXR veća ekspresija gena za proinflamatorne citokine u odnosu na miševe koji ekspimiraju FXR. Takođe, koristeći dva eksperimentalna modela IBC kod miševa, indukovana trinitrobenzen-sulfonskom kiselinom (TNBS) i dekstran natrijum sulfatom (DSS), utvrđeno je da primena obetiholne kiseline, kao selektivnog agoniste FXR receptora, dovodi do ublažavanja simptoma kolitisa i smanjenja ekspresije proinflamatornih citokina u homogenatima kolona i izolovanim makrofagima, kod genetski nemođifikovanih miševa, ali ne i kod Fxr<sup>-/-</sup> miševa.

Osim toga, pokazano je da je intestinalna inflamacija u oba modela bila povezana sa smanjenjem ekspresije FXR u kolonu [134]. Ovi rezultati su dobili potvrdu u naknadnim *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* ispitivanjima. Naime, pokazano je da tretman HT-29 ćelijske linije humanih malignih kolonocita obetiholnom kiselinom ima za posledicu aktivaciju FXR i smanjenje ekspresije proinflamatornog citokina IL-1 $\beta$ . Takođe, na modelima hemijski-indukovane IBC kod miševa, primena ovog FXR agoniste je smanjila ekspresiju gena za IL-1 $\beta$ , ali i za IL-6 i monocitni hemoatraktant protein-1 (MCP-1) u kolonu. Ovo je imalo za posledicu poboljšanje simptoma kolitisa, s obzirom da je ublažen gubitak telesne mase životinja i da su smanjeni epitelna permeabilnost, rektalno krvarenje, ulceracije, infiltracija mukoze kolona inflamatornim ćelijama i gubitak peharastih ćelija. Rezultati *ex vivo* studije su pokazali da obetiholna kiselina značajno smanjuje sekreciju proinflamatornog citokina TNF- $\alpha$  u različitim imunološkim ćelijama krvi, kao i u mononuklearnim ćelijama mukoze kolona, izolovanim iz pacijenata obolelih od IBC [110].

Osnovni mehanizam antiinflamatornog dejstva u intestinumu indukovanoj aktivacijom FXR jeste inhibicija funkcije NF- $\kappa$ B. Produžena aktivacija ovog nuklearnog transkripcionog faktora je ključni činilac u patofiziologiji hroničnog kolitisa. Poznato je da aktivacijom NF- $\kappa$ B dolazi do pojačane ekspresije proinflamatornih gena i regrutovanja inflamatornih ćelija u intestinalnu mukozu. NF- $\kappa$ B je heterodimerni protein koji se najčešće sastoji od p65 i p50 subjedinića. U odsustvu aktivirajućih signala, inhibitorni protein I $\kappa$ B $\alpha$  zadržava NF- $\kappa$ B u citosolu. Prisustvo proinflamatornih citokina, poput IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , reaktivnih vrsta kiseonika ili virusnih produkata, inicira fosforilaciju i sledstvenu degradaciju I $\kappa$ B $\alpha$ , što dovodi do translokacije NF- $\kappa$ B iz citosola u nukleus gde direktno reguliše ekspresiju specifičnih ciljnih gena [135]. Na modelu HT-29 ćelijske linije humanog adenokarcinoma kolona, kao i korišćenjem uzoraka ileuma izolovanih iz miševa, utvrđeno je da FXR i proinflamatorni citokini stupaju u kompleksnu interakciju. FXR inhibira inflamaciju smanjenjem ekspresije proinflamatornih citokina, a tretman HT-29 ćelija i intestinalnih *ex vivo* uzoraka proinflamatornim citokinima IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  dovodi do inhibicije transkripcione aktivnosti FXR. Takođe, kod miševa sa IBC koja je indukovana primenom DSS, ekspresija ciljnih gena FXR receptora, FGF15/19 i IBABP, bila je smanjena u ileumu i kolonu. Smanjenje aktivnosti FXR pod uticajem proinflamatornih citokina je posredovana NF- $\kappa$ B transkripcionim faktorom, jer njegova povećana ekspresija takođe dovodi do smanjenja aktivnosti FXR, a utvrđeno je i da obe subjediniće NF- $\kappa$ B, p50 i p65, stupaju u direktnu fizičku interakciju sa FXR. Imajući u vidu interakciju FXR i proinflamatornih citokina posredstvom NF- $\kappa$ B, jasno

je da se može formirati *circulus vitiosus*, u kom smanjena aktivnost FXR dovodi do slabije represije inflamacije, što doprinosi razvoju stanja hronične inflamacije u intestinumu [136].

FXR ima regulatornu ulogu u makrofagima i na taj način modulira aktivnost nespecifičnog intestinalnog imuniteta i utiče na intestinalnu inflamaciju. Aktivacija FXR u intestinalnim makrofagima ima za posledicu smanjenje ekspresije nekoliko proinflamatornih gena (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *COX-1*, *COX-2*), koji su ciljni geni NF- $\kappa$ B transkripcionog faktora. Takođe, aktivacijom FXR u makrofagima dolazi i do smanjenja ekspresije aktivator proteina-1 (AP-1), koji reguliše ekspresiju gena od značaja i za nespecifičan i adaptivni imunološki odgovor organizma [137]. Pokazano je da agonisti FXR ispoljavaju antagonistički efekat i prema STAT3 transkripcionom faktoru. STAT3 dovodi do povećanja ekspresije nekoliko inflamatornih citokina, kao i do stimulacije proliferacije epitelnih ćelija i inhibicije apoptoze, odnosno promoviše tranziciju IBC u karcinom kolona [138].

Svi navedeni rezultati jasno ukazuju da aktivacija FXR u intestinumu predstavlja značajnu farmakološku opciju za terapiju IBC. Međutim, da FXR nije jedini medijator antiinflamatornog dejstva žučnih kiselina u intestinumu, potvrđuju rezultati studija u kojima su korišćene žučne kiseline koje nisu ligandi za FXR, a koje su ipak ostvarile antiinflamatorno dejstvo u modelima IBC kod eksperimentalnih životinja.

UDH je hidrofilna žučna kiselina sa utvrđenim antioksidativnim i antiinflamatornim efektima, a koja se ne veže za FXR receptor u organizmu. Na modelu TNBS-indukovanog kolitisa kod pacova, koji u pogledu patohistoloških i imunoloških karakteristika najbolje reprezentuje Kronovu bolest, pokazano je da UDH smanjuje aktivnost NF- $\kappa$ B, a time i nivo IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u kolonu. Ovo je bilo praćeno smanjenjem intenziteta lipidne peroksidacije u kolonu, kao i smanjenjem aktivnosti enzima mijeloperoksidaze, koja je pokazatelj infiltracije intestinalne mukoze neutrofilima [139]. Pokazano je takođe da primena UDH može da smanji intestinalnu permeabilnost i oksidativni stres u modelu ileitisa indukovano indometacinom kod pacova [140].

Ispitivani su antiinflamatorni efekti i taurohioideoksiholne kiseline, hidrofilne žučne kiseline sa karakterističnom hidroksilnom grupom u položaju C6, na modelu kolitisa izazvanog primenom TNBS kod miševa. Taurohioideoksiholna kiselina je glavna komponenta leka *Pulvis Fellis Suis*, koji predstavlja izolovanu, prečišćenu i osušenu žuč jedne vrste svinja, a koja se u tradicionalnoj kineskoj medicini koristi u terapiji različitih hepatobilijarnih i digestivnih oboljenja. Primena ove hidrofilne žučne kiseline je dovela do smanjenja intestinalne infiltracije kolona neutrofilima, smanjenja ekspresije COX-2 enzima koji sintetiše

medijatore inflamacije prostaglandine u kolonu, kao i do smanjenja serumskih koncentracija proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 [141]. Utvrđeno je da taurohiodeoksiholna kiselina nije ligand za FXR, ali da je slab agonista TGR5 receptora [142], za koji je pokazano da može da smanji gastričnu inflamaciju inhibicijom proinflammatoryh NF- $\kappa$ B signalnog puta [76]. Na Caco-2 humanim epitelnim ćelijama kolorektalnog karcinoma je utvrđeno da aktivacija i VDR receptora može da spreči povećanje intestinalne permeabilnosti indukovano primenom TNF- $\alpha$ , mehanizmom koji uključuje inhibiciju aktivnosti NF- $\kappa$ B i sledstveno smanjenje ekspresije MLCK enzima i fosforilaciju lakih lanaca miozina [143].

Osim uticaja na intracelularne inflamatorne signalne puteve posredstvom receptora za koje se vežu, žučne kiseline mogu da modulišu intestinalnu mikrofloru i na taj način da utiču na inflamatorni i imunološki odgovor organizma. Žučne kiseline i mikrobiom su u bliskoj interakciji. Dok su intestinalne bakterije zadužene za metabolizam žučnih kiselina sintetisanih u jetri, same žučne kiseline imaju baktericidno dejstvo i sprečavaju prekomeran rast bakterija u intestinumu, čime održavaju integritet intestinalne barijere i sprečavaju bakterijsku translokaciju i inflamatorni odgovor [144]. Utvrđeno je da peroralna primena konjugovanih žučnih kiselina kod pacova sa cirozom jetre i razvijenim ascitesom dovodi do inhibicije bakterijskog rasta u intestinumu, sprečavanja bakterijske translokacije i endotoksemije, kao i do produženog preživljavanja [145]. Pokazano je da osim direktnog antimikrobnog delovanja, žučne kiseline aktivacijom FXR receptora stimulišu antibakterijsku zaštitu enterocita. Primena GW4064, snažnog sintetskog agoniste FXR receptora, povećala je kod miševa ekspresiju gena koji kodiraju inducibilnu NO sintetazu (iNOS), angiogenin 1 (ANG1) i karboanhidrazu 12 (CAR12) [112]. Ovi geni su uključeni u mehanizme antimikrobne zaštite intestinuma. Aktivacija FXR dovodi do povećanja sinteze azot oksida (NO), koji ima značajnu ulogu u nespecifičnom imunološkom odgovoru, uključujući proces sekrecije mukusa, održavanja vaskularnog tonusa i barijerne funkcije intestinalnog epitela. Angiogenin učestvuje u akutnoj fazi odgovora na infekciju i ima snažno antibakterijsko i antimikotično dejstvo. Karboanhidraza, sa druge strane, učestvuje u antibakterijskoj zaštiti intestinuma održavanjem odgovarajuće intestinalne pH vrednosti i jonskog balansa, što je značajno za homeostazu intestinalne mikroflora i integritet epitelne barijere [146].

Aktivacijom FXR receptora u intestinumu se može postići terapijska korist kod pacijenata sa IBC pre svega inhibicijom NF- $\kappa$ B signalnog puta, ali se intenzivno ispituje mogućnost upotrebe agonista FXR receptora i u modulaciji mikrobioma, koji bi doprineo enteroprotekciji. NF- $\kappa$ B je uključen u aktivaciju signalnih puteva za preživljavanje, i njegova

perzistentna aktivacija u ćelijama kolona, pored toga što dovodi do kolitisa, može da indukuje i razvoj karcinoma kolona. Dokazano je da produžena izloženost epitela kolona subletalnim koncentracijama žučnih kiselina, pre svega DH, može da dovede do aktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta i sticanja rezistencije na apoptozu, što dalje doprinosi progresiji tumora [147]. Stoga bi primena selektivnih agonista FXR mogla predstavljati značajnu farmakološku opciju za terapiju IBC, ali i za hemoprevenciju karcinoma kolona u budućnosti.

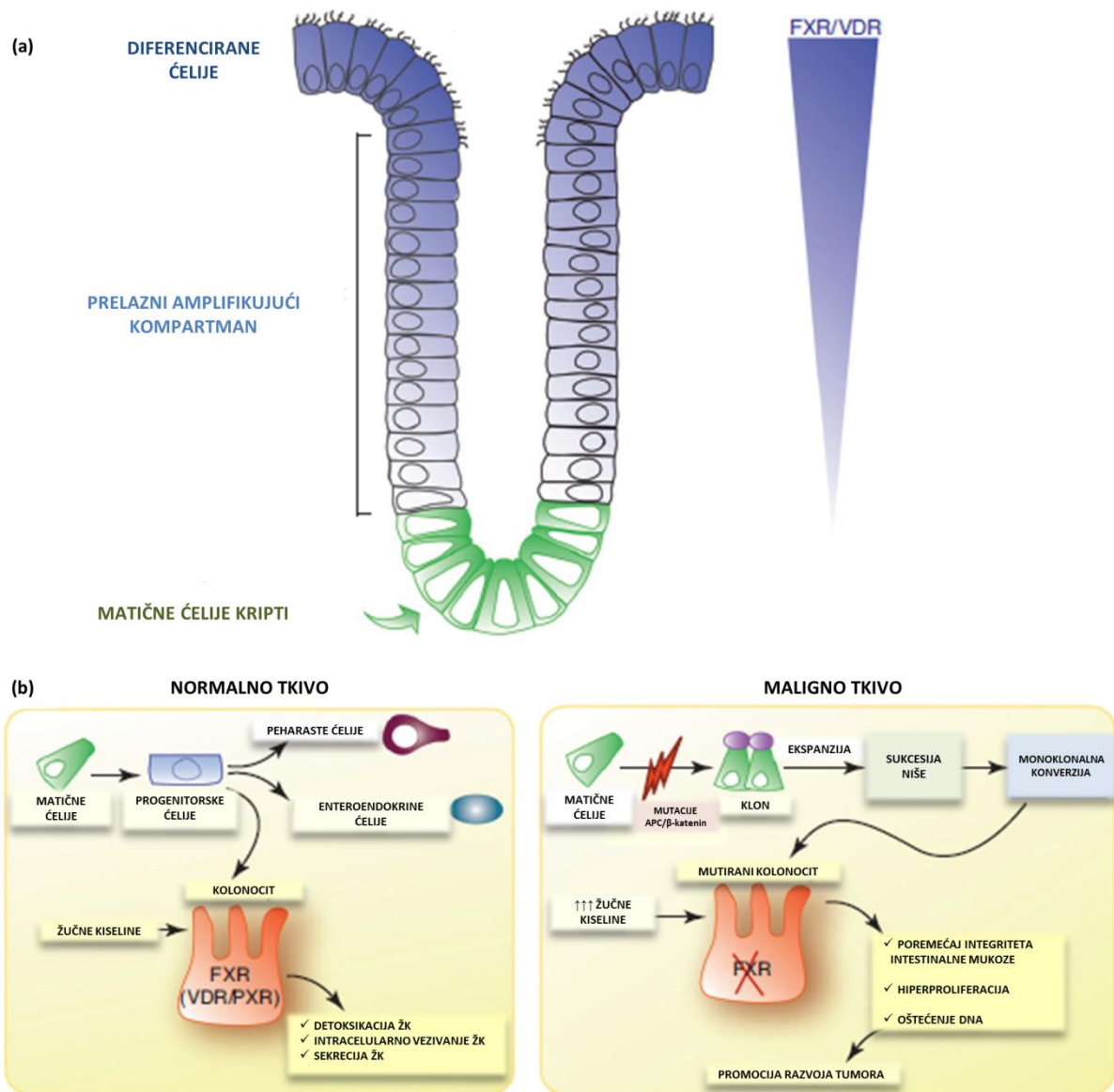
### 1.2.3. Uloga žučnih kiselina u razvoju karcinoma kolona

Brojne epidemiološke studije su potvrdile povezanost žučnih kiselina i razvoja karcinoma kolona. Pokazano je da su kod pacijenata sa adenomima i karcinomima kolona povišene koncentracije DH i LH, kao sekundarnih žučnih kiselina, u sistemske cirkulaciji i u lumenu kolona [7]. Poznato je, takođe, da je holecistektomija, koja dovodi do povećane izloženosti intestinuma žučnim kiselinama, predisponirajući faktor za razvoj kolorektalnog karcinoma [148]. Imajući u vidu povezanost visokih nivoa žučnih kiselina u lumenu creva i razvoja karcinoma kolona, posledice produženog izlaganja intestinalne mukoze žučnim kiselinama su intenzivno ispitivane. Utvrđeno je da hidrofobnost predstavlja glavnu determinantu toksičnosti žučnih kiselina i da zavisi od broja, pozicije i orijentacije hidroksilnih grupa, kao i od konjugacije sa glicinom ili taurinom. UDH je najhidrofilnija prirodna žučna kiselina, dok su DH i LH najmanje polarne, a time i najtoksičnije prirodne žučne kiseline, koje mogu da doprinesu razvoju kolorektalnog karcinoma [149].

Patogeneza kolorektalnog karcinoma je dugotrajan progresivni proces, koji uključuje postupnu akumulaciju genetskih i epigenetskih alteracija, često praćenu disbalansom crevne mikroflore, što dovodi do transformacije normalne mukoze kolona u invazivni karcinom. Specifičnosti razvoja karcinoma kolona su posledica karakteristične morfologije intestinuma. Intestinalni epitel predstavlja prvu liniju odbrane od patogena i drugih štetnih faktora i ispoljava niz fizioloških funkcija, prvenstveno digestivnu i apsorptivnu. Histološki mukoza intestinalnog trakta čini jednoslojni cilindrični epitel. Intestinalni epitel formira niz prstolikih invaginacija ili kriпти i protruzija, odnosno vilusa. Pluripotentne matične (*stem*) ćelije se nalaze na dnu kriпти i svojom proliferacijom i diferencijacijom obezbeđuju stalno obnavljanje intestinalne mukoze. Ćelije migriraju iz kriпти prema vrhu vilusa i na tom putu se diferenciraju da bi kad dostignu odgovarajuću lokalizaciju ostvarili i svoje finalne molekularne i fiziološke karakteristike. Intestinalni epitel sadrži četiri tipa terminalno diferenciranih ćelija:



apsorptivne ćelije, enteroendokrine ćelije, koje sekretuju različite intestinalne hormone, peharaste ili Gobletove ćelije, koje luče mukus, i Panetove ćelije, koje sekretuju antibakterijske proteine (Slika 1.4.) [150].



**Slika 1.4.** Shematski prikaz arhitekture kripti kolona (a) i uloga nuklearnih receptora za žučne kiseline u normalnim i malignim kolonocitima u razvoju karcinoma kolona (b) [149]

Sve ćelije intestinalnog trakta, dakle, potiču od iste populacije matičnih ćelija. Matične ćelije intestinalnog trakta smještene su, kao i ostale matične ćelije, unutar niša koje sadrže različite ćelijske tipove, ekstracelularni matriks i faktore rasta. Niše predstavljaju jedinstvenu mikrosredinu, koje s jedne strane omogućavaju očuvanje multipotentnosti matičnih ćelija, a sa druge strane njihovu diferencijaciju u progenitorske ćelije. Na svakih 3-5 dana intestinalne epitelne ćelije se zamjenjuju novim, tako što stare fiziološki podležu procesu programirane

ćelijske smrti, odnosno apoptoze, i bivaju otpuštene u lumen creva. Glavni regulator diferencijacije intestinalnih ćelija u organizmu je CDX2 transkripcioni faktor. Regulatorni mehanizmi usaglašavanja procesa proliferacije, migracije, diferencijacije i apoptoze ćelija u intestinumu nisu u potpunosti razjašnjeni [151].

Nekoliko signalnih puteva je od ključnog značaja u regulaciji intestinalne homeostaze, od kojih je najznačajniji Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put. Žučne kiseline mogu da moduliraju različite procese od značaja za razvoj karcinoma kolona. Utvrđeno je da žučne kiseline mogu da utiču na proces apoptoze ćelija intestinuma, da promovišu proliferaciju epitela kolona, moduliraju inflamatorne puteve u ćeliji, iniciraju oksidativno oštećenje DNA ili dovedu do poremećaja mitotske aktivnosti ćelija. Osim toga, interakcije žučnih kiselina i intestinalnog mikrobioma mogu značajno da izmene funkciju gastrointestinalnog trakta i da učestvuju u patogenezi karcinoma kolona [152].

Različite žučne kiseline nisu u istoj meri uključene u procese apoptoze, ćelijske proliferacije i razvoja karcinoma. Apoptoza i proliferacija su veoma povezani procesi i, zapravo, ravnoteža između ova dva ćelijska procesa određuje homeostazu tkiva. Sposobnost indukovanja apoptoze direktno zavisi od hidrofobnosti, ali i od koncentracije žučnih kiselina. Dok su hidrofobne žučne kiseline, poput DH i HDH, dobro poznati induktori apoptoze i oštećenja ćelija, hidrofilna UDH ima citoprotektivno dejstvo, zbog čega se i koristi u terapiji holestatskih oboljenja jetre. Pod fiziološkim uslovima, koncentracije žučnih kiselina u kolonu su dosta niže u odnosu na one u žučnoj kesi (~300 mM) ili tankom crevu (~10 mM), ali kod ljudi sa visokim unosom hrane bogate mastima, one mogu da dostignu vrednost oko 1 mM, od čega oko 700-800  $\mu$ M čini veoma citotoksična DH [23].

Opisana su dva različita mehanizma kojima hidrofobne žučne kiseline ostvaruju svoj citotoksični efekat. Visoke koncentracije žučnih kiselina nespecifično oštećuju ćelijske membrane zahvaljujući svojim deterdžentnim svojstvima i dovode do ćelijske smrti, najčešće nekroze. U nižim koncentracijama, žučne kiseline mogu da indukuju ćelijsku smrt i specifično, putem receptora. Češći je unutrašnji put indukcije apoptoze, jer hidrofobne žučne kiseline lako ulaze u unutrašnjost ćelije pasivnom difuzijom i dovode do generisanja ROS. Oksidativni stres ćelije indukuje stvaranje pora u mitohondrijalnoj membrani, oslobađanje citohroma c i dalje reakcije kaspaza koje dovode, konačno, do apoptoze ćelije. Alternativno, žučne kiseline mogu da indukuju apoptozu i spoljašnjim putem, uglavnom preko CD95/Fas i TRAIL-R2 receptora. Hidrofobne žučne kiseline, poput DH, mogu i u nižim koncentracijama da ispolje efekat na ćelijskoj membrani, tako što indukuju agregaciju holesterola i

fosforilaciju kaveolina-1, što dovodi do aberantne signalizacije EGFR, indukujući dalju aktivaciju MAPK signalnih puteva, kao i NF- $\kappa$ B i kaspaze-8 [153]. Utvrđeno je, takođe, da žučne kiseline mogu da dovedu do oslobađanja kalcijuma iz endoplazmatskog retikuluma (ER), povećanja aktivnosti kalpaina i kaspaze-12, odnosno da indukuju apoptozu kod hepatocita putem stresa ER. Hidrofilne žučne kiseline, od kojih je najznačajnija UDH, sa druge strane, mogu da indukuju signalne puteve za preživljavanje ćelije i, na taj način, da ostvare svoje citoprotektivno dejstvo. Ovi signalni putevi su se razvili da bi zaštitili ćelije od patološke apoptoze i uključuju NF- $\kappa$ B, PI3K i MAPK signalne puteve. Stimulusi za preživljavanje indukuju ove intracelularne signalne puteve uglavnom preko aktivacije transmembranskih receptora. UDH ostvaruje svoje citoprotektivne i antiapoptotske efekte tako što sprečava stvaranje ROS i translokaciju proapoptotskog proteina BAX iz citosola na mitohondrijalnu membranu [154].

Utvrđeno je da dugotrajna izloženost enterocita subletalnim koncentracijama žučnih kiselina dovodi do rezistencije na apoptozu, koja dalje doprinosi kancerogenezi u kolonu [155]. Takođe, dokazani su hiperproliferativni efekti DH na različitim ćelijskim linijama karcinoma kolona [156]. Značajan uticaj povišenih koncentracija hidrofobnih žučnih kiselina u lumenu intestinuma ogleda se i u indukciji proliferacije epitela kolona, posredovanog aktivacijom EGFR i nizvodnom aktivacijom protein kinaze C (PKC). Perturbacije na nivou ćelijske membrane, posredovane izlaganjem epitelnih ćelija kolona visokim koncentracijama DH, rezultat su kombinacije različitih faktora, uključujući smanjenu fluidnost membrane, alterisanu distribuciju holesterola u mikrodomenima membrane, kao i hemijskim osobinama žučnih kiselina. Osim što aktivira NF- $\kappa$ B, DH u epitelnim ćelijama kolona dovodi do aktivacije AP-1, kao posledica stimulacije PKC. Utvrđeno je da UDH ostvaruje suprotan efekat u odnosu na DH [149].

Žučne kiseline su uključene i u druge signalne puteve koji regulišu ćelijski ciklus i doprinose razvoju ili regresiji maligniteta. Značajan je uticaj žučnih kiselina na proces inflamacije, pre svega dejstvom na NF- $\kappa$ B signalni put, kao i modulacijom metabolizma prostaglandina. Brojne studije su dokazale povišen nivo prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) u kolorektalnim adenomima i karcinomima, što ukazuje na važnu ulogu ovog jedinjenja u kancerogenezi kolona. Najpre je pokazano da hidrofobne žučne kiseline DH i HDH mogu da indukuju ekspresiju gena za COX-2, stimulišući sintezu prostaglandina [157]. Za nekonjugovanu HDH je takođe *in vitro*, na ćelijskoj liniji humanog kolorektalnog karcinoma HT-29, pokazano da dovodi do snažne supresije transkripcije gena za 15-

hidroksiprostaglandin dehidrogenaze (PGDH), ključnog enzima u katabolizmu prostaglandina [158]. Ekspresija PGDH je značajno smanjena u brojnim tumorima, uključujući i kolorektalni karcinom, a mehanizam uključen u ove procese je aktivacija osovine PKC – ERK1/2 – Egr-1 – Snail, i konačno PGDH. Navedeni podaci ukazuju na direktnu povezanost povišenih nivoa hidrofobne žučne kiseline HDH i kancerogeneze u gastrointestinalnom traktu. UDH, sa druge strane, ublažava inflamatorne procese, pre svega kroz supresiju ekspresije COX-2, što je dokazano *in vitro* na HT-29 ćelijama [159], kao i na azoksimetan eksperimentalnom modelu karcinoma kolona kod pacova [160].

Hidrofobne žučne kiseline dovode do generisanja ROS u ćelijama i, osim što mogu da indukuju unutrašnji put apoptoze, mogu da dovedu i do poremećaja u mitotskoj aktivnosti ćelija. Žučne kiseline mogu da indukuju genomsku i hromozomsku nestabilnost u epitelnim ćelijama kolona, koje su karakteristične za kolorektalni karcinom, putem nekoliko mehanizama. Pokazano je da žučne kiseline mogu da dovedu do aneuploidije, odnosno da spreče razdvajanje hromozoma tokom mitoze. Takođe, mogu da dovedu do oksidativnog oštećenja DNA i zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 i/ili G2 fazi, ali i do nepravilnog postavljanja hromozoma u ekvatorijalnu ravan ćelije tokom metafaze i do pojave multipolarnih deoba usled aberantnog broja centriola [161].

Opšte je prihvaćeno da žučne kiseline deluju kao promoteri, ali ne i kao karcinogeni, kod ljudi. S obzirom na citotoksičnost žučnih kiselina i uticaj na razvoj karcinoma, stroga kontrola njihovih intracelularnih i sistemskih, serumskih koncentracija pod normalnim uslovima se postiže mrežom puteva nuklearnih receptora za koje se vežu. Nedavnim studijama je utvrđeno da je ekspresija nuklearnih receptora za koje se vežu žučne kiseline, prvenstveno FXR, snižena u ćelijama karcinoma kolona. Stoga su danas aktuelne terapijske strategije koje imaju za cilj reaktivaciju FXR u ćelijama karcinoma kolona. U fiziološkim uslovima, FXR je eksprimiran isključivo u potpuno diferenciranim ćelijama intestinalnog epitela, pre svega ileuma i kolona, i sa smanjenjem stepena diferencijacije smanjuje se i ekspresija ovog nuklearnog receptora. Utvrđeno je i da je CDX2 transkripcioni faktor, koji reguliše diferencijaciju intestinalnih ćelija u organizmu, neophodan za adekvatnu ekspresiju FXR u intestinumu [162]. Pronađena je veza i između gubitka ekspresije FXR i kancerogeneze u jetri i intestinumu [48]. Nivo ekspresije FXR je u negativnoj korelaciji sa stepenom maligniteta, a u pozitivnoj korelaciji sa povoljnim kliničkim ishodom [163].

Ekperimentima sa FXR-deficijentnim miševima je pokazano da nedostatak FXR pogoršava i hepatičnu i intestinalnu inflamaciju, kao i da promovise kancerogenezu u

gastrointestinumu [164]. Dok sniženje nivoa FXR u ćelijama doprinosi razvoju tumora, aktivacija ovog receptora u ćelijama karcinoma kolona dovodi do supresije proliferacije ovih ćelija i indukcije apoptoze [165]. Gubitak funkcije FXR kod miševa ima za posledicu povećanu podložnost hemijski-indukovanoj kancerogenezi u kolonu, dok je kod transgenih miševa sa konstitutivnom aktivnošću FXR u intestinumu smanjen rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma, kao i sam tumorski rast [166]. Nedavno je utvrđeno da je inaktivacija *APC* gena, koja je prisutna u najvećem broju tipova karcinoma kolona, praćena smanjenom ekspresijom FXR, i da je to najverovatnije posledica metilacije promotera *FXR* gena, što dalje sprečava transaktivaciju ciljnih gena FXR receptora i dovodi do povećanja ekspresije gena za COX-2 [167]. Metilacija promotera *FXR* gena je utvrđena i u različitim ćelijskim linijama karcinoma kolona, kao i u kliničkim uzorcima tumora kolona [163].

I drugi nuklearni receptori za žučne kiseline imaju ulogu u procesu kancerogeneze kolona. Poznato je da vitamin D i njegovi analozi imaju protektivno dejstvo prema inicijaciji i progresiji tumora, što je potvrđeno u različitim *in vivo* životinjskim modelima kancerogeneze. *In vitro* i *in vivo* studijama su dokazani antiproliferativni efekti vitamina D, a identifikovani su brojni ciljni geni, kao što su regulatori ćelijskog ciklusa p21 i p27 i regulatori apoptoze BAX i BCL-2 [168]. Danas je poznato da i PXR ima ulogu u kancerogenezi. Pokazano je da se aktivacijom PXR, ćelije karcinoma kolona HCT-116 štite od apoptoze indukovane od strane DH i citotoksičnog leka doksorubicina, kroz molekularne mehanizme koji uključuju indukciju antiapoptotskih gena *BIRC2* i *MCL1*, kao i inhibiciju proapoptotskih gena *BAK1* i *TP53* [169]. Iako veliki broj studija označava PXR receptor kao protumorigeni faktor, utvrđeno je da transfekcija PXR u HT-29 ćelije karcinoma kolona ima za posledicu supresiju proliferacije, kao i smanjeni tumorski rast na modelu HT-29 ksenografta kod miševa. Ovo je ostvareno kroz regulaciju ćelijskog ciklusa uticajem na p21 i signalni put koji uključuje transkripcioni faktor E2F i tumor supresor Rb [170].

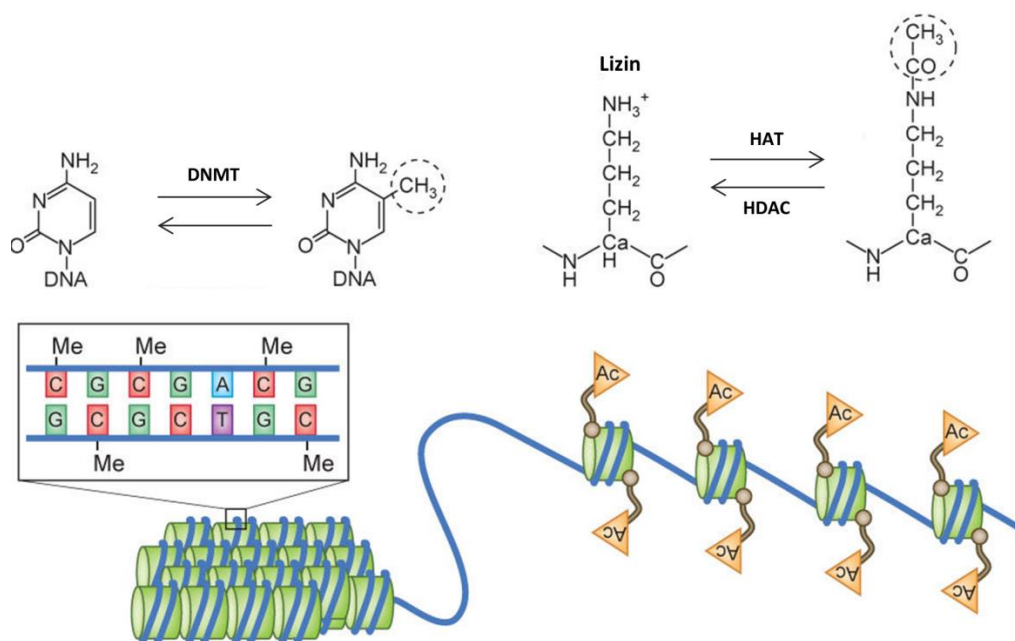
Žučne kiseline mogu da učestvuju u patogenezi karcinoma kolona i kroz interakciju sa intestinalnim mikrobiomom. Pokazano je da miševi, koji se odgajaju u sterilnim uslovima ili su tretirani antibioticima, imaju niže koncentracije toksičnih, sekundarnih žučnih kiselina u fecesu i više sistemske koncentracije konjugovanih žučnih kiselina u odnosu na miševe sa očuvanom intestinalnom mikroflorom [171]. Utvrđena je veza između mikrobioma i razvoja karcinoma kolona. Poznato je da je maligna transformacija najučestalija u distalnim delovima intestinuma gde je najveći broj intestinalnih bakterija, kao i da kancerogeneza kod eksperimentalnih životinja zavisi od prisustva mikroorganizama u lumenu creva [172]. Iako je

uložen veliki napor naučnika da se identifikuje pojedinačni mikroorganizam koji je uzročnik kancerogeneze u kolonu, poput bakterije *Helicobacter pylori* u želucu, do danas je dokazano da je karcinom kolona povezan sa promenom mikrobioma u smislu povećanja i smanjenja određenih bakterijskih vrsta, kao i sa promenom nivoa određenih bakterijskih metabolita. Tako su, na primer, azotna jedinjenja kao produkti metabolizma intestinalnih bakterija, konzistentno povišeni kod karcinoma kolona, dok je nivo kratkolančanih masnih kiselina, pre svega butirata, najčešće snižen. Promenjen sastav intestinalne mikroflore i njihovih metabolita stvara mikroklimu koja promovise inflamaciju, proliferaciju i neoplastičnu transformaciju [173]. Utvrđena je povezanost prekomernog unosa masti sa razvojem kolorektalnog karcinoma, koja se objašnjava pre svega pojačanim lučenjem žuči i visokim koncentracijama sekundarnih žučnih kiselina u kolonu. Pokazano je da promena načina ishrane sa niskog na visok unos masti kod pacova ima za posledicu promenu sastava intestinalne mikroflore u smislu povećanja odnosa tipa bakterija *Firmicutes* prema tipu *Bacteroidetes*, što je predisponirajući faktor za razvoj inflamacije kolona i sledstvene kancerogeneze [174].

### 1.3. Epigenetski aspekti kancerogeneze

Pored genskih alteracija, aberantna epigenetska regulacija ekspresije gena takođe ima značajnu ulogu u razvoju mnogih bolesti, uključujući i maligna oboljenja [175]. Epigenetika podrazumeva sve promene u genskoj ekspresiji, nezavisne od promena redosleda nukleotida u genomu, koje dovode do stabilnog i naslednog fenotipa. Epigenetika se, generalno, odnosi na sve što je povezano sa hromatinom, njegovom strukturom, biohemijom i funkcijom. Hromatin je kompleks DNA i histona, baznih proteina male molekulske mase, a nukleozom je osnovna strukturna jedinica hromatina koja se ponavlja. Svaki nukleozom sadrži oktamer histona H2a, H2b, H3 i H4, koji formiraju globularno jezgro oko kojeg je obmotano 146 baznih parova DNA. Internukleozomalne interakcije doprinose daljem pakovanju nuklearne DNA u hromatinska vlakna [176].

Dva osnovna epigenetska mehanizma, metilacija DNA i modifikacija histona (najčešće acetilacija i metilacija), iniciraju stabilne, klonalno proliferišuće promene genske ekspresije, koje kao molekularni medijatori mogu da iniciraju razvoj brojnih bolesti, uključujući i karcinome. Za razliku od mutacija i drugih strukturnih alteracija DNA, epigenetske modifikacije su kontrolisani reverzibilni procesi. Metilacija DNA i modifikacija histona deluju sinergistički u cilju regulisanja strukture hromatina i precizne kontrole ekspresije gena neophodnih za značajne fiziološke procese u ćeliji. Konkretno, ova dva epigenetska mehanizma, regulišući pristup ukupnog transkripcionog aparata ciljnim genima, moduliraju prelazak euhromatina u heterohromatin i obrnuto (Slika 1.5.) [177].



**Slika 1.5.** Shematski prikaz metilacije DNA i acetilacije histona [178]

Metilacija DNA predstavlja kovalentnu modifikaciju citozina u sastavu CpG dinukleotida, što menja interakcije između histona i DNA. Formiranje metil-CpG je katalisano enzimima DNA metiltransferazama (DNMT) koje prenose metil grupu sa S-adenozil-L-metionina (SAM) na ugljenikov atom u položaju 5' citozina. Kod zrelih ćelija sisara oko 40% CpG mesta je metilovano, ali postoje određena mesta nazvana CpG ostrva koja su bogata GC nukleotidima, ali nisu metilovana. Ova nemetilovana mesta se nalaze u promoterima većine gena sisara i, generalno, pojačana metilacija DNA u ovim promoterskim regijama uzrokuje utišavanje gena koje se prenosi na druge ćelije tokom mitoze, što obezbeđuje klonalno nasleđivanje [179].

Utvrđeno je da je aberantna ekspresija gena, kao posledica alteracija u procesu metilacije DNA, povezana sa malignom transformacijom ćelija, i to je bila prva ustanovljena veza između epigenetskih procesa u ćeliji i razvoja bolesti [180]. Obrazac metilacije DNA u malignim ćelijama je najčešće izmenjen tako da se odlikuje generalnom hipometilacijom genoma, ali i regionalnom hipermetilacijom CpG ostrva. Hipometilacija se dešava u fazi progresije tumora i povezana je sa genomskom nestabilnošću, uključujući i moguću aktivaciju onkogena, dok hipermetilacija CpG ostrva često dovodi do aberantnog utišavanja tumor-supresornih gena i predstavlja rani proces u razvoju tumora. Stoga je farmakološka inhibicija metilacije DNA u ranoj fazi razvoja karcinoma cilj brojnih istraživanja, jer ona dovodi do re-ekspresije tumor-supresornih gena, što na kraju sprečava proliferaciju ćelija i uzrokuje regresiju tumora. Dva inhibitora DNMT su odobrena do sad za kliničku primenu, konkretno za terapiju mijelodisplastičnog sindroma, i to su 5-azacitidin i 2'-deoksi-5-azacitidin [181].

Modifikacija histona je, uz metilaciju DNA, osnovni epigenetski mehanizam regulacije genske ekspresije. Dostupnost DNA za transkripciju gena je regulisana promenama u hromatinskoj strukturi. Kondenzovani hromatin, u kom su nukleozomi tesno vezani, nije lako dostupan celokupnom transkripcionom aparatu. Acetilacija  $\epsilon$ -amino grupa u ostacima lizina u molekulima histona, dejstvom enzima histon acetiltransferaza (HAT), predstavlja najvažniju post-translacionu modifikaciju, koja dovodi do neutralizacije pozitivnog naelektrisanja histona. Ova kovalentna promena histona slabi njihovu interakciju sa negativno naelektrisanom DNA i dovodi do stvaranja otvorenije hromatinske strukture. Nasuprot tome, kada se acetil grupe uklanjaju sa molekula histona dejstvom enzima histon deacetilaza (HDAC), hromatin je tesno pakovan, teško je dostupan transkripcionim faktorima i dolazi do utišavanja gena. Pored toga, modifikovane rezidue lizina mogu da deluju i kao mesta vezivanja transkripcionih faktora i drugih hromatin-modifikujućih proteina. Osim acetilacije,



histoni su podložni i modifikacijama kroz reakcije metilacije, fosforilacije, ubikvitinacije, sumoilacije, ADP-ribozilacije, glikozilacije, biotinilacije i karbonilacije [182].

Hipoacetilacija histona je karakteristika većine tumora i to najčešće kao posledica povećane ekspresije HDAC proteina. Smanjena acetilacija histona u promoterskim regijama određenih tumor-supresornih gena dovodi do njihovog utišavanja što doprinosi razvoju tumora. Geni koji su uključeni u regulaciju ćelijskog rasta, a za koje je poznato da mogu biti utišani kroz HDAC-posredovane epigenetske mehanizme, su između ostalih p21, p27, p16 i p19. Iako su acetilovani histoni prvi identifikovani kao supstrat HDAC enzimima, danas je poznato da HDAC enzimi deluju i na druge proteine jedra i citoplazme sa značajnim biološkim funkcijama, a čija funkcija je regulisana kroz proces acetilacije. Neki od tih proteina su tumor supresor p53,  $\alpha$ -tubulin, *heat-shock* protein 90 (Hsp90), NF- $\kappa$ B, kao i određene kinaze. Na osnovu svega navedenog, jasno je da je ciljana inhibicija aktivnosti HDAC od velikog farmakološkog značaja u terapiji malignih bolesti [183].

U procesu kancerogeneze u kolonu, dešavaju se brojne epigenetske modifikacije u ćelijama koje podležu malignoj transformaciji. Utvrđeno je da se kolorektalni karcinom odlikuje aberantnom metilacijom DNA, izmenama u acetilaciji i metilaciji histona, kao i izmenjenom ekspresijom nekodirajućih mikroRNA (miRNA), koje takođe predstavljaju značajan epigenetski mehanizam modulacije ekspresije gena u ćeliji. Navedene epigenetske modifikacije utiču na svaki aspekt razvoja tumora, od inicijacije do metastaziranja. Geni koji su inaktivirani metilacijom CpG ostrva u promoterima kod kolorektalnog karcinoma obuhvataju *APC*, kadherin-1 (*CDH1*), *MLH1*, *RUNX3*, O-6-metilgvanin-DNA-metiltransferazu (*MGMT*), inhibitor ciklin-zavisne kinaze 2A (*CDKN2A*) i *RASSF1A*. Hipermetilacija promotera *APC* gena je u korelaciji sa razvojem metastaza kolorektalnog karcinoma, a hipermetilacija promotera *MLH1* gena, koji je od izuzetnog značaja za proces reparacije DNA, je često udružena sa tipovima karcinoma kolona koji se odlikuju mikrosatelitnom nestabilnošću [184].

Uticao acetilacija histona na razvoj karcinoma kolona se uočava prevashodno kroz povećanu ekspresiju HDAC enzima u ćelijama. Najznačajnija HDAC u patogenezi karcinoma kolona je HDAC2, ali je pokazano u različitim ćelijskim linijama karcinoma kolona da može da bude povećana ekspresija i HDAC1, HDAC3, HDAC5 i HDAC7. Ovi enzimi dovode, između ostalog, i do supresije *CDX1* gena, koji deluje kao tumor supresor u Wnt signalnoj kaskadi u enterocitima [185]. Dokazana je povećana ekspresija i histon demetilaza u karcinomu kolona, pre svega lizin-specifične demetilaze 1 (LSD1). Ovaj enzim potencira

proliferaciju, invazivnost i metastaziranje ćelija karcinoma kolona, a pokazano je i da direktno interaguje sa p53 i DNMT1 enzimom, što takođe doprinosi neoplastičnij transformaciji [186].

U kolorektalnom karcinomu je utvrđena i aberantna ekspresija miRNA. Ove kratke endogene nekodirajuće RNA post-transkripciono regulišu ekspresiju gena tako što se vežu za komplementarno mesto u 3' regionu ciljane mRNA i formiraju inhibitorni kompleks. U zavisnosti od gena koje regulišu, miRNA mogu ispoljiti i onkogeno i tumor-supresorno dejstvo kod karcinoma kolona. Do danas je utvrđeno nekoliko miRNA koje su u vezi sa razvojem kolorektalnog karcinoma i koje mogu služiti i kao novi biomarkeri stepena uznapredovalosti bolesti i uspešnosti terapije. Najznačajnije miRNA koje doprinose razvoju ili regresiji karcinoma kolona su miRNA-145, miRNA-21, miRNA-135, miRNA-122a i miRNA-34 [184].

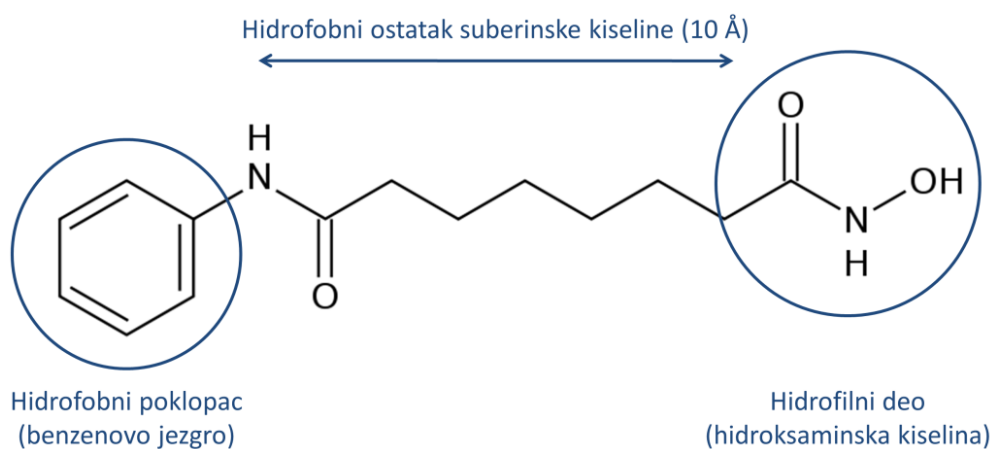
### **1.3.1. Uloga inhibitora histon deacetilaza (HDAC) u terapiji karcinoma**

S obzirom da je hipoacetilacija histona karakteristika većine tumora, uključujući i karcinom kolona, i to najčešće usled povećane ekspresije HDAC, primena inhibitora ovih enzima predstavlja značajnu farmakološku strategiju u epigenetskoj terapiji karcinoma. Vorinostat, ili hemijski suberoilanilid hidroksaminska kiselina (SAHA), je prvi odobren inhibitor histon deacetilaze za kliničku upotrebu, i to za terapiju uznapredovalog kutanog T-limfoma. Nedavno su registrovani još i romidepsin, za istu indikaciju kao vorinostat, belinostat za refraktorni limfom perifernih T-ćelija, i panobinostat za terapiju multiplog mijeloma [187]. Inhibitori HDAC se uglavnom primenjuju u epigenetskoj terapiji hematoloških maligniteta, ali su sami pokazali relativno skromnu antitumorsku aktivnost prema solidnim tumorima u kliničkim studijama. Pokazano je da kombinovana upotreba inhibitora HDAC i inhibitora DNMT u ranoj fazi razvoja tumora može da dovede do vraćanja epigenetskih alteracija na početno stanje, ponovo stvarajući otvoreniju hromatinsku strukturu u ćeliji i uspostavljajući normalnu ekspresiju tumor-supresornih gena [188]. Inhibitori HDAC imaju potencijal da ispolje sinergističko dejstvo i sa brojnim konvencionalnim hemoterapeuticima, zbog čega se te kombinacije ispituju u pretkliničkim i kliničkim studijama.

Kod ljudi identifikovano je 18 različitih HDAC enzima koji su podeljeni u 4 grupe na osnovu strukturne homologije sa HDAC enzimima kvasca, aktivnosti, zavisnosti od kofaktora i subcelularne lokalizacije. Grupe I, II i IV spadaju u tzv. klasične HDAC, za čiju katalitičku

aktivnost su neophodni joni cinka, odnosno koji mogu biti inhibirani cink-helirajućim agensima [189]. Klasa III HDAC pripada posebnoj grupi proteina – sirtuinima, koji su  $\text{NAD}^+$  zavisni i čija aktivnost može biti inhibirana pomoću nikotinamida. Sirtuini (SIRT 1-7) regulišu ekspresiju gena kao odgovor na promene u redoks stanju ćelije i generalno su definisani kao tumor protektivni proteini [190].

Kristalografske studije su pokazale da katalitički centar HDAC enzima sadrži jon cinka koji je odgovoran za transfer acetil grupe. Rezidue lizina histona dolaze u kontakt sa katalitičkim centrom enzima kroz dugački hidrofobni tunel. Neposredno uz tunel je hidrofobna šupljina, po kojoj se različite klase HDAC međusobno razlikuju. Inhibitori HDAC se kompetitivno bore sa histonima za aktivno mesto enzima gde intereaguju sa jonom cinka i ispoljavaju svoje dejstvo. Nedavno, brojna ovakva jedinjenja su sintetisana, od kojih su neka ušla i u klinička ispitivanja. Prema svojoj hemijskoj strukturi, svi HDAC inhibitori se mogu podeliti u 4 grupe: (1) derivati hidroksaminske kiseline, kao najznačajnija grupa u koju spadaju vorinostat, panobinostat, belinostat, trihostatin A, droksinostat; (2) kratkolančane masne kiseline – buterna kiselina, fenil-butirat, valproinska kiselina; (3) benzamidi – entinostat, mocetinostat; (4) ciklični peptidi – romidepsin, trapoksin A, apicidin. Iako strukturno različita, sva ova jedinjenja imaju hidrofилnu glavu pomoću koje heliraju jone cinka, hidrofobni poklopac kojim zatvaraju ulaz u tunel enzima i hidrofobnu vezu dužine oko 10 Å koji spaja ova dva dela. Na primeru vorinostata mogu se uočiti navedeni strukturni delovi – hidrofилni ostatak hidroksaminske kiseline, benzenovo jezgro kao hidrofobni poklopac i ostatak suberinske kiseline (oktan dikesilne) koji spaja prva dva dela (Slika 1.6.) [191].



**Slika 1.6.** Hemijska struktura vorinostata sa označenim grupama neophodnim za ostvarivanje dejstva

Inhibitori HDAC se koriste u terapiji tumora jer imaju sposobnost da indukuju zaustavljanje ćelijskog ciklusa, ćelijsku diferencijaciju i apoptozu, kao i sposobnost da spreče metastaziranje u brojnim malignim ćelijskim linijama, uključujući i ćelije karcinoma kolona. Još uvek je, međutim, nejasno da li je većina efekata HDAC inhibitora posledica alteracija u acetilaciji histona ili promena u regulatornim ćelijskim putevima dejstvom na nehistske proteine [192].

HDAC inhibitori aktiviraju i spoljašnji i unutrašnji put apoptoze. Utvrđeno je da nakon izlaganja HDAC inhibitorima, u humanim leukemijskim ćelijama dolazi do povećanja ekspresije death receptora iz grupe TNFR receptora - DR4 i/ili DR5, ali i do značajnog smanjenja ekspresije c-FLIP proteina, inhibitora prokaspaze-8, što zajedno doprinosi efikasnom procesu apoptoze [193]. I *in vitro* i *in vivo* studijama je potvrđeno da HDAC inhibitori indukuju spoljašnji put apoptoze, kako povećanjem ekspresije Fas i TNFR receptora, tako i povećanjem ekspresije proteina koji su ligandi za ove receptore – Fas ligand, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Na životinjskom modelu akutne promijelocitne leukemije je pokazano da inhibicija Fas i TRAIL proteina pomoću siRNA štiti leukemijske ćelije od apoptoze indukovane valproinskom kiselinom kao inhibitorom HDAC. Rezultati iste studije pokazuju da HDAC inhibitori selektivno indukuju apoptozu u leukemijskim ćelijama, dok ne izazivaju isti efekat u normalnim hematopoetskim progenitorima [194]. Inhibitori HDAC deluju i na unutrašnji put indukcije apoptoze tako što menjaju ravnotežu između pro- i antiapoptotskih proteina u ćeliji. Oni povećavaju ekspresiju proapoptotskih proteina BAK, APAF-1 i nekoliko BH3-only proteina (BID, BIM, BML, NOXA) na nivou transkripcije i/ili translacije. S druge strane, rezultati nekoliko studija pokazuju da nakon tretiranja ćelija različitim inhibitorima HDAC dolazi do smanjenja ekspresije inhibitora apoptoze (IAP, XIAP, survivin) i antiapoptotskih proteina BCL-2 i BCL-XL [192]. U ćelijskoj liniji akutne T-limfocitne leukemije pokazano je da vorinostat dovodi do oslobađanja citohroma c iz mitohondrija u citosol, što je posledica post-translacione modifikacije i razgradnje proapoptotskog BID proteina [195].

HDAC inhibitori iniciraju proces apoptoze i tako što regulišu aktivnost tumor supresora p53 i p73, značajnih induktora apoptoze. Pokazano je da, u zavisnosti od prirode okidača, p53 podleže specifičnoj acetilaciji i sledstvenoj aktivaciji. Različiti obrasci acetilacije utiču na sposobnost vezivanja p53 proteina za DNA, spektar ciljnih gena i, samim tim, na sudbinu ćelije. Na primer, acetilacija p53 na K320 aktivira promotere gena sa visokim afinitetom vezivanja p53 proteina, kao što je inhibitor ćelijskog ciklusa p21, dok acetilacija na K373

aktivira promotere gena sa niskim afinitetom vezivanja p53 proteina, kao na primer BAX [196]. Acetilacija takođe povećava stabilnost p53 proteina i štiti ga od degradacije od strane proteazoma *in vitro*. Pokazano je i da inhibitori HDAC deluju selektivno citotoksično prema ćelijama sa mutiranim p53 proteinom tako što indukuju njegovu degradaciju [197]. Pored p53 proteina, utvrđeno je i da su E2F i p73 takođe uključeni u proces apoptoze posredovan inhibitorima HDAC. Doksorubicinom izazvana acetilacija transkripcionog faktora E2F1 dovodi do transaktivacije target gena za p73, koji u sadejstvu sa p53 indukuje apoptozu. Stvarna uloga p73 nije dovoljno razjašnjena, jer pojedine studije sugerišu da ovaj protein deluje više kao onkoprotein, nego kao tumor supresor [198].

Inhibitori HDAC deluju i na enzime uključene u proces reparacije DNA i na taj način indukuju apoptozu ćelije. HDAC enzimi deacetiluju Ku70 protein i povećavaju njegovo vezivanje za DNA. Ku70, kao deo heterodimernog Ku proteina sastavljenog od subjednica Ku70 i Ku80, uključen je u proces spajanja nehomolognih krajeva, koji predstavlja jedan od mehanizama u reparaciji DNA. Ku70 ima značajnu ulogu i u regulaciji apoptoze. Acetilacija Ku70 proteina uzrokovana dejstvom inhibitora HDAC dovodi do oslobađanja BAX, koji se dalje translocira na spoljašnju mitohondrijalnu membranu i inicira proces apoptoze [192].

Aktivnost Hsp90, molekularnog čaperona, je takođe regulisana stepenom acetilacije, na koji utiču HDAC inhibitori. Hsp90 se veže za široki spektar proteina i omogućujući njihovo savijanje u pravilnu, funkcionalnu konformaciju utiče na maturaciju tih proteina, povećava im stabilnost, štiti od proteolitičke degradacije. Neki od tih proteina su onkoproteini Her-2/neu, c-Raf, Bcr-Abl itd. Povećana acetilacija Hsp90 pod dejstvom inhibitora HDAC smanjuje njegovu sposobnost da stupi u interakciju sa onkoproteinima, što dalje dovodi do pojačane proteolitičke degradacije onkoproteina [192]. Utvrđeno je da izlaganje Her2+ ćelija humanog karcinoma dojke inhibitorima HDAC dovodi do povećanja nivoa acetilovanog Hsp90 u ćelijama, što rezultuje njegovim neefikasnim vezivanjem ATP-a i pojačanom degradacijom Her2/neu onkoproteina. Kao posledica ovih procesa se javlja pojačana indukcija apoptoze i usporen rast malignih ćelija [199].

HDAC inhibitori utiču na redoks stanje malignih ćelija i aktiviraju apoptozu posredovanu reaktivnim vrstama kiseonika (ROS). Akumulacija ROS u ćelijama tokom oksidativnog stresa dovodi do oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida i utiče na proces apoptoze. Dokazano je da ROS aktiviraju transkripciju proapoptotskog proteina BIM i na taj način indukuju apoptozu. Akumulacija ROS u malignim ćelijama tretiranim inhibitorima HDAC je zabeležena u brojnim studijama. Smatra se da je stvaranje ROS

značajan mehanizam citotoksičnosti inhibitora HDAC, koji prethodi gubitku potencijala spoljašnje mitohondrijalne membrane. Pokazano je da tretman leukemijskih ćelija vorinostatom i entinostatom pojačava stvaranje ROS i smanjuje ekspresiju Mn-superoksid dismutaze [200]. Smatra se da se akumulacija ROS, kao posledica dejstva inhibitora HDAC, dešava selektivno u maligno transformisanim, ali ne i u normalnim ćelijama. Mehanizam ovog fenomena još nije u potpunosti poznat, ali je postavljena hipoteza da selektivna indukcija tioredoksina, endogenog antioksidansa, na nivou transkripcije, pomaže normalnim ćelijama da se izbore sa oksidativnim stresom izazvanim inhibitorima HDAC [201]. S druge strane, pokazano je da u malignim ćelijama tretiranim vorinostatom dolazi do indukcije transkripcije tioredoksin-vezujućeg proteina 2 (TBP2 - *thioredoxin binding protein 2*), koji je negativni regulator tioredoksina [202].

Pored utvrđene antiproliferativne aktivnosti, dokazano je i dodatno antiinflamatorno dejstvo HDAC inhibitora. Ova dvostruka efikasnost HDAC inhibitora može biti od velikog značaja kod tumora koji se razvijaju kao posledica hronične inflamacije, pre svega kod kolorektalnog karcinoma [203]. Ovo je i potvrđeno na hemijskom eksperimentalnom modelu karcinoma kolona kod miševa, indukovano primenom dekstran natrijum sulfata i azoksimetana, kao i na genetskom modelu hronične inflamacije i kancerogeneze kolona kod miševa sa inaktiviranim genom za IL-10. U oba modela, primena vorinostata je suprimirala inflamaciju, pre svega dejstvom na NF-κB, što je dovelo do smanjenja incidencije razvoja karcinoma kolona [204].

Napomenuto je već da HDAC inhibitori mogu biti efikasni kao monoterapija, ali da se značajno veća efikasnost kliničke primene ovih epigenetskih modulatora može dobiti u kombinaciji sa drugim hemoterapeuticima. Ovo se objašnjava prevashodno time što HDAC inhibitori indukuju otvorenu hromatinsku formu u ćelijama, te je DNA dostupnija za dejstvo konvencionalnih citostatika. Vorinostat se sam primenjuje u terapiji kutanog limfoma T-ćelija, ali se u kliničkim studijama ispituje kombinovana primena ovog inhibitora HDAC sa različitim hemoterapeuticima u terapiji i brojnih solidnih tumora, uključujući i kolorektalni karcinom. Vorinostat u kombinaciji sa 5-fluorouracilom se ispituje u terapiji refraktornog metastatskog karcinoma kolona [205], dok se u kombinaciji sa proteazomskim inhibitorom bortezomibom ispituje u terapiji različitih solidnih tumora, uključujući i karcinom kolona [206].

Imajući u vidu uticaj različitih žučnih kiselina na oksidativni status ćelija i na inflamatorne signalne puteve, kao i nuklearnog receptora FXR na apoptozu i proliferaciju

malignih ćelija, kombinovana primena žučnih kiselina sa inhibitorima HDAC mogla bi dovesti do poboljšanih farmakoterapijskih ishoda. Mali broj studija se bavio ispitivanjem uloge žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji ključnih ćelijskih procesa. Definisani su mehanizmi citoprotektivnog dejstva UDH, a koji obuhvataju inhibiciju proapoptotskih puteva. Novije studije su pokazale da UDH smanjuje acetilaciju histona i indukuje ćelijsku diferencijaciju u ćelijama karcinoma kolona, ali da UDH nije inhibitor HDAC, već da naprotiv indukuje ekspresiju HDAC6 [207]. Uticaj drugih žučnih kiselina na epigenetsku regulaciju signalnih puteva uključenih u apoptozu i proliferaciju nije ispitivan.

Iako je učinjen značajan napredak u istraživanju epigenomike poslednjih godina, još mnogo toga treba da bude razjašnjeno u pogledu uloge epigenoma u procesu kancerogeneze, te su potrebna dalja istraživanja kako bi se obezbedilo dovoljno informacija za optimizaciju epigenetske terapije u kliničkoj praksi.

## 2. Radne hipoteze i ciljevi istraživanja

Žučne kiseline su uključene u brojne signalne puteve koji regulišu ćelijski ciklus i doprinose razvoju ili regresiji maligniteta. Pronađena je veza između gubitka farnezoid X receptora (FXR), glavnog regulatora homeostaze žučnih kiselina, i kancerogeneze u intestinumu. Dok sniženje nivoa FXR u enterocitima doprinosi razvoju tumora, njegova aktivacija u ćelijama karcinoma kolona dovodi do supresije proliferacije i indukcije apoptoze. Aktivacija FXR takođe smanjuje inflamaciju u intestinalnom traktu tako što inhibira funkciju NF- $\kappa$ B, čija perzistentna aktivacija u ćelijama kolona dovodi do kolitisa i, eventualno, karcinoma kolona. Stoga se može zaključiti da FXR predstavlja značajnu farmakološku metu i u prevenciji i terapiji karcinoma kolona.

Inhibitori histon deacetilaza (HDAC) su agensi koji se primenjuju u epigenetskoj terapiji različitih vrsta tumora, ali su sami pokazali relativno skromnu antitumorsku aktivnost prema solidnim tumorima u kliničkim studijama. Međutim, oni poseduju značajan potencijal da u kombinaciji sa različitim citotoksičnim agensima ispolje sinergistički efekat. Prema rezultatima nedavnih studija, delovanje vorinostata, klinički odobrenog inhibitora HDAC u terapiji maligniteta, je u velikoj meri uslovljeno oksidativnim statusom ćelije.

Imajući u vidu da su glavna fiziološka i farmakološka dejstva žučnih kiselina determinisana njihovom polarnošću, potrebno je ispitati uticaj polusintetskih žučnih kiselina u odnosu na hidrofobne i hidrofilne prirodne žučne kiseline. Takođe, s obzirom na uticaj strukturno različitih žučnih kiselina na oksidativni status u ćelijama, kao i nuklearnog receptora FXR na apoptozu i proliferaciju malignih ćelija, opravdano je utvrditi da li postoji sinergizam između žučnih kiselina i vorinostata.

Predmet istraživanja je *in vitro* i *in vivo* ispitivanje uticaja sintetski dobijenog keto derivata holne kiseline, 12-monoketoholne kiseline (MKH), u komparaciji sa prirodnim žučnim kiselinama, hidrofobnom henodeoksiholnom kiselinom (HDH) i hidrofilnom ursodeoksiholnom kiselinom (UDH), na ćelijske procese apoptoze, oksidativnog stresa i inflamacije, koji su od značaja za hemoprevenciju i terapiju kolorektalnog karcinoma. Predmet istraživanja, takođe, obuhvata i ispitivanje uloge odabranih žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji ovih procesa u ćelijama karcinoma kolona, odnosno uticaj žučnih kiselina na antitumorsku aktivnost vorinostata, leka u epigenetskoj terapiji maligniteta.



Istraživanje je zasnovano na hipotezi da žučne kiseline, u zavisnosti od polarnosti, na različit način moduliraju oksidativni status izloženih ćelija. Hidrofilne žučne kiseline značajno smanjuju nivo oksidativnog stresa u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja, a takođe imaju protektivan uticaj na inflamaciju i sledstvenu kancerogenezu, modulacijom ekspresije gena uključenih u procese inflamacije i apoptoze. Žučne kiseline koje deluju kao induktori apoptoze trebalo bi značajno da povećaju senzitivnost ćelija karcinoma kolona na dejstvo epigenetskog agensa vorinostata, mehanizmima koju obuhvataju modulaciju oksidativnog statusa ćelija.

U skladu sa postavkom eksperimentalnog dela doktorata da se detaljno utvrde funkcije žučnih kiselina u *in vitro* i *in vivo* sistemima, osnovni ciljevi našeg istraživanja su da se ispita uticaj žučnih kiselina na pokazatelje oksidativnog stresa i antioksidativne odbrane, kao i na ekspresiju gena koji kodiraju sintezu proteina uključenih u procese inflamacije, apoptoze i antioksidativne zaštite u jetri i intestinumu pacova kod kojih je izazvana holestaza. Pored toga, cilj našeg rada je da se ispita uticaj žučnih kiselina na antitumorsku aktivnost epigenetskog agensa vorinostata u HT-29 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona, kao i na procese apoptoze i oksidativnog stresa u ćelijama ko-tretiranim vorinostatom i žučnim kiselinama.

Na osnovu dobijenih podataka o ulozi različitih žučnih kiselina u ćelijskim procesima apoptoze, inflamacije i oksidativnog stresa, kao i u epigenetskoj regulaciji ovih procesa, u intestinumu eksperimentalnih životinja sa holestazom i u HT-29 ćelijama karcinoma kolona, doneće se zaključak o mogućnosti upotrebe žučnih kiselina u hemoprevenciju i terapiji karcinoma kolona. Rezultati komparativne analize normalnih i malignih ćelija pružiće detaljan uvid u kompleksnost i razlike biološkog odgovora ispitivanih ćelija i tkiva na efekte indukovane žučnim kiselinama. Terapijska strategija kojom bi se pomoću žučnih kiselina povećala efikasnost epigenetskog antitumorskog leka vorinostata, uz istovremeno smanjenje sistemske toksičnosti leka zbog smanjenja doze, mogla bi imati značajno mesto u savremenoj antitumorskoj terapiji.

### 3. Materijal i metode

Ogledi u okviru ove doktorske disertacije su izvedeni na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Zavodu za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, kao i u Laboratoriji za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju Vojvodine, u periodu od februara 2013. godine do septembra 2015. godine. Eksperimentalni deo je podeljen u dva dela u cilju ispitivanja farmakoloških efekata primene žučnih kiselina u *in vivo* i *in vitro* sistemima.

#### 3.1. Materijal

Žučne kiseline henodeoksiholna (HDH, čistoće  $\geq 97\%$ ) i ursodeoksiholna (UDH, čistoće  $\geq 98\%$ ) su nabavljene od proizvođača Sigma-Aldrich (Nemačka), dok je 12-monoketoholna kiselina (MKH, čistoće 96,5% sa 3,1% holata kao glavnom nečistoćom) sintetisana na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu [208]. Tokom *in vivo* ispitivanja, svakodnevno su pravljene sveži rastvori žučnih kiselina i etinil-estradiola u propilen glikolu (Sigma-Aldrich, Nemačka), dok su tokom *in vitro* ispitivanja žučne kiseline rastvarane u dimetil-sulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich, Nemačka). U *in vitro* ogledima su korišćeni i epigenetski agens vorinostat, odnosno suberoilanilid hidoksaminska kiselina (SAHA, čistoće  $\geq 98\%$ ), ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol (čistoće  $\geq 96\%$ ) i N-acetil cistein (NAC, čistoće  $\geq 99\%$ ) proizvođača Sigma-Aldrich (Nemačka), kao i doksorubicin u vidu komercijalno dostupnog preparata Adriablastina<sup>®</sup> RD (Actavis, Italija).

##### 3.1.1. Eksperimentalne životinje

U ogledu su korišćeni zdravi, polno zreli, albino laboratorijski pacovi soja Wistar, muškog pola, telesne mase 250 - 350 grama, koji su odabrani metodom slučajnog izbora iz okota Vojnotehničkog instituta u Beogradu. Laboratorijske životinje su boravile u Uni-Protect (Ehret, Emendingen, Nemačka) ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja sa filterskim sistemom za protok vazduha, na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. U ormanima je temperatura vazduha održavana između 20 i 25°C, uz kontrolu vlažnosti vazduha (55%) i održavanje cirkadijalnog ritma (smena svetlosti i mraka u trajanju od 12 časova). Životinje su tokom nedelju dana aklimatizovane u vivarijumu pre početka ogleda. Životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje (Veterinarski institut Zemun). Pristup hrani je bio onemogućen 12 sati pre žrtvovanja.

Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama, Zakonom o dobrobiti ogleđnih životinja i regulativom Evropske Unije (2010/63/EU) i *ARRIVE* smernicama. Izvođenje oglada je odobreno od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Univerziteta u Novom Sadu (broj odobrenja: I-2013-04).

### 3.1.2. HT-29 ćelijska linija

U *in vitro* eksperimentima je korišćena HT-29 ćelijska linija humanog adenokarcinoma kolona (ATCC: HTB38), poreklom iz primarnog tumora kolona 44-godišnje pacijentkinje sa kolorektalnim adenokarcinomom. HT-29 ćelije su adherentne, epiteloidne maligne ćelije, koje rastu u monosloju i u velikim kolonijama. Pozitivne su na c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis i fos onkogene, a takođe pojačano eksprimiraju nefunkcionalni p53 protein sa R273H mutacijom u *TP53* genu.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Tretman eksperimentalnih životinja

U cilju ispitivanja uloge odabranih žučnih kiselina u regulaciji signalnih puteva koji doprinose razvoju ili regresiji maligniteta, odabran je *in vivo* eksperimentalni model holestaze, pri čemu su eksperimentalne životinje metodom slučajnog izbora podeljene u 6 grupa (n=5):

1. **Grupa Kon** - kontrolna grupa životinja tretiranih sa 0,5 ml/kg propilen glikola, subkutano
2. **Grupa EE** - model grupa životinja tretiranih sa 5 mg/kg etinil-estradiola (EE), subkutano
3. **Grupa UDH** - grupa životinja tretiranih sa 5 mg/kg EE, subkutano i 25 mg/kg UDH, intraperitonealno
4. **Grupa HDH** - grupa životinja tretiranih sa 5 mg/kg EE, subkutano i 10 mg/kg HDH, intraperitonealno
5. **Grupa MKH4** - grupa životinja tretiranih sa 5 mg/kg EE, subkutano i 4 mg/kg MKH, intraperitonealno
6. **Grupa MKH20** - grupa životinja tretiranih sa 5 mg/kg EE, subkutano i 20 mg/kg MKH, intraperitonealno.

Kako bismo se pridržavali etičkog principa redukcije, odnosno kako bismo za ogled koristili najmanji mogući broj životinja, a sa druge strane poštujući standardne statističke procedure, opredelili smo se da u svakoj eksperimentalnoj grupi bude 5 životinja, tako da je ukupan broj životinja u okviru *in vivo* studije iznosio 30.

Etinil-estradiol je rastvoren u propilen glikolu i primenjen subkutano u dozi od 5 mg/kg tokom pet uzastopnih dana radi indukcije holestaze. Kontrolne životinje su tretirane samim propilen glikolom subkutano, 0,5 ml/kg. Žučne kiseline, UDH u dozi od 25 mg/kg, HDH u dozi od 10 mg/kg i MKH u dozama od 4 mg/kg i 20 mg/kg su primenjivane intraperitonealno, takođe tokom pet uzastopnih dana. Nakon 24 h od poslednje doze etinil-estradiola i žučnih kiselina, životinje su uvedene u opštu anesteziju intraperitonealnom aplikacijom 25% rastvora uretana u dozi od 5 ml/kg. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, izvršena je eutanazija životinja kardiopunkcijom u cilju uzimanja uzoraka krvi i tkiva za dalja genetska i biohemijska ispitivanja. Uzorkovani su jetra (periferno od hilusa) i deo intestinuma (ileum 10 cm proksimalno i kolon 10 cm distalno od ileocekalnog spoja) od svake životinje i izmerene su mase uzorkovanih tkiva. Enterociti su izolovani "*scrapping*" metodom, prema ranije opisanoj metodi [209].

### **3.2.2. Priprema uzoraka seruma, tkiva jetre i intestinuma za genetske i biohemijske analize**

Prikupljena krv je nakon koagulisanja centrifugirana 10 minuta na 3500 obrtaja/min i odvojen je serum, u kom su analizirani biohemijski pokazatelji holestaze i oštećenja jetre. U cilju ispitivanja biohemijskih parametara oksidativnog stresa, homogenati jetre i intestinuma su napravljeni od 1 grama tkiva u Potter-Elvehjem homogenizatoru (Braun, Nemačka) pomoću 0,05 M TRIS/HCl pufera pH vrednosti 7,4 u odnosu 1:3 (w/v), na temperaturi od 4 °C. Deo dobijenog grubog homogenata je izdvojen i u njemu je određivana koncentracija proteina i pokazatelji lipidne peroksidacije. Ostatak grubog homogenata je centrifugiran 20 minuta na 4 °C i 3500 obrtaja/min u Mikro 22R centrifugi sa hlađenjem (Hettich, Nemačka), nakon čega je izdvojen supernatant, odnosno denukleirana frakcija (citosol), gde su određivani proteini i aktivnost antioksidativnih enzima. Uzorci seruma, kao i homogenata tkiva jetre i intestinuma su do analiziranja čuvani na temperaturi od -20 °C. U cilju kvantifikacije genske ekspresije, uzorci tkiva jetre i intestinuma su odmah stavljeni u *in situ* RNA-stabilizacioni reagens RNAlater® (Sigma-Aldrich, Nemačka) i do izolacije RNA su takođe čuvani na temperaturi od -20 °C, u skladu sa preporukama proizvođača.

### 3.2.3. Određivanje biohemijskih parametara u serumu eksperimentalnih životinja

Od biohemijskih pokazatelja funkcije jetre u serumu određivane su enzimске aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i gama-glutamil transferaze (GGT), kao i koncentracije ukupnog i konjugovanog bilirubina. Sve analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka), u skladu sa uputstvima proizvođača odgovarajućih komercijalnih kitova.

Katalitičke koncentracije AST, ALT i GGT u serumu životinja su merene standardnim IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) metodama. Princip određivanja AST je zasnovan prenosu amino grupa između L-aspartata i alfa-ketoglutarata pri čemu nastaju L-glutamat i oksaloacetat. Nastali oksaloacetat u drugoj reakciji se redukuje u malat u prisustvu malat dehidrogenaze i koenzima NADH. Pad apsorbanca na 340 nm je proporcionalan aktivnosti AST u uzorku [210]. Kvantitativno određivanje ALT je zasnovano na principu reakcije u kojoj se vrši transaminacija između L-alanina i alfa-ketoglutarata u prisustvu ALT pri čemu nastaju L-glutamat i piruvat. Piruvat se u drugoj reakciji, u prisustvu NADH, redukuje pod dejstvom enzima laktat dehidrogenaze u laktat pri čemu se prati pad apsorbanca u vremenu na 340 nm koji je proporcionalan oksidaciji NADH u NAD [211]. Princip određivanja aktivnosti GGT se zasniva na reakciji prenosa glutamil grupe sa supstrata L- $\gamma$ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilida na glicil-glicin. Produkt ove reakcije koju katalizuje GGT je 5-amino-2-nitrobenzoat, koji apsorbuje svetlost na 410 nm i praćenjem promene apsorbanca na ovoj talasnoj dužini, odnosno merenjem brzine nastajanja produkta, određuje se aktivnost GGT [212]. Koncentracije ukupnog i konjugovanog bilirubina u serumu eksperimentalnih životinja su određene modifikovanom kolorimetrijskom diazo metodom, koja se zasniva na reakciji između bilirubina i 2,5-dihlorofenildiazonijum (DPD) soli, u kojoj nastaje obojeni azobilirubinski kompleks, koji se meri bihromatski na 570/660 nm. Konjugovani bilirubin odmah stupa u reakciju sa DPD reagensom, dok nekonjugovani bilirubin reaguje tek nakon dodatka surfaktanta, te se na ovaj način mogu izmeriti koncentracije i konjugovanog i ukupnog bilirubina [213].

### 3.2.4. Tretman HT-29 ćelija

HT-29 ćelije su uzgajane u DMEM medijumu (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS), 2mM glutamina, penicilina (100 IJ/ml) i streptomocina (100 µg/ml). Ćelijska linija je održavana u flaskonima od 25 cm<sup>2</sup> (Grainer Bio-One, Austrija) u inkubatoru na 37°C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO<sub>2</sub>. Ćelije su presađivane dva puta nedeljno, po postizanju konfluentnosti 80 - 90%. Ćelijska suspenzija je dobijana dodavanjem 0,5% rastvora tripsina u 0,1% EDTA-PBS puferu, nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma, pri čemu komponente seruma vrše inaktivaciju tripsina. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta na 1500 obrtaja/min, a ćelijski talog je resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost. U analizama su korišćene ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta.

### 3.2.5. Određivanje citotoksičnosti prema HT-29 ćelijskoj liniji

Citotoksično dejstvo vorinostata prema HT-29 ćelijskoj liniji, primenjenog samog ili u kombinaciji sa žučnim kiselinama, u uslovima povišenog ili sniženog oksidativnog stresa, određeno je pomoću testa odbacivanja boje i MTT testa.

#### 3.2.5.1. Test odbacivanja boje

Test odbacivanja boje (*dye exclusion test*, DET) se izvodi dodavanjem 200 µl 0,1% rastvora boje tripan plavo u 50 µl ćelijske suspenzije, i brojanjem procenta obojenih ćelija u Bürker-Türk hemocitometru. Zasniva se na principu da žive ćelije poseduju intaktne ćelijske membrane, koje ne dozvoljavaju prodor boja, kao što je tripan plavo, odnosno odbacuju boje, za razliku od ne-vijabilnih ćelija koje primaju boju, i kao takve imaju plavo obojenu citoplazmu [214].

Broj preživelih ćelija i procenat citotoksičnosti je određen u dva nezavisna eksperimenta urađena u triplikatu, prema formuli:

$$\% \text{ vijabilnih ćelija} = (\text{broj vijabilnih ćelija} / \text{ukupni broj ćelija}) \times 100$$

$$\% \text{ citotoksičnosti} = [1 - (\text{broj vijabilnih ćelija} / \text{ukupni broj ćelija})] \times 100.$$

### 3.2.5.2. MTT test

Ćelijska proliferacija je indirektno merena prema metodi Mossman-a [215] putem određivanja sposobnosti ćelija da metabolički redukuju tetrazolijum boju (MTT) u plavo-crni produkt formazan. Tetrazolijum se metaboliše jedino u aktivnim mitohondrijama živih ćelija pomoću enzima dehidrogenaze.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem tokom 10 min na 200 x g i određena im je vijabilnost pomoću 0,1% tripan plavog. Vijabilne ćelije su posejane u oktuplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora (BD Biosciences, SAD), tako da je u 90 µl medijuma bilo  $5 \times 10^3$  HT-29 ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> tokom naredna 24 časa. Po isteku inkubacije, tj. stabilizacije u sve otvore osim kontrolnih je dodato po 10 µl rastvora ispitivanih supstanci (vorinostat, ursodeoksiholna kiselina, henodeoksiholna kiselina, 12-monoketoholna kiselina, doksorubicin, α-tokoferol i N-acetil cistein) u rastućim koncentracijama i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku narednih 48 h. Tokom pilot eksperimenata eksperimentalne grupe su tretirane rastućim koncentracijama ispitivanih supstanci: vorinostat (SAHA) u opsegu 0,5-10 µM, ursodeoksiholna kiselina (UDH) u opsegu 50-700 µM, henodeoksiholna kiselina (HDH) u opsegu 5-100 µM, 12-monoketoholna kiselina (MKH) u opsegu 50-500 µM, doksorubicin (DOX) u opsegu 0,1-5 µM, α-tokoferol u opsegu 1-18 µM i N-acetil cistein (NAC) u opsegu 2,5-40 mM, kako bi se odabrale koncentracije za dalji, kombinovani tretman ćelija. Žučne kiseline i SAHA su prethodno rastvoreni u DMSO, DOX i NAC su rastvoreni u medijumu, a α-tokoferol u smeši etanol/BSA (*bovine serum albumin*).

Rastvor MTT boje koncentracije 5 mg/ml, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u svaki otvor na mikrotitarskoj ploči u zapremini od 10 µl, 3h pre isteka inkubacionog perioda. Po isteku inkubacionog vremena od 48 h, medijum i rastvor MTT su uklonjeni sukcijom i u svaki otvor je dodato po 100 µl 0,04 M HCl u izopropanolu radi rastvaranja nastalog formazana. Nakon nekoliko minuta na sobnoj temperaturi, apsorbancija je očitana pomoću spektrofotometrijskog čitača za mikrotitar ploče (Multiscan MCC/340, Thermo-Scientific) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba.

Citotoksičnost je izražena u procentima i izračunata prema formuli:

$$CI [\%] = (1 - A_S/A_K) \times 100$$

pri čemu je  $A_S$  apsorbancija ispitivanih uzoraka, a  $A_K$  apsorbancija odgovarajućih kontrola.

Nakon ispitivanja citotoksične aktivnosti pojedinačnih supstanci ispitana je citotoksičnost kombinovane primene odabranih, klinički relevantnih koncentracija epigenetskog agensa vorinostata u uslovima povišenog oksidativnog stresa (kombinacija sa DOX) i sniženog oksidativnog stresa u ćelijama (kombinacije sa  $\alpha$ -tokoferolom i NAC). U skladu sa postavljenim ciljevima rada, ispitana je i citotoksičnost vorinostata u kombinaciji sa žučnim kiselinama. Trideset minuta pre tretmana ćelija vorinostatom u koncentracijama od 1  $\mu$ M i 2  $\mu$ M, koje odgovaraju približnim vrednostima  $IC_{35}$  i  $IC_{40}$ , ćelije su pre-tretirane žučnim kiselinama u koncentracijama koje odgovaraju vrednostima  $IC_{20}$  za svaku pojedinačnu žučnu kiselinu (50  $\mu$ M UDH, 5  $\mu$ M HDH i 35  $\mu$ M MKH). Pretretman je vršen i  $IC_{20}$  koncentracijama DOX (0,1  $\mu$ M) i  $\alpha$ -tokoferola (3  $\mu$ M), dok je NAC primenjen u koncentraciji od 10 mM, koja je imala neznatni citotoksični efekat u pilot studiji. Nakon 48 h ispitana je citotoksična aktivnost u skladu sa prethodno opisanom procedurom, pri čemu su ćelije zasejane u oktuplikatu, a sama procedura je ponovljena u vidu dva nezavisna eksperimenta.

### 3.2.6. Analiza tipa interakcije u ostvarivanju citotoksičnog efekta

Na osnovu rezultata ispitivanja citotoksičnosti fiksnih kombinacija vorinostata sa žučnim kiselinama, kao i sa pro- i antioksidativnim agensima, dobijenih iz dva nezavisna eksperimenta, kvantitativnom analizom odnosa doza-efekat je utvrđen tip interakcije (sinergizam, antagonizam ili aditivni efekat) između vorinostata i analiziranih agenasa. Primenom CompuSyn softverskog paketa (ComboSyn Inc., SAD) izračunat je CI (*Combination Index*) kvantitativni deskriptor prema algoritmu koji su postavili Chou i Talalay [216]. CI indeks je kvantitativni pokazatelj tipa interakcije i može imati vrednost od 0 do 2, pri čemu CI vrednosti bliske 2 ukazuju na antagonistički efekat, vrednosti bliske 0 na sinergistički efekat, dok vrednosti bliske 1 ukazuju na aditivni efekat. Logaritam CI indeksa se takođe može koristiti za procenu i prikaz tipa interakcije, pri čemu pozitivne vrednosti ukazuju na antagonizam, a negativne na sinergizam.

### 3.2.7. *In silico* analiza molekulskih deskriptora u proceni citotoksičnog efekta

U cilju objašnjenja dobijenih rezultata testova citotoksičnosti, pomoću VolSurf+ programa (Molecular Discovery Ltd, Engleska) iz optimizovanih 3D struktura HDH i UDH izračunato je 12 molekulskih deskriptora koji ukazuju na polarnost, rastvorljivost i transport kroz membrane: amfifilni momenat (A), logP vrednost u sistemu oktanol/voda (LOGP n-Oct), logP vrednost u sistemu cikloheksan/voda (LOGP c-Hex), veličina polarne površine molekula



(eng. *Polar Surface Area*, PSA), veličina hidrofobne površine molekula (eng. *Hydrophobic Surface Area*, HSA), odnos polarne i ukupne površine (PSAR), odnos polarne i hidrofobne površine (PHSAR), intrinzička rastvorljivost (eng. *Solubility*, SOLY), procenat vezivanja za proteine (eng. *Protein Binding*, PB), permeabilnost kroz Caco-2 ćelije (CACO2), permeabilnost kroz kožu (SKIN), distribucija kroz krvno-moždanu barijeru (LgBB) [217]. Prethodno je izvršena geometrijska optimizacija struktura HDH i UDH semiempirijskom metodom Austin Model 1 (AM1) korišćenjem Spartan 14 softverskog paketa [218].

### 3.2.8. Priprema uzoraka HT-29 ćelija za genetske i biohemijske analize

Nakon ispitivanja citotoksičnog dejstva pojedinačnih supstanci i njihovih kombinacija, vršen je tretman ćelija u cilju pripreme uzoraka za dalja genetska i biohemijska ispitivanja.  $1 \times 10^6$  HT-29 ćelija je zasejano u flaskone od  $25 \text{ cm}^2$  i kultivisano u skladu sa prethodno opisanim uslovima. Nakon postizanja konfluentnosti ( $5 \times 10^6$  ćelija), eksperimentalne grupe ćelija su pre-tretirane dodavanjem  $\text{IC}_{20}$  koncentracija žučnih kiselina ( $50 \text{ }\mu\text{M}$  UDH,  $5 \text{ }\mu\text{M}$  HDH i  $35 \text{ }\mu\text{M}$  MKH) rastvorenih u DMSO ( $0,5\%$  v/v), 30 min pre dodavanja epigenetskog agensa vorinostata rastvorenog u DMSO u koncentraciji od  $1 \text{ }\mu\text{M}$ . Negativnoj kontrolnoj grupi je dodat samo rastvarač DMSO, a pozitivnoj kontroli (grupa SAHA) DMSO 30 min pre dodavanja vorinostata. 24 časa nakon dodavanja vorinostata, medijum je dekantovan i ćelije su isprane pomoću Dubelkovog fosfatnog pufera (*Dubelcco's Phosphate Buffer Saline*, PBS, Life Technologies, SAD). Dodatkom  $500 \text{ }\mu\text{l}$   $0,5\%$  rastvora tripsina i inkubacijom na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  tokom 5 min je dobijena ćelijska suspenzija koja je zatim resuspendovana u DMEM-u sa  $10\%$  FBS (*fetal bovine serum*) i centrifugirana 10 minuta na  $1500$  obrtaja/min.

Za biohemijske analize, ćelijski pelet je resuspendovan u  $5 \text{ ml}$  PBS pufera (prosečno  $1 \times 10^6$  ćelija/ml). Ispitivanje intenziteta lipidne peroksidacije je vršeno direktno iz ćelijske suspenzije, dok je ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima vršeno iz citosolne frakcije koja se dobija dodatkom  $2,5 \text{ }\mu\text{g}$  digitonina (Sigma-Aldrich, Nemačka) na  $1 \times 10^6$  ćelija, upotrebom  $1\%$  rastvora digitonina u DMSO i centrifugiranjem 10 minuta na  $4000$  obrtaja/min. Dobijeni supernatant je čuvan na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , do analize enzimske aktivnosti. Za genetska ispitivanja, ćelijski sediment je resuspendovan u  $3 \text{ ml}$  RNAlater<sup>®</sup>-a. Dobijena ćelijska suspenzija je čuvana na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  do izolacije RNA i reverzne transkripcije.

### 3.2.9. Biohemijske analize oksidativnog statusa u HT-29 ćelijama i uzorcima jetre i intestinuma eksperimentalnih životinja

U cilju određivanja oksidativnog statusa nakon primene žučnih kiselina u prethodno opisanim *in vitro* i *in vivo* modelima, određen je intenzitet lipidne peroksidacije, kao i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite - superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR) i glutation-S-transferaze (GST). Sve analize su urađene spektrofotometrijski, korišćenjem Agilent 8453 UV/VIS spektrofotometra sa termostatiranim multićelijskim sistemom za pozicioniranje uzoraka i softverom za ispitivanje enzimske kinetike. Kako bi mogle da se porede vrednosti između različitih ispitivanih grupa, svi rezultati su izraženi prema miligramu proteina.

#### 3.2.9.1. Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina u grubom homogenatu i citosolnim frakcijama jetre i intestinuma, kao i u HT-29 ćelijskoj liniji, vršeno je biuretskom metodom koja se zasniva na reakciji peptidne veze sa jonima bakra u alkalnoj sredini, pri čemu se stvara ljubičasto obojeni kompleks. Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan koncentraciji proteina, a apsorbancija je očitana na 540 nm. Određivanje koncentracije proteina je izvedeno pomoću komercijalnog seta proizvođača Sentinel Diagnostics (Milan, Italija), prema uputstvima proizvođača.

Izvođenje analize: U 1 ml reagensa (6 mmol CuSO<sub>4</sub>, 6 mmol KI, 0,75 mmol NaOH, pH ≥10) dodato je 10 μl uzorka. U slepu probu je dodato 10 μl destilovane vode, a u standard ista zapremina standardnog rastvora albumina (6 g/dl). Reakciona smeša je dobro promešana i nakon 15 minuta je izmerena apsorbancija standarda (A<sub>S</sub>) i uzorka (A<sub>U</sub>), normalizovana u odnosu na slepu probu.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Koncentracija proteina} = (A_S/A_U) \times \text{koncentracija standardnog rastvora}$$

#### 3.2.9.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Princip: Metoda se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malondialdehidom (MDA) koji nastaje tokom peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u sastavu bioloških membrana, pod dejstvom reaktivnih kiseoničnih čestica. MDA je pokazatelj lipidne peroksidacije, te se koristi u evaluaciji oksidativnog stresa. U uslovima povišene temperature i u kiseljoj sredini, MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, pri

čemu nastaje konjugat crvene boje koji ima maksimum apsorpcije monohromatske svetlosti na talasnoj dužini od 535 nm [219].

Izvođenje analize: 300 µl uzoraka grubog homogenata jetre i intestinuma, odnosno 300 µl uzorka HT-29 ćelijske kulture, dodato je u 1 ml smeše TBA (0,375%) i trihlorsirćetne kiseline (TCA) (15%) u 0,25 M HCl, izmešano pomoću vorteks mešalice i zagrevano na vodenom kupatilu 15 minuta na 90 °C. Nakon hlađenja na ledu 5 min, epruvete su centrifugirane na 10000 obrtaja/min u toku 10 minuta. Koncentracija MDA je određena iz supernatanta spektrofotometrijski na 535 nm uz TBA-TCA-HCl reagens sa destilovanom vodom kao slepom probom.

Izračunavanje rezultata:

$$C_{MDA} = \frac{(Auz - Asp) \times Vrs \times 10}{1,56 \times Vuz \times Cpr}$$

pri čemu je: Auz - srednja vrednost apsorbanca uzorka, Asp - srednja vrednost apsorbanca slepe probe, Vrs - zapremina reakcione smeše [ml], Vuz - zapremina uzorka [ml], Cpr - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml]. Molarni apsorpcioni koeficijent za konjugat MDA-TBA iznosi  $1,56 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Koncentracija MDA je izražena u nmol/mg proteina.

### 3.2.9.3. Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Princip: U reakciji ksantina sa ksantin oksidazom stvara se superoksid anjon radikal, koji redukuje oksidovani citohrom c. Brzina redukcije se prati spektrofotometrijski na 550 nm. Superoksid dismutaza (SOD) katalizuje reakciju dismutacije superoksid anjon radikala i tako smanjuje brzinu redukcije citohroma c. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD. Aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije citohroma c za 50%, pri promeni apsorbanca od 0,025/min, definisana je kao jedinica aktivnosti ovog enzima [220].

Izvođenje analize: Za izvođenje analize pripremljeni su rastvor I (50 µl 100 mmol EDTA, 50 µl 30 mmol  $\text{NaN}_3$ , 500 µl 5mM ksantina, 200 µl 5 mmol citohroma c, dopunjeno do 50 ml 0,1 M fosfatnim puferom pH 7,8) i rastvor II (400 µl 1 mmol EDTA, 3595 µl 0,1 M fosfatni pufer pH 7,8, 20 µl ksantin oksidaze aktivnosti 50 U / 2 ml). U spektrofotometrijsku kivetu je pipetirano 650 µl rastvora I, 200 µl uzorka (suspenzije ćelija) i 50 µl rastvora II. Dodatkom rastvora II počela je reakcija, a apsorbanca je praćena tokom 3 minuta na talasnoj dužini od 550 nm.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost SOD} = \frac{\Delta\text{Asp} \times 50 \times 1000}{\Delta\text{Auz} \times 100 \times \text{Cpr}}$$

pri čemu je:  $\Delta\text{Auz}$  - srednja promena apsorbance uzorka u minuti,  $\Delta\text{Asp}$  - srednja promena apsorbance slepe probe u minuti, Cpr - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml].

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

#### 3.2.9.4. Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT)

Princip: Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u prisustvu katalaze na 240 nm, jer na toj talasnoj dužini vodonik peroksid pokazuje maksimum apsorpcije svetlosti. Pad apsorbance tokom vremena proporcionalan je aktivnosti katalaze u uzorku [221].

Izvođenje analize: U 0,05 M fosfatni pufer pH vrednosti 7 je odmeren 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  u količini da apsorbance slepe probe na 240 nm bude u opsegu 0,525-0,550. U 1,5 ml podešenog rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  u fosfatnom puferu je dodato 10  $\mu\text{l}$  uzorka nakon čega započinje reakcija. Pad apsorbance na 240 nm je praćen tokom 3 minuta na temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje rezultata:

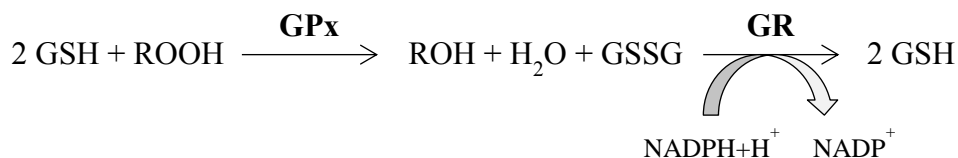
$$\text{Specifična aktivnost CAT} = \frac{(\Delta\text{Auz} - \Delta\text{Asp}) \times \text{Vrs} \times 1000}{43,6 \times \text{Vuz} \times \text{Cpr}}$$

pri čemu je:  $\Delta\text{Auz}$  - srednja promena apsorbance uzorka u minuti,  $\Delta\text{Asp}$  - srednja promena apsorbance slepe probe u minuti, Vrs - zapremina reakcione smeše [ml], Vuz - zapremina uzorka [ml], Cpr - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml].

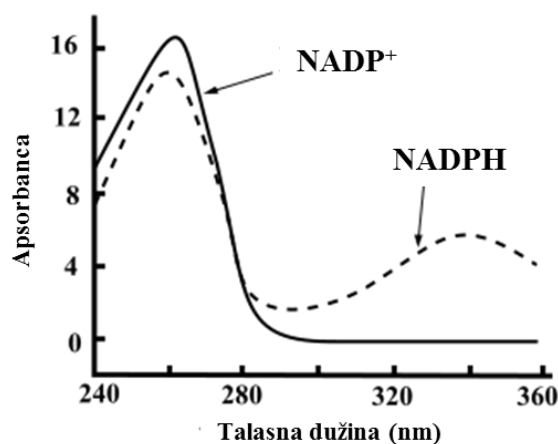
Specifična aktivnost CAT je izražena u jedinicama aktivnosti enzima na mg proteina u uzorku.

### 3.2.9.5. Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Princip: Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) je zasnovano na sledećoj reakciji:



GPx katalizuje redukciju organskog peroksida uz nastajanje oksidovanog glutationa (GSSG), koji se zatim ponovo redukuje do redukovanog glutationa (GSH) pomoću NADPH, kao donora redukcionih ekvivalenata, u reakciji koju katalizuje enzim glutation reduktaza (GR). Aktivnost GPx se prati spektrofotometrijski, indirektno, praćenjem pada apsorbance na 340 nm, s obzirom da na toj talasnoj dužini apsorbuje svetlost NADPH, dok NADP<sup>+</sup> ne pokazuje taj apsorpcioni maksimum (slika 3.1.) [222].



**Slika 3.1.** Princip određivanja aktivnosti glutation peroksidaze i glutation reduktaze merenjem pada apsorbance na 340 nm koja potiče od NADPH

Izvođenje analize: U epruvete se dodaje po 500  $\mu\text{l}$  vode, 100  $\mu\text{l}$  1 mM rastvora GSH, 200  $\mu\text{l}$  0,2 mM rastvora NADPH, 35  $\mu\text{l}$  1 mM rastvora EDTA, 100  $\mu\text{l}$  0,5 M fosfatnog pufera pH vrednosti 7, 35  $\mu\text{l}$  30 mM t-butil-hidroperoksida i 50  $\mu\text{l}$  uzorka. Smeša je inkubirana tokom 10 min na 37 °C. Reakcija je otpočeta dodatkom 1,7  $\mu\text{l}$  glutation reduktaze (GR) aktivnosti 105 U/mg proteina. Pad apsorbance na 340 nm je očitavan u toku 3 minuta. U slepu probu je umesto GR dodato 1,7  $\mu\text{l}$  destilovane vode.

Izračunavanje rezultata:

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

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

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

### 3.2.9.6. Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Princip: Glutation reduktaza (GR) katalizuje redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) do redukovane forme (GSH), uz NADPH kao donor redukcionih ekvivalenata. Aktivnost GR se određuje spektrofotometrijski, indirektno, preko brzine oksidacije NADPH, čiji se maksimum apsorbancije meri na 340 nm (Slika 3.1.) [223].

Izvođenje analize: U epruvete je odmereno po 200  $\mu\text{l}$  0,5 M fosfatnog pufera pH 7,4, 300  $\mu\text{l}$  2 mM GSSG, 300  $\mu\text{l}$  uzorka i vode do 1 ml. Reakcija je otpočeta dodavanjem 30  $\mu\text{l}$  0,1 mM rastvora NADPH. Promena apsorbance na 340 nm je praćena tokom 3 minuta na optimalnoj temperaturi reakcije od 37 °C.

Izračunavanje rezultata:

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

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

Specifična aktivnost GR je definisana kao broj nmol NADPH oksidovanih u minutu po mg proteina.

### 3.2.9.7. Određivanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)

Princip: Glutation-S-transferaza (GST) katalizuje reakciju konjugacije 1-hloro-2,4-dinitro-benzena (CDNB) sa tiolnom grupom glutaciona. Nastali konjugat CDNB-S-glutation ima maksimum apsorpcije na 340 nm. Merenjem promene apsorpcije na toj talasnoj dužini određuje se aktivnost enzima [224].

Izvođenje analize: U epruvete je odmereno po 200 µl 0,5 M fosfatnog pufera pH 6,5, 20 µl 25 mM rastvora CDNB u koncentrovanom etanolu i 680 µl destilovane vode. Nakon inkubacije na 37 °C u trajanju od 10 min u smešu je pipetirano 50 µl 20 mM redukovanog glutaciona (GSH) i 50 µl uzoraka homogenata tkiva i ćelijske kulture, a u slepu probu 50 µl destilovane vode. Promena apsorbanca na 340 nm je praćena tokom 3 minuta.

Izračunavanje rezultata:

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

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

Specifična aktivnost GST je izražena kao broj nmol konjugata formiranog u minutu po mg proteina.

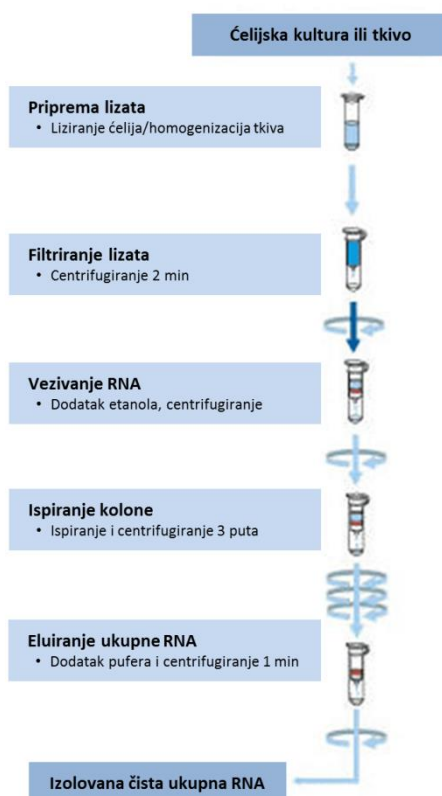
### 3.2.10. Genska ekspresiona analiza u HT-29 ćelijama i uzorcima jetre i intestinuma eksperimentalnih životinja

Kvantifikacija genske ekspresije rađena je primenom metode kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR). RNA je najpre izolovana iz uzoraka tkiva i ćelija, zatim je reverznom transkripcijom sintetisana njena komplementarna DNA (cDNA) i primenom gen-specifičnih prajmera određen nivo ekspresije ispitivanih gena, odnosno količina odgovarajućih mRNA.

#### 3.2.10.1. Izolacija, kvantifikacija i procena kvaliteta RNA

Delovi uzoraka tkiva jetre i intestinuma eksperimentalnih životinja, kao i oko 5 miliona HT-29 ćelija po eksperimentalnoj grupi, čuvani su u RNA stabilizacionom rastvoru *RNAlater*<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Nemačka) na -20°C do momenta izolovanja (ekstrakcije) RNA. RNA je izolovana iz uzoraka tkiva i ćelija pomoću GenElute mammalian total RNA miniprep komercijalnog seta (Sigma-Aldrich, Nemačka), koji sadrži sve potrebne reagense i silikon-membranozne kolone za izolaciju ukupne RNA. U skladu sa uputstvima proizvođača, nakon uklanjanja *RNAlater*<sup>®</sup> rastvora, uzorci tkiva i ćelija su homogenizovani u 500 µl rastvora za liziranje koji sadrži gvanidin tiocijanat i 2-merkaptetanol. U ovom koraku dolazi do denaturacije makromolekula i inaktivacije ribonukleaza (RNaza), ubikvitarnih i veoma stabilnih proteina koji se oslobađaju iz ćelijskih kompartmana kada dođe do razaranja ćelija i stoga predstavljaju problem pri izolaciji RNA. Lizat je zatim nanet na filtracionu kolonu, vršeno je centrifugiranje 2 minuta na 12000 obrtaja/min i temperaturi od 4 °C, pri čemu je na koloni zaostao ćelijski debris. Filtrat koji sadrži RNA je razblažen sa 500 µl 70% etanola i nanet na novu kolonu od modifikovanog silika gela na koju se vezuje RNA. Nakon vezivanja RNA, na kolonu su naneti rastvori za ispiranje, najpre rastvor koji sadrži gvanidin tiocijanat i koji treba da eliminiše eventualno zaostale ili naknadno unete RNaze, a zatim i drugi rastvor za ispiranje koji je razblažen sa apsolutnim etanolom. Nakon prva dva nanošenja, kolona je centrifugirana po 15 sekundi, a nakon poslednjeg ispiranja 2 minuta, kako bi sav etanol bio uklonjen sa kolone, jer bi eventualno prisustvo etanola u krajnjem uzorku koji sadrži RNA dovelo do inaktivacije reverzne transkriptaze i nemogućnosti sinteze cDNA. Nakon ispiranja sledi faza elucije u kojoj je na kolonu sa vezanom RNA u novoj mikrotubi naneto 100 µl (2 x 50 µl) elucionog rastvora i centrifugirano 1 minut na 12000 obrtaja/min, pri čemu je dobijen rastvor čiste ukupne RNA u elucionom puferu (Slika 3.2.).



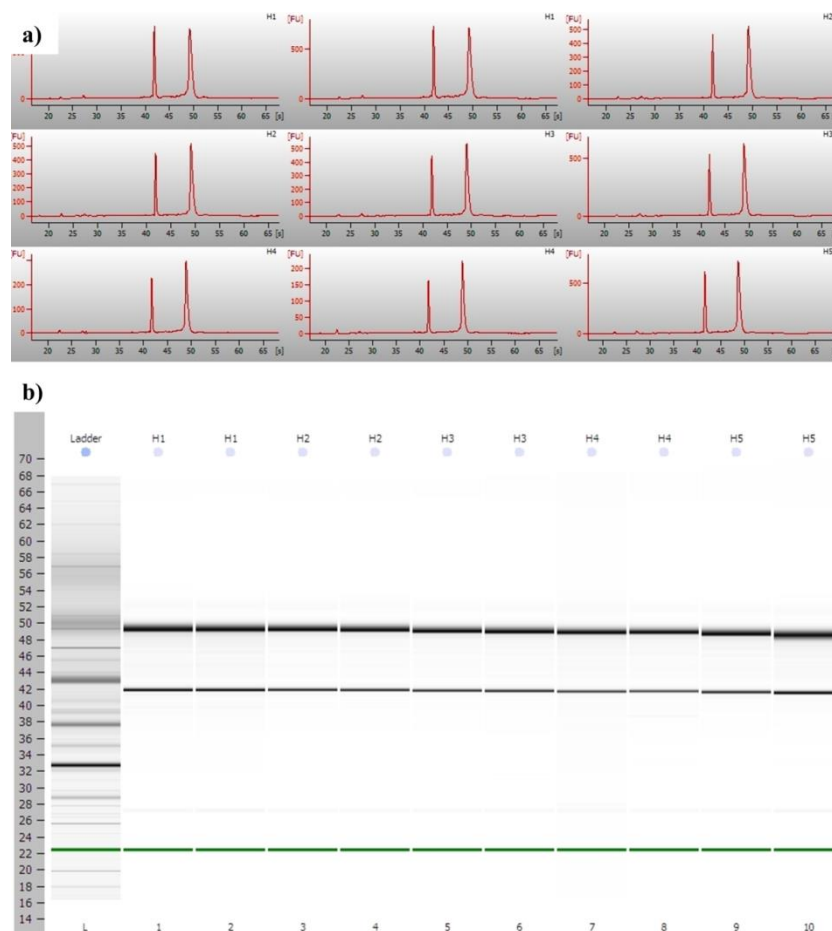


**Slika 3.2.** Shematski prikaz izolacije RNA iz uzoraka ćelija i tkiva pomoću komercijalnog seta za izolaciju sa kolonama [225]

Koncentracija i čistoća izolovane RNA je određena spektrofotometrijski pomoću Nanodrop aparata (BioSpec-Nano, Shimadzu Scientific Instruments, Japan). Nukleinske kiseline imaju karakterističan maksimum apsorpcije UV svetlosti na talasnoj dužini od 260 nm, te se merenjem apsorbance na ovoj talasnoj dužini može kvantifikovati izolovana RNA. Koncentracija RNA je izražena u ng/μl. U cilju ispitivanja čistoće uzoraka RNA određen je i odnos apsorbanci na talasnim dužinama 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), kao i odnos na 260 nm i 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ), s obzirom da na talasnoj dužini od 280 nm apsorbuju prvenstveno proteini i fenoli kao kontaminanti, dok na 230 nm apsorbuje svetlost veliki broj organskih jedinjenja (EDTA, ugljeni hidrati, fenoli). Za uzorke u kojima je odnos  $A_{260}/A_{280}$  imao vrednost veću od 1,8 i odnos  $A_{260}/A_{230}$  imao vrednost veću od 2 smatrano je da poseduju čistu izolovanu RNA koja se dalje može koristiti za amplifikaciju i kvantifikaciju.

Provera kvaliteta, odnosno integriteta izolovane ukupne RNA, sprovedena je primenom *Lab-on-a-Chip* tehnologije („laboratorija na čipu“) na uređaju Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, SAD) pomoću komercijalnog Agilent RNA 6000 Nano LabChip<sup>®</sup> seta, u skladu sa uputstvima proizvođača. Bioanalyzer 21000 kvantifikuje 28S i 18S ribozomalnu RNA (rRNA), a metoda se zasniva na principima mikrokapilarne elektroforeze i

laserski indukovane fluorescentne spektroskopije. Uzorci izolovane RNA, kao i standard RNA fragmenata poznate veličine i koncentracije (*RNA ladder*), naneti su u zapremini od po 1  $\mu$ l na čip-pločicu čija se unutrašnjost sastoji od mreže tankih kanala ispunjenih gelom, puferom i bojom. Fragmenti RNA se elektroforetski razdvajaju na gelu, boja se inkorporira u molekule RNA koji se stoga mogu detektovati i kvantifikovati merenjem laserski indukovane fluorescencije. Rezultati se prikazuju u obliku elektroferograma ili virtuelnog gela, a pomoću Agilent 2100 Expert softvera se izračunava RIN (*RNA integrity number*) vrednost, kao indikator kvaliteta izolovane RNA. RIN vrednosti se opisuju na skali od 1 (potpuno degradirana RNA) do 10 (potpuno intaktna RNA), pri čemu se RIN vrednosti iznad 5 smatraju prihvatljivim za dalje analize [226]. RIN vrednosti ispitivanih uzoraka su se kretale u opsegu 8,6-9,5 za izolovanu RNA iz tkiva jetre, 6,5-8,3 za RNA iz intestinuma i 10 za RNA iz HT-29 ćelija, što ukazuje da su uzorci izolovane RNA bili minimalno degradirani i adekvatni za dalju reverznu transkripciju i amplifikaciju pomoću qRT-PCR metode. Elektroferogrami i virtualni gel prikazi izolovane RNA iz uzoraka HT-29 ćelija prikazani su na slici 3.3.



**Slika 3.3.** Elektroferogrami (a) i virtualni gel prikazi (b) izolovane RNA iz uzoraka HT-29 ćelija

### 3.2.10.2. Reverzna transkripcija

U cilju kvantifikovanja genske ekspresije, mRNA se mora konvertovati u odgovarajuću komplementarnu DNA (cDNA) pre izvođenja lančane reakcije polimeraze. Sinteza cDNA od svakog uzorka RNA je izvedena pomoću Enhanced Avian First Strand Synthesis komercijalnog seta (Sigma-Aldrich, Nemačka), u skladu sa preporukama proizvođača. Kao matrica za reverznu transkripciju upotrebljen je 1 µg RNA iz svih uzoraka tkiva i ćelija, čime je omogućena normalizacija, odnosno dalji rad sa jednakim koncentracijama RNA za različite uzorke iz jednog tkiva. Uzorci RNA su reverzno transkribovani upotrebom enzima reverzne transkriptaze poreklom iz alfaretrovirusa (*avian myeloblastosis virus*), a pomoću nespecifičnih oligo (dT)<sub>23</sub> prajmera i nasumičnih (*random*) nonamera. U reakcionu smešu su dodati još i smeša deoksinukleotida, pufer za reverznu transkriptazu i voda do ukupne zapremine od 20 µl. Oligo (dT)<sub>23</sub> prajmeri predstavljaju sekvencu od 23 deoksi-timin (dT) nukleotida i pogodni su za sintezu cDNA jer se hibridizuju sa poli-A repom mRNA, dok *random* nonameri predstavljaju sekvencu od 9 potpuno nasumičnih deoksi-ribonukleotida. Reverzna transkripcija se odvijala u PCR aparatu, odnosno thermocycler-u (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems) tokom 50 minuta na temperaturi od 50 °C. Sintetisana cDNA je čuvana na temperaturi od -20 °C do izvođenja qRT-PCR analize.

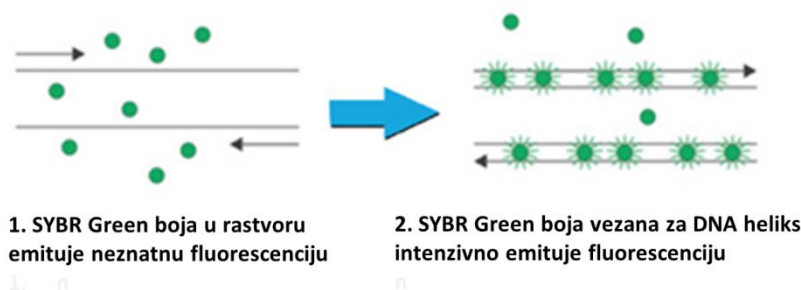
### 3.2.10.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantifikacija ekspresije ispitivanih gena iz uzoraka tkiva i ćelija, nakon izolacije RNA i sinteze cDNA, rađena je primenom metode kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR). Osnovni cilj kvantifikacije genske ekspresije je poređenje ekspresije gena od interesa u različitim organima ili ćelijskim linijama između eksperimentalnih grupa i netretirane, kontrolne, grupe.

PCR metod se zasniva na umnožavanju sekvenci nukleinskih kiselina u tri koraka: denaturacija, odnosno razdvajanje lanaca DNA, hibridizacija oligonukleotidnih graničnika-prajmera (*annealing*) i elongacija lanca tokom kojih DNA polimeraza kreira dvostruku DNA u regionu ograničenom oligonukleotidnim prajmerima. Kvantitativni PCR metod (qRT-PCR) se zasniva na detekciji i kvantifikaciji intenziteta fluorescentnog signala koji se povećava proporcionalno akumulaciji PCR produkta sa svakim ciklusom amplifikacije.

Jedna od najčešće primenjivanih tehnika qRT-PCR metode podrazumeva upotrebu SYBR Green boje, koja nakon vezivanja za dvolančanu DNA emituje karakterističan

fluorescentni signal, koji odražava količinu DNA produkta nastalog tokom PCR amplifikacije. S obzirom da SYBR Green boja fluorescira samo kad je vezana za dvolančanu DNA, tokom inicijalnih ciklusa qRT-PCR, signal fluorescencije je obično previše slab da bi bio detektovan, odnosno na nivou je signala koji emituje negativna kontrola koja ne sadrži uzorak (*non-template control*, NTC). Tokom eksponencijalne faze qRT-PCR, signal fluorescencije se udvostručuje tokom svakog ciklusa, nakon čega sledi linearna faza u kojoj je brzina reakcije smanjena, jer je redukovana količina DNA polimeraze dostupne za reakciju. U momentu kada je količina slobodnog enzima nedovoljna da se nastavi amplifikacija, intenzitet signala fluorescencije počinje da dostiže plato, što ukazuje na to da je qRT-PCR dostigao status saturacije amplifikovanim DNA proizvodom.



**Slika 3.4.** Princip SYBR Green tehnike qRT-PCR [227]

Detekcija PCR amplifikacije pomoću qRT-PCR se vrši u eksponencijalnoj fazi, u kojoj je reakcija visoko specifična i precizna i u kojoj se amplifikacija najbrže dešava. Pragovna vrednost fluorescencije (*threshold*), odnosno nivo fluorescencije koji treba da se detektuje za svaki uzorak, postavlja se u eksponencijalnoj fazi reakcije, a zatim se softverski detektuju i analiziraju podaci o broju PCR ciklusa neophodnih za dobijanje zahtevanog nivoa fluorescencije. Ova vrednost se naziva prag ciklusa (*cycle threshold*) ili Ct vrednost. Uzorci se međusobno razlikuju po broju PCR ciklusa koji im je potreban da dostignu zadatu vrednost fluorescencije i što je veća početna količina nekog gena u uzorku, to mu je potrebno manje ciklusa da dostigne zadatu fluorescenciju, odnosno manja je Ct vrednost, i obrnuto. Kvantifikacija genske ekspresije se zasniva na linearnoj zavisnosti između Ct vrednosti i logaritma inicijalne koncentracije amplifikovanog templata, odnosno mRNA za gen od interesa. Kako bi se eliminisala varijabilnost u inicijalnoj koncentraciji i kvalitetu izolovane RNA, kao i u efikasnosti konverzije prilikom reakcije reverzne transkripcije, nivo ekspresije ciljnog gena je normalizovan u odnosu na nivo referentnog gena kao endogene kontrole. Referentni ili *housekeeping* geni predstavljaju gene koji pokazuju stabilnu i konstitutivnu ekspresiju u svim ćelijama i tkivima, nezavisnu od eksperimentalne procedure. Za svaki

uzorak se određuje razlika broja ciklusa neophodnih da se dostigne isti nivo fluorescencije ( $\Delta Ct = Ct$  gena od interesa -  $Ct$  referentnog gena), na osnovu čega se izračunava količina mRNA za svaki ispitivani gen, odnosno ekspresija svakog ispitivanog gena.

U našim eksperimentima, mereni su nivoi ekspresije gena od interesa pomoću kvantitativne *real-time* PCR metode, upotrebom Power SYBR Green PCR Master Mix kompleta (Applied Biosystems, SAD), koji sadrži Taq DNA polimerazu, smešu deoksi nukleotid 3-fosfata,  $Mg^{2+}$ , pufer, dejonizovanu sterilnu vodu, fluoroforu SYBR Green, kao i inertnu ROX boju čija se fluorescencija ne menja tokom reakcije i u odnosu na koju se normalizuje fluorescencija SYBR Green boje. Kao referentni geni u našim eksperimentima korišćeni su gen za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) u uzorcima tkiva životinja i *ACTB* gen za  $\beta$ -aktin u uzorcima humane HT-29 ćelijske linije. Za referentne i ciljne gene dizajnirani su specifični oligonukleotidni prajmeri, koristeći Primer Express 3.0 softver (Applied Biosystems, SAD) i primjenjujući strategiju povezivanja egzona, kako bi se izbegla amplifikacija genomske DNA. *In silico* testiranjem pomoću NCBI Primer-BLAST programa je isključena homologija dizajniranih sekvenci prajmera sa pseudogenima i drugim neželjenim hibridizacionim metama. Prajmeri su sintetisani od strane kompanije Invitrogen, SAD. U tabeli 3.1. je data lista prajmera za humani genom i prajmera za genom vrste *Rattus norvegicus* koji su korišćeni u qRT-PCR analizi. Analizirana je ekspresija 15 gena u uzorcima humanih HT-29 ćelija i 16 gena u uzorcima tkiva jetre i intestinuma eksperimentalnih životinja.

Reakcione ploče sa 96 otvora (MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, SAD) su sadržale reakcione smeše ispitivanih uzoraka u triplikatu, kao i kontrole bez matrice cDNA (NTC). NTC kontrole su korisne u cilju detekcije PCR kontaminacije i/ili formiranja dimera prajmera. Reakciona smeša ukupnog volumena 20  $\mu$ l se sastojala od 5  $\mu$ l cDNA, 5  $\mu$ l 2,4  $\mu$ M smeše *forward* i *reverse* prajmera i 10  $\mu$ l Power SYBR Green Master Mix-a (Applied Biosystems, SAD), koji sadrži sve komponente neophodne za PCR amplifikaciju. U otvore sa NTC je umesto cDNA pipetirano 5  $\mu$ l sterilne vode za molekularnu biologiju (Sigma-Aldrich, Nemačka). qRT-PCR analiza je izvedena na uređaju StepOne Plus (Applied Biosystems, SAD), amplifikacijom od 50 ciklusa, a svaki ciklus se sastojao od denaturacije na 95 °C tokom 15 sekundi i potom hibridizacije i elongacije na 60 °C u trajanju od 1 minut. Detektovani fluorescentni signal produkata PCR amplifikacije je automatski analiziran standardnim softverskim paketom (Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR software v. 2.0).

Broj kopija gena u amplikonu je izražen aritmetičkom formulom  $2^{-\Delta Ct}$ , pri čemu je:

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

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

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

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

**Tabela 3.1.** Sekvence prajmera korišćenih u qRT-PCR ekspresionoj analizi

NCBI genska sekvenca	Gen	Vrsta		Sekvenca prajmera (5' → 3')	Dužina produkta
NM_017059.2	<i>Bax</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	CCGCGTGGTTGCCCTCTTCT	159
			R	AGGCCTTCCCAGCCACCCTG	
NM_016993.1	<i>Bcl2</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	GATCCAGGATAACGGAGGCT	102
			R	CTGAGCAGCGTCTTCAGAGA	
NM_030989.3	<i>p53</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	CCAAGAAGGGCCAGTCTACGT	57
			R	GCCCCACTTTCTTGATCATTG	
NM_017050.1	<i>Sod1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	TTCGAGCAGAAGGCAAGCGGTG	176
			R	TCTTCATCCGCTGGACCGCCA	
NM_012520.2	<i>Cat</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	CTGTCCCTACCGTGCTCGCG	81
			R	TTGGGAGCACCACCCTGGTTGT	
NM_030826.4	<i>Gpx</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	TCGGACATCAGGAGAATGGCAAGAA	163
			R	GCTGGCAAGGCATTCCGCAG	
NM_053906.2	<i>Gr</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	GTGGTCTTCAGCCACCCGCC	110
			R	ATCGGGGTGAAGGCGGTCGA	
NM_012675.3	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	AGCCCTGGTATGAGCCCATGTA	109
			R	CCGGACTCCGTGATGTCTAAGT	
NM_012611.3	<i>Nos2</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	CACCTACTTCCTGGACATCACTAC	121
			R	GTACTCTGAGGGCTGACACAAG	
NM_017232.3	<i>Ptgs2 (Cox2)</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	CATGATCTACCCTCCCCACG	67
			R	CAGACCAAAGACTTCCCTGCC	
NM_024390.2	<i>Pgdh</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	CAGTTCGAACCTCAGAAGACACT	191
			R	GTCCCACTGATAACAGAAACCAA	
NM_199267.2	<i>NF<math>\kappa</math>B</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	AGTGCGGGACCCATCAGGCA	84
			R	GCAGTGTTGGGGGCACGGTT	
NM_021745.1	<i>Fxr</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F	GTGACAAAGAAGCCGCGAAT	114
			R	GCAGGTGAGCGCGTTGTAAT	

NM_057133.1	<i>Shp</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F R	CCCAAGGAGTACGCATACCTGA TCCAGGACTTCACACAATGCC	125
NM_001025409.1	<i>Hdac1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F R	ACTACGACGGGGATGTTGG GAATCTCTGCATCTGCTTGCT	242
NM_053447.1	<i>Hdac2</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F R	CCCTCAAACATGACAAACCA TGTCAGGGTCTTCTCCATCC	169
NM_017008.4	<i>Gapdh</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	F R	TTCAACGGCACAGTCAAGGC TCACCCCATTTGATGTTAGCG	101
NM_138764.4	<i>BAX</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC GCAATCATCCTCTGCAGCTC	168
NM_001010922.2	<i>BCL2</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	GATTCAGGAGAGCCTTGTCT GTATAGCTCCTGTCTGTCCCTTA	142
NM_001126118.1	<i>TP53</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	TGCTCAGATAGCGATGGTCT ACAGTCAGAGCCAACCTCAG	144
NM_053056.2	<i>CiklinD1 (CCND1)</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	GGAGCTGCTGCAAATGGA GGCGGATTGGAAATGAACT	195
NM_003998.3	<i>NFκB</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	CACAAGGAGACATGAAACAGC CCAGAGACCTCATAGTTGTCCA	187
NM_000860.5	<i>PGDH</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	TGGAACCTATCTTGGTTTGGGA GATTAGCAGCCAACGCTG	173
NM_001024466.1	<i>SOD</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	CGTCACCGAGGAGAAGTACC CTGATTTGGACAAGCAGCAA	196
NM_001752.3	<i>CAT</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	TCCACTGTTGCTGGAGAATC ATGTCCGGATCCTTCAGATG	203
NM_000637.3	<i>GR</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	TCTCCCAGGTCAAGGAGGT ATCGGTTTGAATCCCCAGTT	182
NM_145740.3	<i>GST</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	GAGAGAGCCCTGATTGATATGTA GCCAACAAGGTAGTCTTGTCC	189
NM_001145412.2	<i>NRF2</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	CCAACACTCCCAGGTTGC CGTAGCCGAAGAAACCTCAT	119
NM_001206993.1	<i>FXR</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	ACAAAGTCATGCAGGGAGAA GTACATGATTGGTTGCCATTTT	181
NM_021969.2	<i>SHP</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	TCCTCTTCAACCCCGATGT AAGAAGAGGTCCCCAAGCAG	193
NM_004964.2	<i>HDAC1</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	CTGTGGCAAGTGCTGTGAA CCCTCTGGTGATACTTTAGCAG	159
NM_001527.3	<i>HDAC2</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	TGACAAACCAGAACACTCCAG GCTTGTCTGATGCTCGAATAG	189
NM_001101.3	<i>ACTB (β-aktin)</i>	<i>Homo sapiens</i>	F R	GGCATCCTCACCCCTGAAGTA ACATGATCTGGGTCATCTTCTC	184

### 3.2.11. Statistička analiza rezultata

Statistička obrada rezultata je urađena standardnim metodama. Sve analize su urađene u triplikatu, a za statističku obradu su uzete srednje vrednosti analiza u triplikatu. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički u vidu aritmetičke sredine  $\pm$  standardna devijacija (SD). Za ispitivanje stepena zavisnosti između promenljivih korišćena je regresiona analiza, a jačina zavisnosti je utvrđena Pearson-ovim koeficijentom linearne korelacije. Određivanje stepena značajnosti razlika između srednjih vrednosti parametara je urađeno jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa Fišerovim LSD (*least significant difference*) i Takijevim *post-hoc* testovima, kao i dvoparametarskim Studentovim t-testom za nezavisne varijable. Za određivanje stepena značajnosti razlika između srednjih vrednosti zavisnih parametara korišćen je Studentov t-test parova. Kao granica statističke značajnosti je uzeta vrednost  $p < 0,05$ . Softverski paket SPSS (verzija 19.0; IBM Institute Inc., SAD) je korišćen u svim analizama.

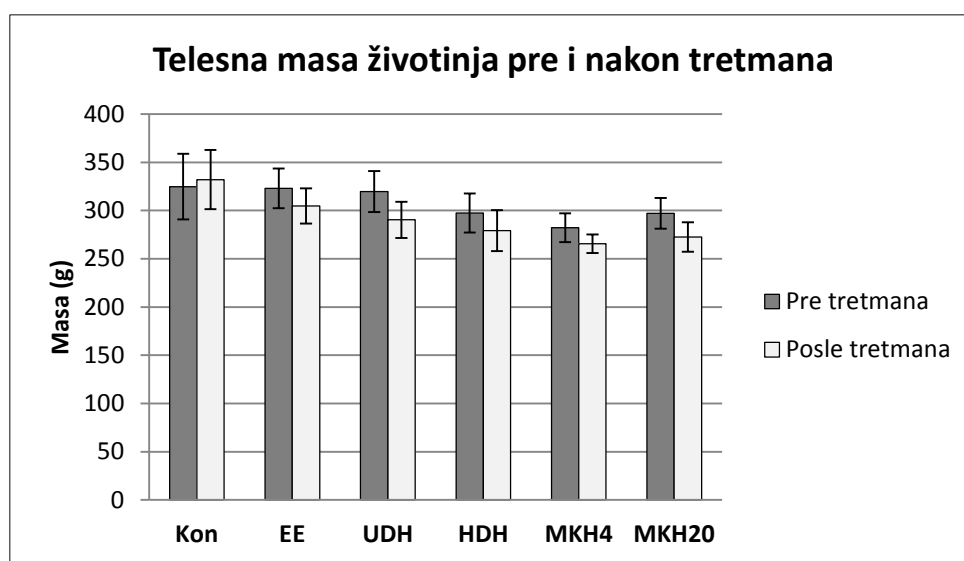


## 4. Rezultati

### 4.1. Rezultati *in vivo* studije na životinjama

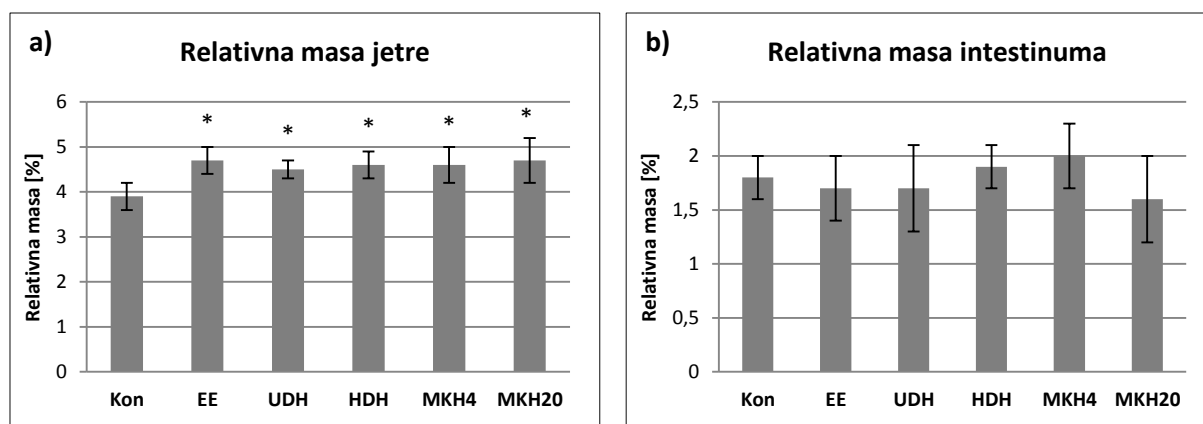
#### 4.1.1. Uticaj eksperimentalnog tretmana na vrednosti telesne mase životinja

Telesne mase oglednih životinja su izmerene prvog dana, pre davanja prve doze etinil-estradiola, odnosno čistog rastvarača kod kontrolne grupe, kao i šestog dana, neposredno pre eutanazije. Na grafikonu 4.1. su prikazane promene telesne mase životinja tokom petodnevnog eksperimentalnog perioda. Uočava se da je samo u kontrolnoj grupi životinja, kod kojih nije izazvana holestaza, došlo do porasta u prosečnoj telesnoj masi, dok je u grupama životinja sa indukovanom holestazom došlo do smanjenja telesne mase, bez obzira na dodatni primenjeni agens. Primenom Studentovog t-testa parova utvrđeno je da porast mase u kontrolnoj grupi nije bio statistički značajan, dok su smanjenja mase, pre i posle tretmana, bila statistički značajna u svim eksperimentalnim grupama ( $p < 0,05$ ).



**Grafikon 4.1.** Uticaj eksperimentalnog tretmana na telesne mase kod oglednih životinja

Osim telesne mase životinja na početku i kraju eksperimentalnog protokola, zabeležene su i vrednosti mase uzorkovanih jetri i intestinuma nakon eutanazije. Na grafikonu 4.2. su prikazane vrednosti relativnih masa ovih organa, izražene u procentima, odnosno kao gram organa na 100 g telesne mase. Nakon petodnevnog tretmana, uočeno je statistički značajno povećanje relativne mase jetre u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolne, zdrave životinje, dok među grupama životinja sa izazvanom holestazom nije bilo statistički značajnih razlika u relativnoj masi jetre. S druge strane, nijedan eksperimentalni tretman nije doveo do značajnih promena u masi intestinuma.



**Grafikon 4.2.** Uticaj eksperimentalnog tretmana na relativne mase jetre (a) i intestinuma (b) kod oglednih životinja nakon 5 dana. \* $p < 0,05$  vs. Kon

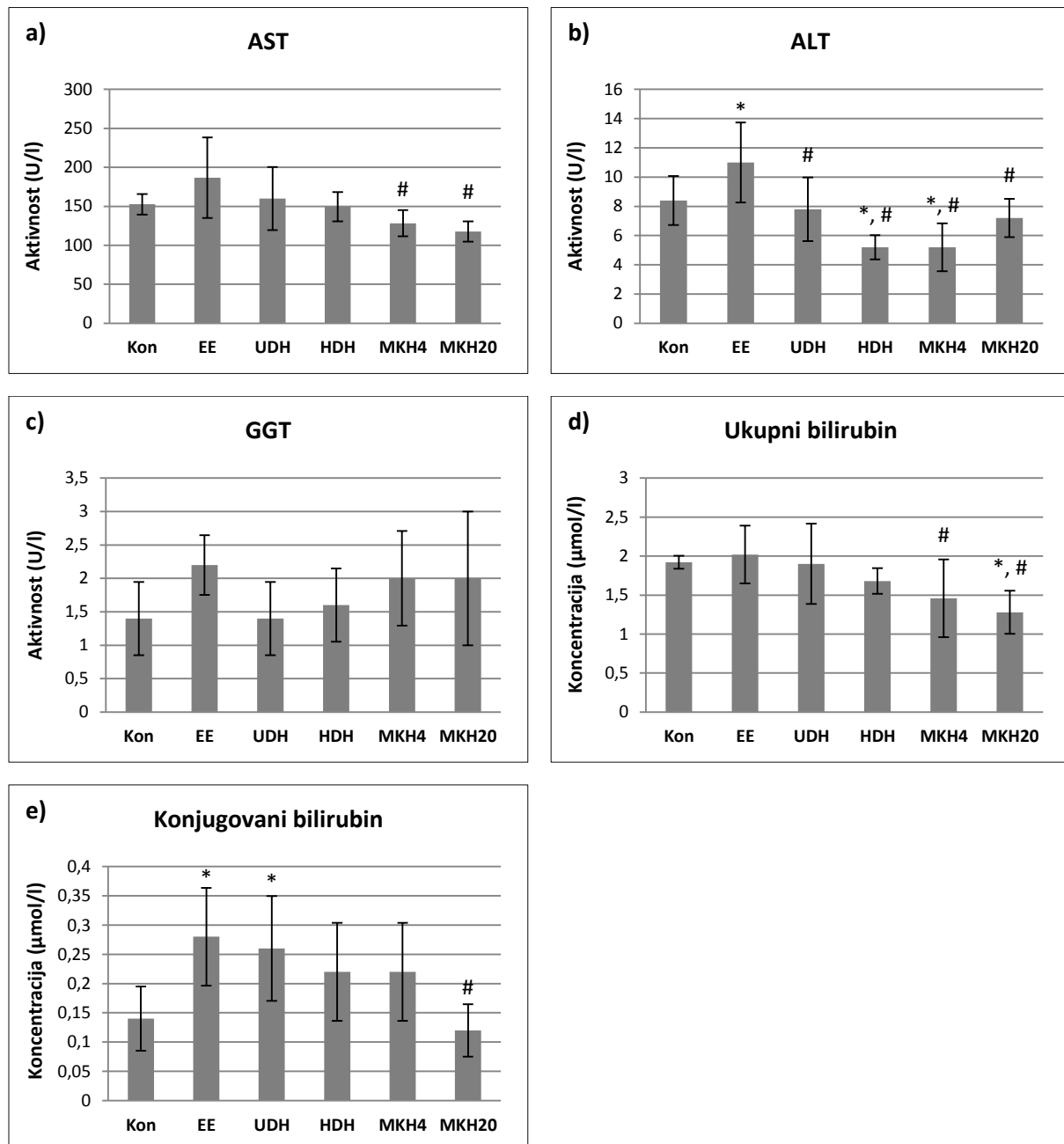
#### 4.1.2. Uticaj žučnih kiselina na vrednosti biohemijskih parametara u serumu životinja

Biohemijski markeri oštećenja hepatocita su određeni u serumu oglednih životinja i rezultati su prikazani u tabeli 4.1. i na grafikonu 4.3.

**Tabela 4.1.** Vrednosti biohemijskih parametara u serumu životinja

Biohemijski parametar	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
AST (U/l)	152,6 ± 13,1	186,8 ± 51,6	160,0 ± 40,4	149,4 ± 18,7	128,2 ± 16,8	117,8 ± 12,9
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )	/	vs. MKH4, MKH20	vs. MKH20	/	vs. EE	vs. EE, UDH
ALT (U/l)	8,40 ± 1,67	11,00 ± 2,74	7,80 ± 2,17	5,20 ± 0,84	5,20 ± 1,64	7,20 ± 1,30
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )	vs. EE, HDH, MKH4	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. EE, HDH, MKH4	vs. Kon, EE, UDH	vs. Kon, EE, UDH	vs. EE
GGT (U/l)	1,40 ± 0,55	2,20 ± 0,45	1,40 ± 0,55	1,60 ± 0,55	2,00 ± 0,71	2,00 ± 1,00
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )	/	/	/	/	/	/
Ukupni bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	1,92 ± 0,08	2,02 ± 0,37	1,90 ± 0,51	1,68 ± 0,16	1,46 ± 0,50	1,28 ± 0,28
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )	vs. MKH20	vs. MKH4, MKH20	vs. MKH20	/	vs. EE	vs. Kon, EE, UDH
Konjugovani bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,14 ± 0,05	0,28 ± 0,08	0,26 ± 0,09	0,22 ± 0,08	0,22 ± 0,08	0,12 ± 0,04
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )	vs. EE, UDH	vs. Kon, MKH20	vs. Kon, MKH20	vs. MKH20	vs. MKH20	vs. EE, UDH, HDH, MKH4

Tretman etinil-estradiolom, kao induktorom holestaze kod životinja, doveo je do povećanja aktivnosti aminotransferaza u serumu. Aspartat-aminotransferaza (AST) i alanin-aminotransferaza (ALT) se nalaze u mnogim organima, ali im je najveća aktivnost prisutna u jetri. Povećanje ALT u grupi tretiranoj etinil-estradiolom je bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,03$  vs. Kon), dok je kod AST to povećanje bilo manje izraženo. Tretman sa sve tri žučne kiseline (UDH, HDH i MKH) je doveo do smanjenja vrednosti AST i ALT u odnosu na model grupu životinja sa holestazom (EE).



**Grafikon 4.3.** Vrednosti biohemijskih parametara u serumu životinja. \* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. EE

Sličan profil aktivnosti je pokazan za gama-glutamil transferazu (GGT) kao za aminotransferaze, ali u ovom slučaju nisu utvrđene statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa s obzirom na generalno niske vrednosti ovog enzima kod pacova i primenjenu analitičku metodu. GGT je enzim ćelijskih membrana čija je najveća aktivnost prisutna u bubrežnim tubulima, zatim u pankreasu i jetri, ali je specifičniji pokazatelj holestatskih oboljenja u odnosu na AST i ALT.

Koncentracije ukupnog i konjugovanog bilirubina su takođe određene, kao pokazatelji ekskretorne funkcije jetre. Indukovana holestaza kod životinja je dovela do blagog povećanja vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na kontrolne, zdrave životinje, dok je porast koncentracije konjugovanog bilirubina bio znatno izraženiji, što je karakteristično za holestatske poremećaje. Tretman svim žučnim kiselinama je doveo do smanjenja serumskih vrednosti konjugovanog bilirubina, ali je to smanjenje bilo statistički značajno samo kod životinja tretiranih sa MKH u dozi od 20 mg/kg, u odnosu na model grupu životinja sa indukovanom holestazom ( $p=0,003$  vs. EE).

#### 4.1.3. Uticaj žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u jetri i intestinumu životinja

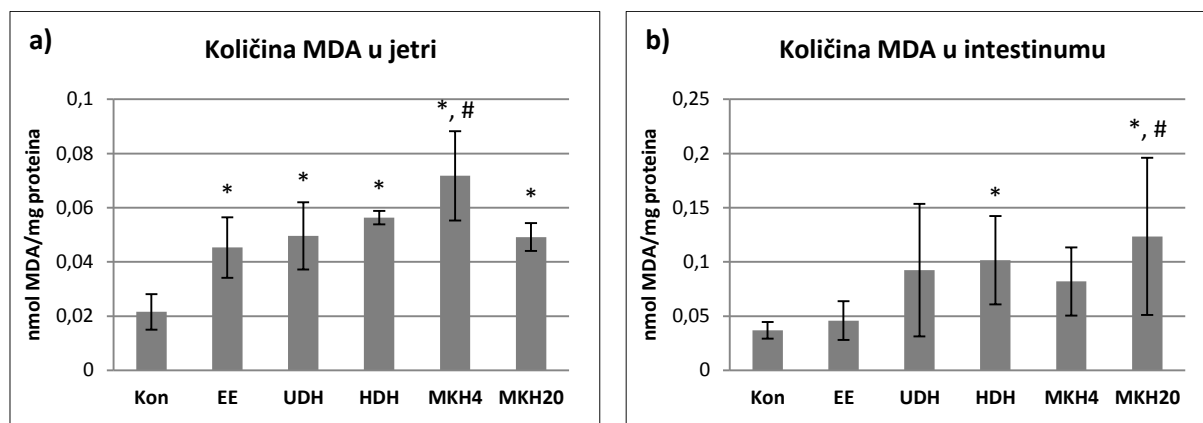
Lipidna peroksidacija je indukovana reaktivnim vrstama kiseonika i predstavlja završni stadijum oštećenja ćelijske membrane kada dolazi do degradacije lipida membrane. Rezultati merenja koncentracije malon-dialdehida (MDA), kao markera lipidne peroksidacije, u homogenatima jetre i creva, prikazani su u tabeli 4.2. i na grafikonu 4.4.

**Tabela 4.2.** Količina MDA kao pokazatelj lipidne peroksidacije u jetri i intestinumu životinja

Količina MDA	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
MDA u jetri (nmol MDA/mg proteina)	0,022±0,006	0,045±0,011	0,050±0,012	0,056±0,003	0,072±0,016	0,049±0,005
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	vs. EE, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, MKH4	vs. Kon, MKH4	vs. Kon, MKH4	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH20	vs. Kon, MKH4
MDA u intestinumu (nmol MDA/mg proteina)	0,037±0,008	0,046±0,018	0,092±0,061	0,102±0,041	0,082±0,031	0,123±0,073
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	vs. HDH, MKH20	vs. MKH20	/	vs. Kon	/	vs. Kon, EE

Indukovanje holestaze u EE grupi životinja je imalo za posledicu povećanje intenziteta lipidne peroksidacije u jetri u odnosu na zdrave životinje ( $p=0,001$  vs. Kon). Tretman žučnim kiselinama nije značajnije promenio nivo MDA u odnosu na EE grupu životinja, odnosno intenzitet lipidne peroksidacije je ostao statistički značajno viši u svim eksperimentalnim grupama koje su primile žučne kiseline intraperitonealno, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja.

Primena samog etinil-estradiola nije statistički značajno povećala koncentraciju MDA u intestinumu životinja, dok je primena svih žučnih kiselina dovela do povećanja intenziteta lipidne peroksidacije u odnosu i na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i na model grupu životinja sa holestazom (EE). Najizraženiji efekat povećanja intenziteta lipidne peroksidacije je ispoljila MKH u dozi od 20 mg/kg ( $p=0,005$  vs. Kon,  $p=0,011$  vs. EE).



**Grafikon 4.4.** Količina MDA kao pokazatelj lipidne peroksidacije u jetri i intestinumu životinja.

\* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. EE

#### 4.1.4. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u jetri i intestinumu životinja

U ćelijama postoji antioksidativni sistem odbrane koji učestvuje u eliminaciji reaktivnih vrsta kiseonika i koji u normalnim uslovima uspeva da smanji koncentracije ovih kiseoničnih vrsta na nivo u kom oni imaju korisne biološke uloge, a ne dovode do štetnih efekata. Specifična aktivnost katalaze (CAT), enzima uključenog u antioksidativnu zaštitu ćelije, određena je u homogenatima jetre i intestinuma tretiranih životinja, i rezultati su prikazani u tabeli 4.3. i na grafikonu 4.5.

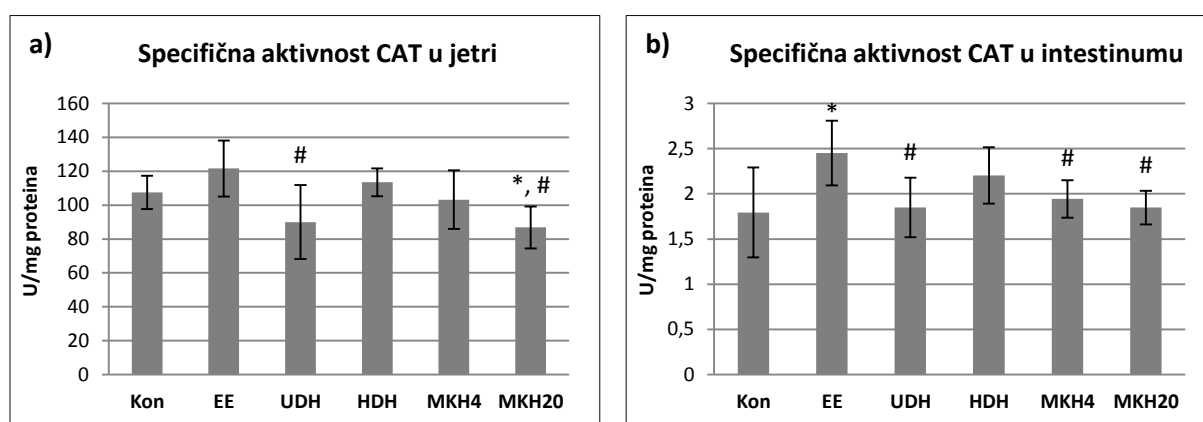
Kod životinja sa indukovanom holestazom (grupa EE) došlo je do porasta u aktivnosti CAT u jetri u odnosu na zdrave životinje, ali taj porast nije bio statistički značajan. Sve tri

primenjene žučne kiseline su smanjile aktivnost CAT u odnosu na grupu EE životinja. Tretmani sa UDH u dozi od 25 mg/kg i MKH u dozi od 20 mg/kg doveli su do statistički značajnog sniženja aktivnosti CAT u odnosu na netretirane životinje sa holestazom ( $p=0,003$  UDH *vs.* EE;  $p=0,001$  MKH20 *vs.* EE), dok za HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg to sniženje nije bilo statistički značajno.

Sličan profil specifične aktivnosti CAT je utvrđen i u uzorcima intestinuma. Primena samog etinil-estradiola (grupa EE) je statistički značajno povećala aktivnost CAT u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ( $p=0,004$  *vs.* Kon). Tretman žučnim kiselinama je doveo do sniženja aktivnosti ovog enzima, koje je bilo najmanje izraženo u grupi tretiranoj sa HDH, a najviše u grupama tretiranim sa UDH i MKH u dozi od 20 mg/kg. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti CAT među grupama kojima su aplikovane različite žučne kiseline.

**Tabela 4.3.** Specifična aktivnost katalaze (CAT) u jetri i intestinumu životinja

Specifična aktivnost enzima	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
CAT u jetri (U/mg proteina)	107,5 ± 9,8	121,6 ± 16,5	89,9 ± 21,8	113,5 ± 8,2	103,2 ± 17,3	86,8 ± 12,4
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	<i>vs.</i> MKH20	<i>vs.</i> UDH, MKH20	<i>vs.</i> EE, HDH	<i>vs.</i> UDH, MKH20	/	<i>vs.</i> Kon, EE, HDH
CAT u intestinumu (U/mg proteina)	1,79 ± 0,50	2,45 ± 0,36	1,85 ± 0,33	2,20 ± 0,31	1,94 ± 0,21	1,85 ± 0,19
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	<i>vs.</i> EE	<i>vs.</i> Kon,UDH, HDH,MKH4, MKH20	<i>vs.</i> EE	/	<i>vs.</i> EE	<i>vs.</i> EE



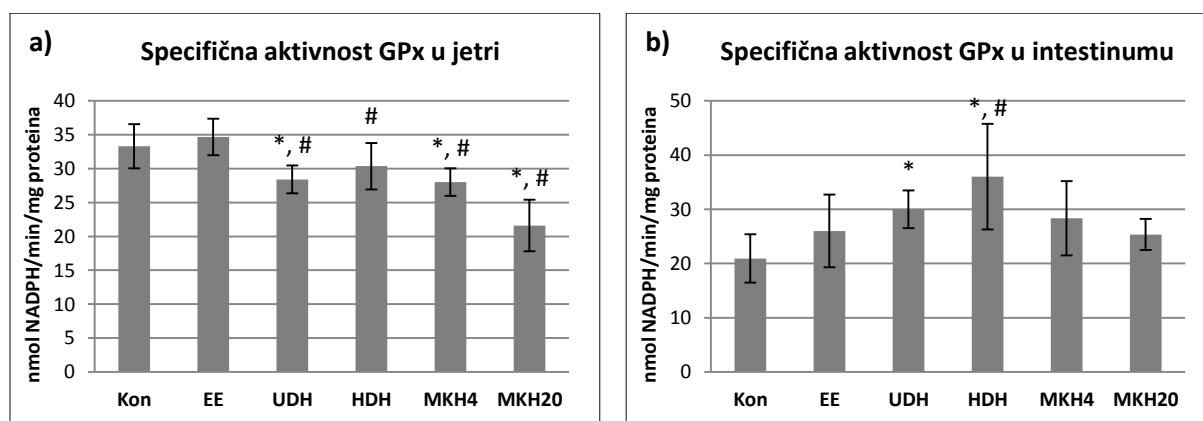
**Grafikon 4.5.** Specifična aktivnost katalaze (CAT) u jetri (a) i intestinumu (b) životinja. \* $p<0,05$  *vs.* Kon; # $p<0,05$  *vs.* EE

Glutation je najsnažniji endogeni antioksidans, ali i kofaktor veoma značajnih antioksidativnih enzima - glutacion peroksidaze (GPx), glutacion reduktaze (GR) i glutacion-S-transferaze (GST). Tabela 4.4. i grafikon 4.6. prikazuju vrednosti aktivnosti GPx u jetri i intestinumu tretiranih životinja. Kod model grupe životinja sa indukovanom holestazom je došlo do blagog povećanja aktivnosti GPx u jetri u odnosu na zdrave životinje, dok je tretman svim žučnim kiselinama doveo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti ovog enzima u odnosu i na grupu Kon i grupu EE. Najizraženiji efekat je ostvarila MKH u dozi od 20 mg/kg.

U homogenatu creva je takođe utvrđen porast aktivnosti GPx nakon primene samog etinil-estradiola u odnosu na zdrave životinje, ali tretman žučnim kiselinama nije statistički značajno promenio aktivnost ovog enzima u odnosu na grupu EE, osim u slučaju HDH, gde je došlo do značajnog povećanja aktivnosti GPx ( $p=0,017$  vs. EE).

**Tabela 4.4.** Specifična aktivnost glutacion peroksidaze (GPx) u jetri i intestinumu životinja

Specifična aktivnost enzima	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
GPx u jetri (nmol NADPH/ min/mg proteina)	33,30 ± 3,27	34,65 ± 2,69	28,40 ± 2,05	30,35 ± 3,43	28,01 ± 2,05	21,60 ± 3,81
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	vs. UDH, MKH4, MKH20	vs.UDH, HDH,MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. Kon, EE, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
GPx u intestinumu (nmol NADPH/ min/mg proteina)	20,93 ± 4,44	26,00 ± 6,71	30,00 ± 3,50	36,01 ± 9,75	28,35 ± 6,85	25,35 ± 2,88
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	vs. UDH, HDH	vs. HDH	vs. Kon	vs. Kon, EE, MKH20	/	vs. HDH



**Grafikon 4.6.** Specifična aktivnost glutacion peroksidaze (GPx) u jetri (a) i intestinumu (b) životinja.

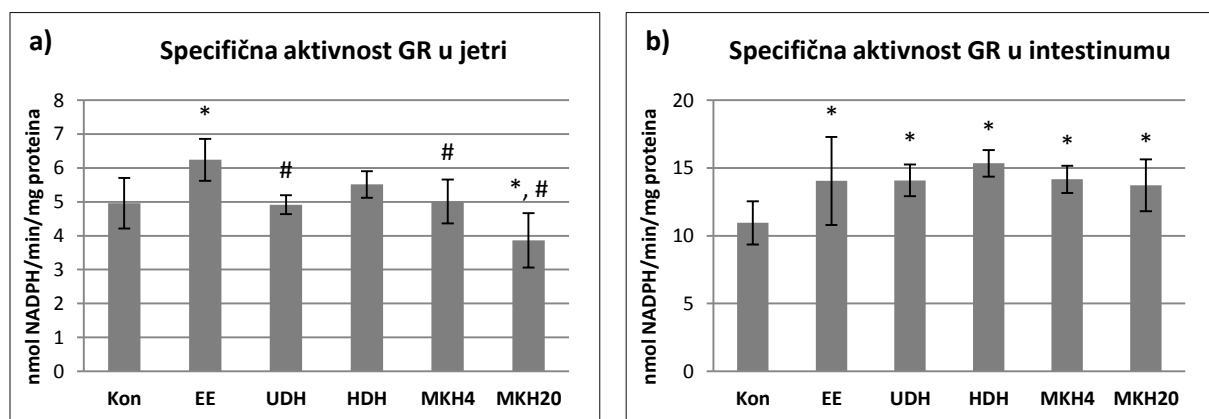
\* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. EE

Za glutation reduktazu (GR), koja omogućava održavanje adekvatne koncentracije redukovanog glutationa u ćeliji i funkcioniše usko povezano sa GPx, utvrđen je sličan profil aktivnosti i u jetri i u intestinumu tretiranih životinja kao i za GPx. Vrednosti specifične aktivnosti GR prikazane su u tabeli 4.5. i na grafikonu 4.7.

**Tabela 4.5.** Specifična aktivnost glutation reduktaze (GR) u jetri i intestinumu životinja

Specifična aktivnost enzima	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
GR u jetri (nmol NADPH/ min/mg proteina)	4,96 ± 0,75	6,24 ± 0,62	4,92 ± 0,28	5,51 ± 0,39	5,01 ± 0,64	3,86 ± 0,80
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, MKH20	vs. Kon,UDH, MKH4, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. MKH20	vs. EE, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
GR u intestinumu (nmol NADPH/ min/mg proteina)	10,95 ± 1,60	14,04 ± 3,25	14,09 ± 1,17	15,34 ± 0,98	14,16 ± 1,00	13,72 ± 1,92
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE,UDH, HDH,MKH4, MKH20	vs. Kon	vs. Kon	vs. Kon	vs. Kon	vs. Kon

U grupi EE životinja sa indukovanom holestazom je došlo do statistički značajnog povećanja aktivnosti GR i u jetri i u intestinumu u odnosu na zdrave životinje. U jetri je tretman svim žučnim kiselinama doveo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti ovog enzima u odnosu na grupu EE životinja sa holestazom. Najizraženiji efekat je ostvarila MKH u dozi od 20 mg/kg (p<0,001 vs. EE). U intestinumu, primena nijedne žučne kiseline nije dovela do statistički značajne promene u aktivnosti GR u odnosu na grupu EE, odnosno aktivnost ovog enzima je ostala statistički značajno viša u odnosu na grupu zdravih životinja.



**Grafikon 4.7.** Specifična aktivnost glutation reduktaze (GR) u jetri (a) i intestinumu (b) životinja.

\*p<0,05 vs. Kon; #p<0,05 vs. EE

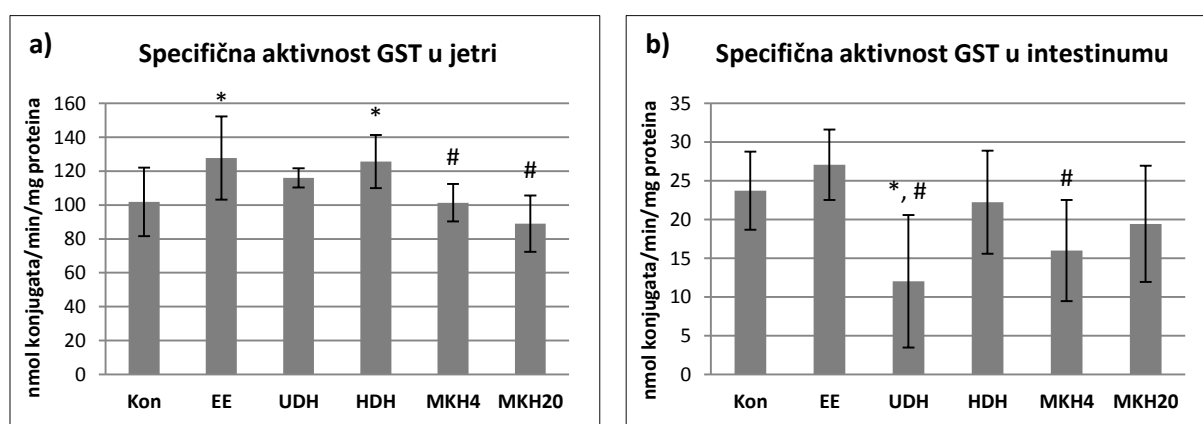


Glutation-S-transferaza (GST) katalizuje konjugaciju redukovanog glutationa sa elektrofilnim centrima različitih supstrata, uključujući i produkte oksidativnog oštećenja, i formiranje hidrofилnih metabolita koji se mogu izlučiti iz organizma, te doprinosi antioksidativnoj zaštiti. Vrednosti aktivnosti GST su prikazani u tabeli 4.6. i na grafikonu 4.8.

Indukovanjem holestaze u grupi EE životinja, statistički značajno je povećana i aktivnost GST u jetri u odnosu na grupu zdravih životinja ( $p=0,02$  vs. Kon). MKH je, u obe primenjene doze, statistički značajno smanjila aktivnost ovog enzima u jetri u odnosu na model grupu životinja sa holestazom, dok su UDH i naročito HDH ispoljile neznatno smanjenje aktivnosti. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost GST u intestinumu je bio različit u odnosu na jetru. Dok je u grupi EE došlo do blagog porasta aktivnosti GST u intestinumu, samo UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg su statistički značajno smanjile aktivnost ovog enzima.

**Tabela 4.6.** Specifična aktivnost glutacion-S-transferaze (GST) u jetri i intestinumu životinja

Specifična aktivnost enzima	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
GST u jetri (nmol konjugata/ min/mg proteina)	101,8 ± 20,2	127,8 ± 24,6	116,0 ± 5,6	125,7 ± 15,7	101,3 ± 11,1	88,9 ± 16,6
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	vs. EE, HDH	vs. Kon, MKH4, MKH20	vs. MKH20	vs. Kon, MKH4, MKH20	vs. EE, HDH	vs. EE, UDH, HDH
GST u intestinumu (nmol konjugata/ min/mg proteina)	23,73 ± 5,04	27,06 ± 4,54	12,01 ± 8,55	22,22 ± 6,65	16,01 ± 6,53	19,44 ± 7,51
Statistički značajne razlike ( $p<0,05$ )	vs. UDH	vs. UDH, MKH4	vs. Kon, EE, HDH	vs. UDH	vs. EE	/



**Grafikon 4.8.** Specifična aktivnost glutacion-S-transferaze (GST) u jetri (a) i intestinumu (b) životinja.

\* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. EE

#### 4.1.5. Uticaj žučnih kiselina na ekspresiju gena u jetri i intestinumu životinja

Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu, mereni su nivoi ekspresije gena u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja, relativnom kvantifikacijom u odnosu na *Gapdh* kao referentni gen. Ispitivane su grupe gena koje učestvuju u regulaciji usko povezanih procesa apoptoze (*Bax*, *Bcl2*, *p53*), antioksidativne zaštite (*Sod*, *Cat*, *Gpx*, *Gr*), inflamacije (*TNF $\alpha$* , *iNos*, *Cox2*, *Pgdh*, *NF $\kappa$ B*), signalizacije žučnih kiselina (*Fxr*, *Shp*) i epigenetske regulacije ćelijskih procesa (*Hdac1*, *Hdac2*).

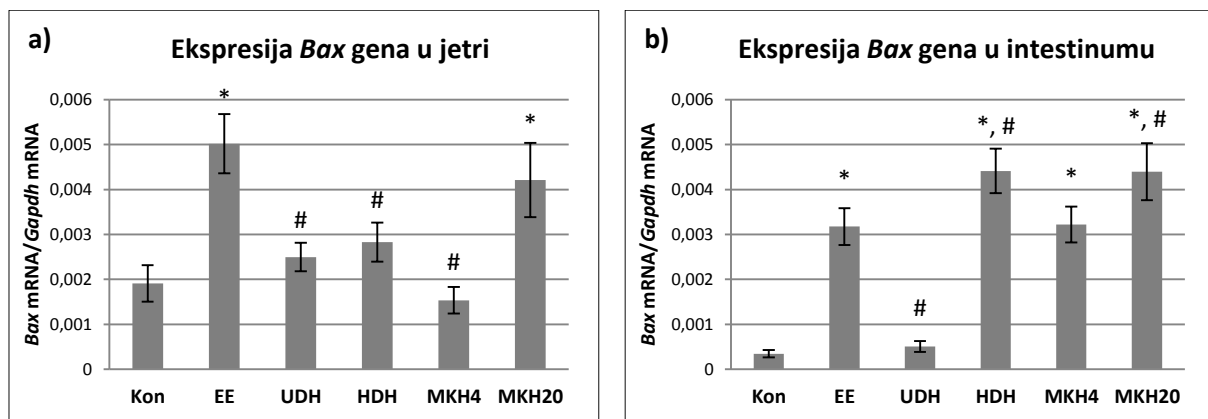
##### 4.1.5.1. Ekspresiona analiza gena koji regulišu proces apoptoze

Vrednosti relativne ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze u jetri i intestinumu životinja sa indukovanom holestazom, nakon tretmana sa tri različite žučne kiseline, prikazane su u tabeli 4.7. i na grafikonima 4.9., 4.10. i 4.11.

**Tabela 4.7.** Relativna ekspresija mRNA za *Bax*, *Bcl2* i *p53* u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama

Relativna ekspresija gena	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
<i>Bax</i> u jetri	0,0019 ± 0,0004	0,0050 ± 0,0007	0,0025 ± 0,0003	0,0028 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0003	0,0042 ± 0,0008
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, MKH20	vs. Kon,UDH, HDH, MKH4	vs. EE, MKH20	vs. EE	vs. EE, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4
<i>Bax</i> u intestinumu	0,0003 ± 0,0000	0,0032 ± 0,0004	0,0005 ± 0,0001	0,0044 ± 0,0005	0,0032 ± 0,0004	0,0044 ± 0,0006
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH20	vs. EE, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4	vs. Kon, UDH, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4
<i>Bcl2</i> u jetri	0,1644 ± 0,0323	0,1038 ± 0,0135	0,1585 ± 0,0218	0,1204 ± 0,0166	0,0905 ± 0,0133	0,1766 ± 0,0178
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, MKH4	vs. Kon, MKH20	vs. MKH4	vs. MKH20	vs. Kon,UDH, MKH20	vs. EE, HDH, MKH4
<i>Bcl2</i> u intestinumu	7,9·10 <sup>-5</sup> ± 1,6·10 <sup>-5</sup>	9,8·10 <sup>-5</sup> ± 1,5·10 <sup>-5</sup>	4,8·10 <sup>-5</sup> ± 9,2·10 <sup>-6</sup>	1,2·10 <sup>-4</sup> ± 1,7·10 <sup>-5</sup>	7,6·10 <sup>-5</sup> ± 1,4·10 <sup>-5</sup>	2,1·10 <sup>-4</sup> ± 2,3·10 <sup>-5</sup>
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH, MKH20	vs. UDH, MKH20	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon,UDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>p53</i> u jetri	0,0177 ± 0,0051	0,0791 ± 0,0126	0,0449 ± 0,0069	0,0474 ± 0,0096	0,0966 ± 0,0124	0,0956 ± 0,0112
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH	vs. EE, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH	vs. Kon, UDH, HDH
<i>p53</i> u intestinumu	0,0066 ± 0,0019	0,0256 ± 0,0025	0,0049 ± 0,0020	0,0247 ± 0,0036	0,0227 ± 0,0045	0,0326 ± 0,0051
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH	vs. EE, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH	vs. Kon,UDH, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4

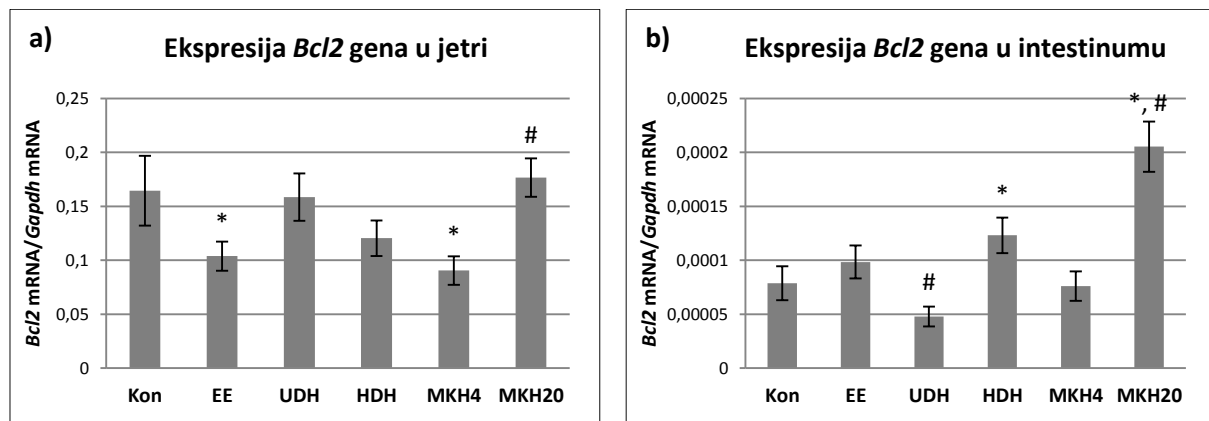
Vrednosti relativne ekspresije proapoptotskog gena *Bax* u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama prikazane su na grafikonu 4.9. Indukovanje holestaze (grupa EE) imalo je za posledicu povećanje ekspresije ovog gena, koje je bilo visoko statistički značajno u odnosu na zdrave životinje ( $p < 0,001$  vs. Kon), i u jetri i intestinumu. Tretman žučnim kiselinama imao je za posledicu smanjenje relativne ekspresije *Bax* gena u jetri, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. Najizraženiji efekat je ostvarila MKH u dozi od 4 mg/kg, koja je jedina uspela da smanji ekspresiju *Bax* gena u odnosu i na zdrave životinje, ali bez statističke značajnosti. MKH u dozi od 20 mg/kg jedina nije uspela da smanji relativnu ekspresiju *Bax* gena u jetri statistički značajno u odnosu na grupu EE životinja. U intestinumu je samo tretman sa UDH doveo do statistički značajnog smanjenja ekspresije ovog gena u odnosu na grupu EE životinja sa holestazom, dok su ostale žučne kiseline dovele čak do daljeg povećanja ekspresije *Bax* gena. U slučaju tretmana sa HDH i MKH u dozi od 20 mg/kg došlo je do statistički značajnog porasta u odnosu i na EE grupu životinja ( $p < 0,05$  vs. EE), a u odnosu na zdrave životinje relativna ekspresija *Bax* gena je bila čak 13 puta veća u odnosu na zdrave životinje.



**Grafikon 4.9.** Relativna ekspresija mRNA za *Bax* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

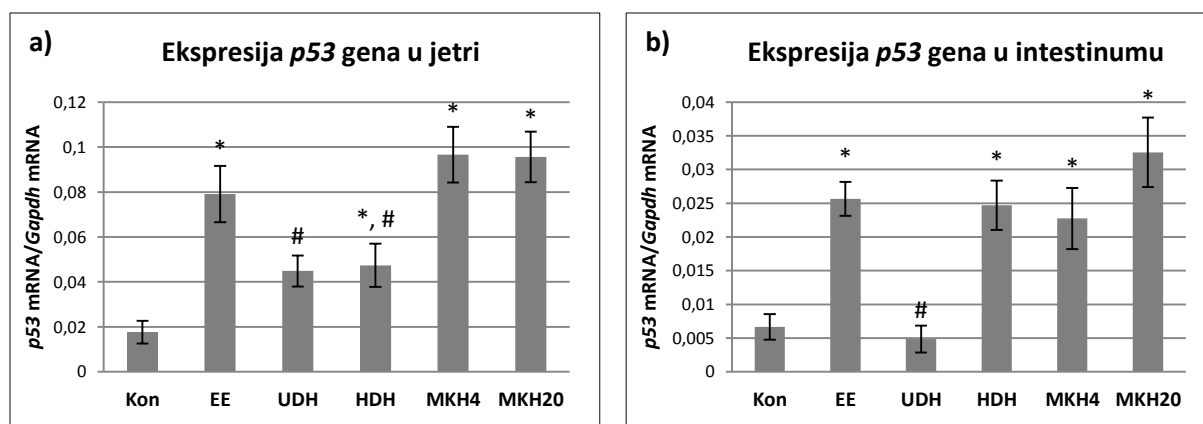
Na grafikonu 4.10. prikazana je relativna ekspresija *Bcl2* gena koji kodira sintezu antiapoptotskog Bcl-2 proteina u ćeliji. Životinje sa holestazom (grupa EE) su imale statistički značajno niži nivo ekspresije ovog gena u jetri u odnosu na zdrave životinje ( $p = 0,03$  vs. Kon), dok je tretman žučnim kiselinama imao različit uticaj na ekspresiju *Bcl2* gena. Jedino je MKH u dozi od 20 mg/kg uspela da vrati relativnu ekspresiju *Bcl2* gena na nivo zdravih životinja, odnosno na statistički značajno višu vrednost ekspresije u odnosu na grupu EE životinja ( $p = 0,009$  vs. EE). Nasuprot tome, MKH u dozi od 4 mg/kg je dodatno smanjila relativnu ekspresiju *Bcl2* gena u jetri u odnosu na grupe Kon i EE. U intestinumu, primena etinil-

estradiola nije statistički značajno promenila ekspresiju *Bcl2* gena u odnosu na zdrave životinje. Tretmani životinja sa HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg nisu doveli do statistički značajne promene u ekspresiji ovog gena u odnosu na netretirane životinje sa holestazom, UDH je smanjila ekspresiju ovog gena u odnosu na grupu EE ( $p=0,02$  vs. EE), dok je MKH u dozi od 20 mg/kg visoko statistički značajno povećala ekspresiju u odnosu na obe netretirane grupe životinja, sa i bez holestaze ( $p<0,001$  vs. Kon, EE).



**Grafikon 4.10.** Relativna ekspresija mRNA za *Bcl2* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. EE

Na grafikonu 4.11. su prikazane vrednosti relativne ekspresije *p53* gena koji kodira sintezu tumor supresora p53, u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama. Protein p53, kao "čuvar genoma", inicira proces apoptoze u slučaju ireverzibilnih oštećenja u ćeliji. Profil *p53* genske ekspresije po eksperimentalnim grupama životinja je bio sličan u jetri i intestinumu. U EE grupi je došlo do visoko statistički značajnog porasta ekspresije *p53* gena u odnosu na zdrave životinje ( $p<0,001$  vs. Kon), koje je u jetri iznosilo približno 5 puta, a u intestinumu 4 puta. U oba organa je primena UDH dovela do statistički značajnog sniženja relativne ekspresije ovog gena u odnosu na model grupu životinja sa holestazom, a MKH u obe primenjene doze nije statistički značajno promenila ekspresiju *p53* gena u odnosu na grupu EE životinja. Jedino je HDH ispoljila različite efekte u jetri i intestinumu. Dok u intestinumu HDH nije uspjela statistički značajno da izmeni ekspresiju ovog gena u odnosu na netretirane životinje sa holestazom, u jetri je došlo do značajnog smanjenja ( $p=0,02$  vs. EE), ali je taj nivo ekspresije i dalje bio statistički značajno viši u odnosu na relativnu ekspresiju *p53* gena u zdravim životinjama.

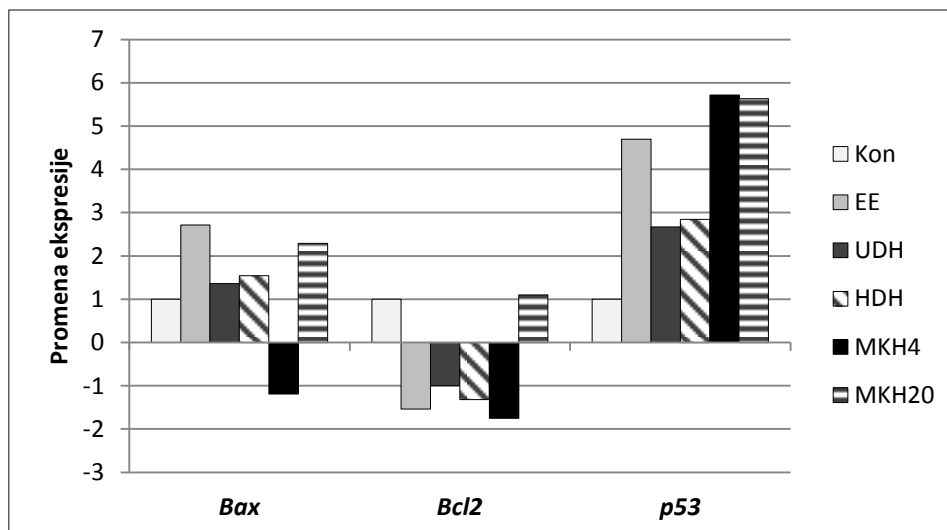


**Grafikon 4.11.** Relativna ekspresija mRNA za *p53* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Komparativnom Ct metodom izračunate su promene ekspresije (*fold change*) koje pokazuju koliko je puta relativna ekspresija određenog gena manja ili veća u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ili model grupu životinja sa holestazom. Vrednosti promene ekspresije gena uključenih u proces apoptoze, određene u jetri i intestinumu, prikazane su u tabelama 4.8. i 4.9., kao i na grafikonima 4.12. i 4.13.

**Tabela 4.8.** Promene ekspresije mRNA za *Bax*, *Bcl2* i *p53* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

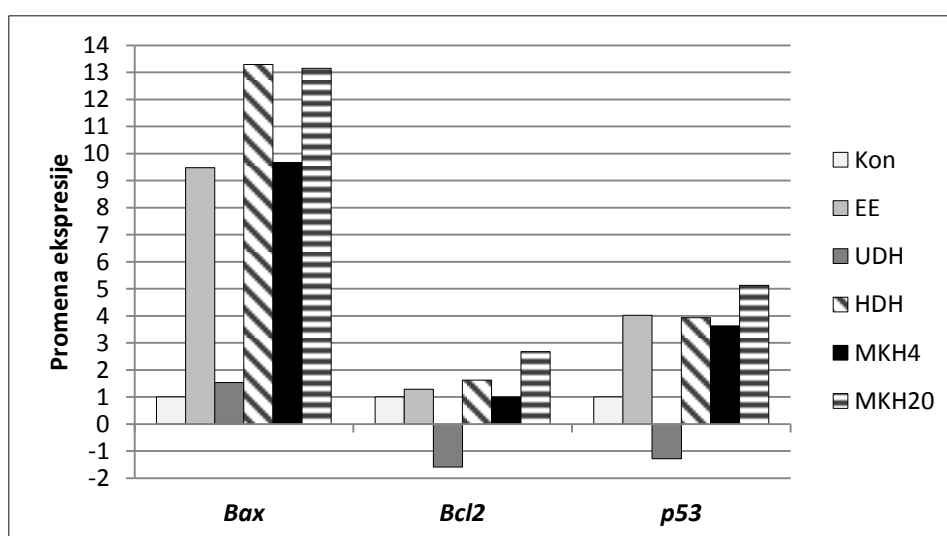
Grupa	<i>Bax</i>		<i>Bcl2</i>		<i>p53</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/	1	/
EE	2,71 ± 0,55	1	0,65 ± 0,14	1	4,69 ± 1,14	1
UDH	1,36 ± 0,31	0,51 ± 0,12	1,00 ± 0,23	1,57 ± 0,37	2,67 ± 0,67	0,59 ± 0,15
HDH	1,55 ± 0,41	0,58 ± 0,15	0,76 ± 0,19	1,20 ± 0,30	2,85 ± 0,87	0,63 ± 0,19
MKH4	0,84 ± 0,23	0,32 ± 0,09	0,57 ± 0,14	0,90 ± 0,21	5,71 ± 1,24	1,26 ± 0,27
MKH20	2,29 ± 0,60	0,86 ± 0,23	1,10 ± 0,19	1,73 ± 0,31	5,63 ± 1,09	1,24 ± 0,24



**Grafikon 4.12.** Promene ekspresije mRNA za *Bax*, *Bcl2* i *p53* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

**Tabela 4.9.** Promene ekspresije mRNA za *Bax*, *Bcl2* i *p53* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

Grupa	<i>Bax</i>		<i>Bcl2</i>		<i>p53</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/	1	/
EE	9,48 ± 1,83	1	1,29 ± 0,29	1	4,02 ± 0,70	1
UDH	1,53 ± 0,47	0,16 ± 0,05	0,63 ± 0,16	0,50 ± 0,13	0,78 ± 0,31	0,20 ± 0,08
HDH	13,29 ± 3,06	1,42 ± 0,33	1,63 ± 0,41	1,30 ± 0,33	3,93 ± 1,04	0,99 ± 0,26
MKH4	9,67 ± 2,14	1,04 ± 0,23	1,01 ± 0,27	0,80 ± 0,22	3,63 ± 1,07	0,92 ± 0,27
MKH20	13,15 ± 2,81	1,41 ± 0,30	2,68 ± 0,49	2,13 ± 0,39	5,13 ± 1,16	1,30 ± 0,29



**Grafikon 4.13.** Promene ekspresije mRNA za *Bax*, *Bcl2* i *p53* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

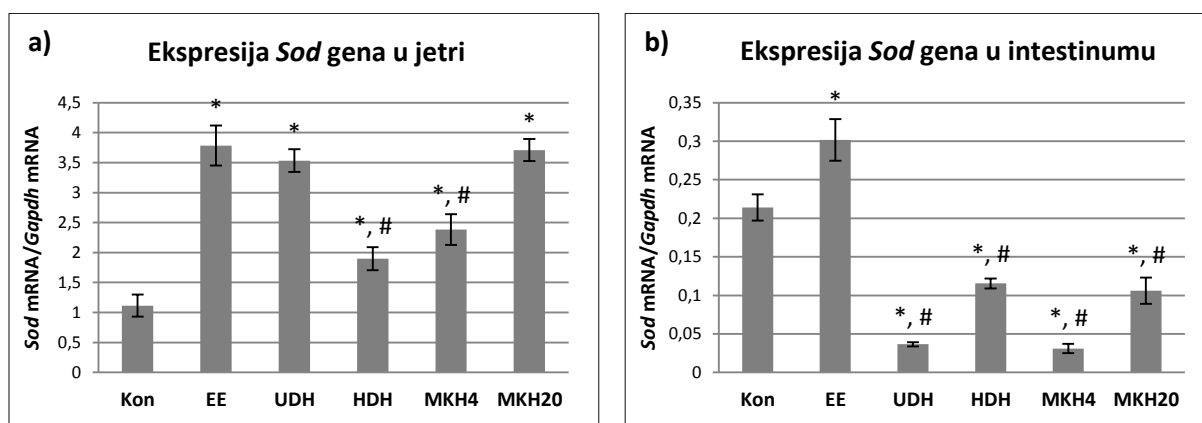
#### 4.1.5.2. Ekspresiona analiza gena antioksidativne zaštite

Vrednosti relativne ekspresije gena koji regulišu oksidativni status u jetri i intestinumu životinja tretiranih odabranim žučnim kiselinama, prikazane su u tabeli 4.10. i na grafikonima 4.14.-4.17.

**Tabela 4.10.** Relativna ekspresija mRNA za *Sod*, *Cat*, *Gpx* i *Gr* u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama

Relativna ekspresija gena	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
<i>Sod</i> u jetri	1,1146 ± 0,1842	3,7851 ± 0,3353	3,5342 ± 0,1883	1,8988 ± 0,1911	2,3821 ± 0,2552	3,7094 ± 0,1836
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, HDH, MKH4	vs. Kon, HDH, MKH4	vs. Kon, EE, UDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH20	vs. Kon, HDH, MKH4
<i>Sod</i> u intestinumu	0,2141 ± 0,0171	0,3016 ± 0,0271	0,0365 ± 0,0028	0,1154 ± 0,0064	0,0309 ± 0,0060	0,1060 ± 0,0171
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4	vs. Kon, EE, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4
<i>Cat</i> u jetri	0,5888 ± 0,0819	1,7766 ± 0,2876	0,9828 ± 0,0987	1,1479 ± 0,0795	0,9391 ± 0,1029	2,2956 ± 0,2452
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. Kon, EE, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>Cat</i> u intestinumu	0,0145 ± 0,0024	0,0628 ± 0,0107	0,0029 ± 0,0010	0,0093 ± 0,0014	0,0020 ± 0,0009	0,0352 ± 0,0052
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>Gpx</i> u jetri	0,9865 ± 0,2664	5,1625 ± 0,6816	2,3771 ± 0,2625	2,3068 ± 0,3203	1,5923 ± 0,2759	4,7028 ± 0,5494
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, UDH, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4	vs. Kon, EE, MKH20	vs. Kon, EE, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4
<i>Gpx</i> u intestinumu	0,0247 ± 0,0036	0,0640 ± 0,0084	0,0067 ± 0,0014	0,0244 ± 0,0041	0,0092 ± 0,0020	0,0345 ± 0,0044
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, UDH, MKH4	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, HDH, MKH20	vs. EE, UDH, MKH4	vs. Kon, EE, HDH, MKH20	vs. EE, UDH, MKH4
<i>Gr</i> u jetri	0,0224 ± 0,0030	0,0445 ± 0,0066	0,0455 ± 0,0047	0,0352 ± 0,0071	0,0188 ± 0,0035	0,1103 ± 0,0197
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. MKH20	vs. MKH4, MKH20	vs. MKH4, MKH20	vs. EE, UDH, MKH4	vs. MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>Gr</i> u intestinumu	0,0061 ± 0,0011	0,0135 ± 0,0020	0,0025 ± 0,0004	0,0060 ± 0,0010	0,0019 ± 0,0005	0,0140 ± 0,0015
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, UDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4	vs. Kon, EE, HDH, MKH20	vs. EE, UDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4

Grafikon 4.14. prikazuje relativne ekspresije mRNA za superoksid dismutazu (SOD) u jetri i intestinumu životinja tretiranih sa UDH, HDH i MKH. Netretirane životinje sa holestazom (grupa EE) imale su visoko statistički značajno veće vrednosti relativne ekspresije *Sod* gena u odnosu na grupu zdravih životinja, i u jetri i u intestinumu ( $p < 0,001$  vs. Kon). U jetri je samo tretman sa HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg doveo do statistički značajnog smanjenja ekspresije ovog gena ka vrednostima u grupi Kon, ali je ta vrednost i dalje bila značajno viša u odnosu na grupu zdravih životinja. U intestinumu je tretman svim žučnim kiselinama doveo do visoko statistički značajnog smanjenja ekspresije *Sod* gena u odnosu na model grupu životinja sa holestazom, ali i u odnosu na grupu zdravih životinja ( $p < 0,001$  vs. Kon, EE). Najizraženija negativna regulacija ovog gena je bila nakon prime MKH u nižoj dozi i iznosila je čak 6 puta u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja.

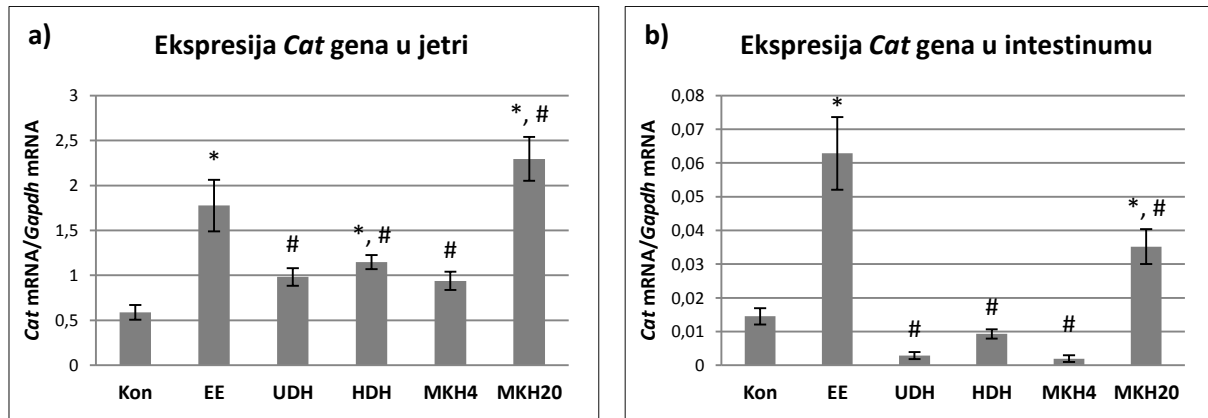


**Grafikon 4.14.** Relativna ekspresija mRNA za *Sod* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Vrednosti relativne ekspresije mRNA za katalazu (CAT) prikazane su na grafikonu 4.15. U jetri životinja tretiranih samim etinil-estradiolom došlo je do statistički značajnog povećanja ekspresije *Cat* gena u odnosu na jetru zdravih životinja. Dok je u grupama životinja UDH, HDH i MKH4 došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije *Cat* gena u odnosu na model grupu životinja sa holestazom, primena MKH u dozi od 20 mg/kg je dovela do daljeg porasta relativne ekspresije ovog gena u jetri do statistički značajno većeg nivoa u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe životinja. U intestinumu životinja grupe EE je porast ekspresije *Cat* gena bio još izraženiji nego u jetri i iznosio je približno 4 puta, ali je i smanjenje ekspresije nakon primene UDH, HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg bilo izraženije i bilo je ispod vrednosti ekspresije ovog gena i u grupi zdravih životinja. Tretman životinja sa MKH u dozi od 20 mg/kg je doveo do statistički značajnog smanjenja ekspresije *Cat* gena u

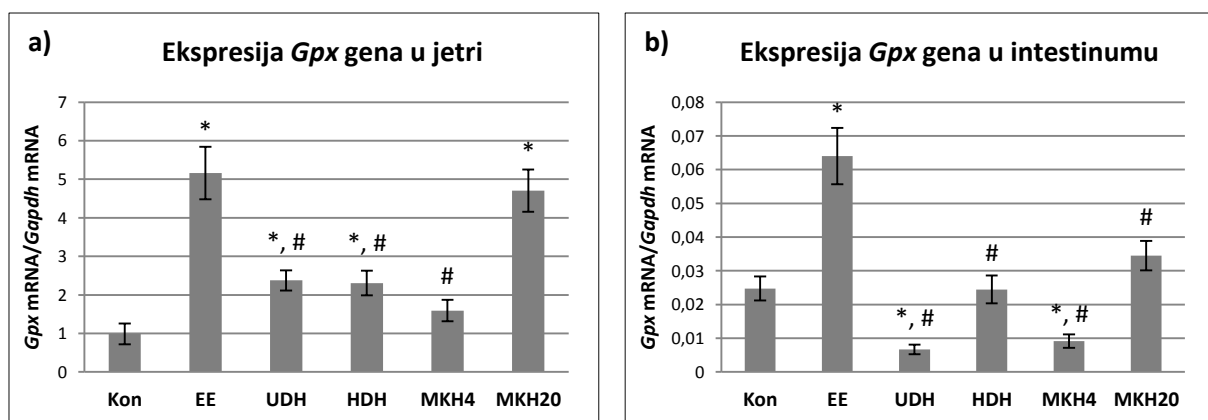


odnosu na grupu EE, ali je ekspresija i dalje bila značajno viša u odnosu na zdrave životinje ( $p=0,003$  vs. Kon).



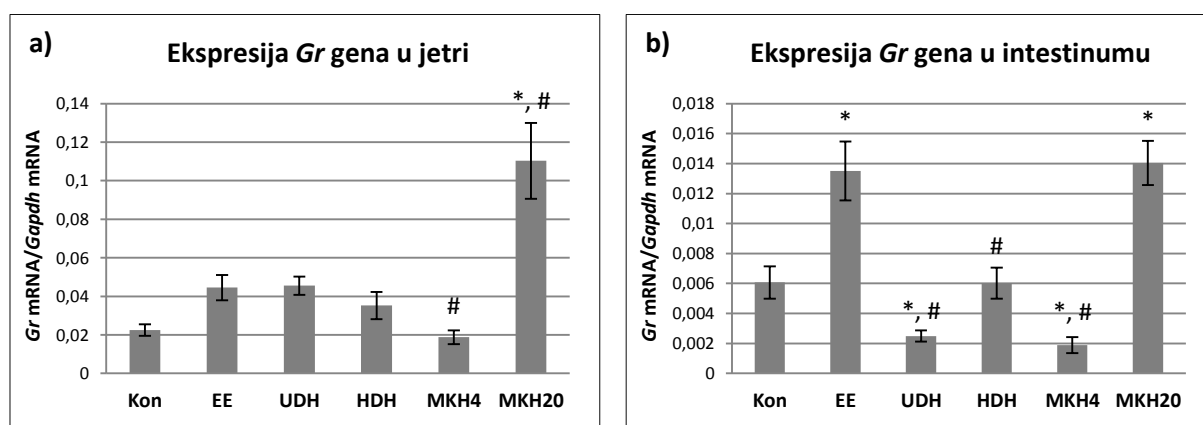
**Grafikon 4.15.** Relativna ekspresija mRNA za *Cat* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. EE

Relativna ekspresija *Gpx* gena, koji kodira sintezu antioksidativnog enzima glutation peroksidaze, u jetri i intestinumu životinja, prikazana je na grafikonu 4.16. Indukovanje holestaze kod životinja dovelo je do visoko statistički značajnog porasta relativne ekspresije *Gpx* gena i u jetri i intestinumu, u odnosu na zdrave životinje ( $p<0,001$  vs. Kon), koje je u jetri iznosilo čak 5 puta. Tretman svim žučnim kiselinama imalo je za posledicu značajno smanjenje ekspresije ovog gena i u jetri i intestinumu, pri čemu je to smanjenje u slučaju oba organa bilo najmanje izraženo nakon primene MKH u dozi od 20 mg/kg. Primena UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg je dovela do smanjenja ekspresije *Gpx* gena u intestinumu na statistički značajno niži nivo i u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja.



**Grafikon 4.16.** Relativna ekspresija mRNA za *Gpx* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. EE

Vrednosti relativne ekspresije *Gr* gena, čiji proteinski produkt glutation reduktaza učestvuje u antioksidativnoj zaštiti ćelije, izmerene su u jetri i intestinumu životinja tretiranih odabranim žučnim kiselinama i prikazane na grafikonu 4.17. Profil ekspresije *Gr* gena se razlikovao po tretiranim grupama životinja kada se uporede jetra i intestinum. U jetri indukovanje holestaze, kao i tretmani sa UDH, HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg, nisu doveli do statistički značajnih promena ekspresije ovog gena u odnosu na zdrave životinje. Nasuprot tome, tretman sa MKH u dozi od 20 mg/kg doveo je do visoko statistički značajnog povećanja relativne ekspresije *Gr* gena u odnosu na netretirane životinje, sa i bez holestaze ( $p < 0,001$  vs. Kon, EE), koje je iznosilo čak 5 puta u odnosu na zdrave životinje. U intestinumu su životinje model grupe sa holestazom imale statistički značajno veću ekspresiju *Gr* gena u odnosu na zdrave životinje ( $p < 0,001$  vs. Kon). MKH u dozi od 20 mg/kg nije značajno promenila ekspresiju ovog gena u odnosu na grupu EE životinja, odnosno ostala je značajno viša u odnosu na zdrave životinje. Nasuprot tome, ostali eksperimentalni tretmani su doveli do statistički značajnog smanjenja relativne ekspresije *Gr* gena u odnosu na EE grupu, a u slučaju grupa UDH i MKH4 je ekspresija ovog gena bila značajno niža i u odnosu na zdrave životinje.

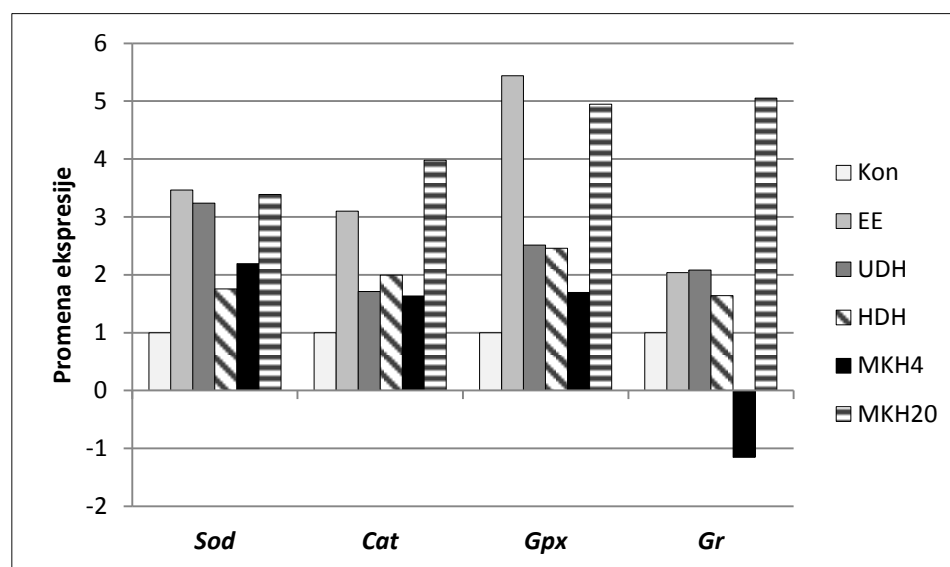


**Grafikon 4.17.** Relativna ekspresija mRNA za *Gr* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u proces antioksidativne zaštite, određene u jetri i intestinumu, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ili model grupu životinja sa holestazom, prikazane su u tabelama 4.11. i 4.12., kao i na grafikonima 4.18. i 4.19.

**Tabela 4.11.** Promene ekspresije mRNA za *Sod*, *Cat*, *Gpx* i *Gr* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

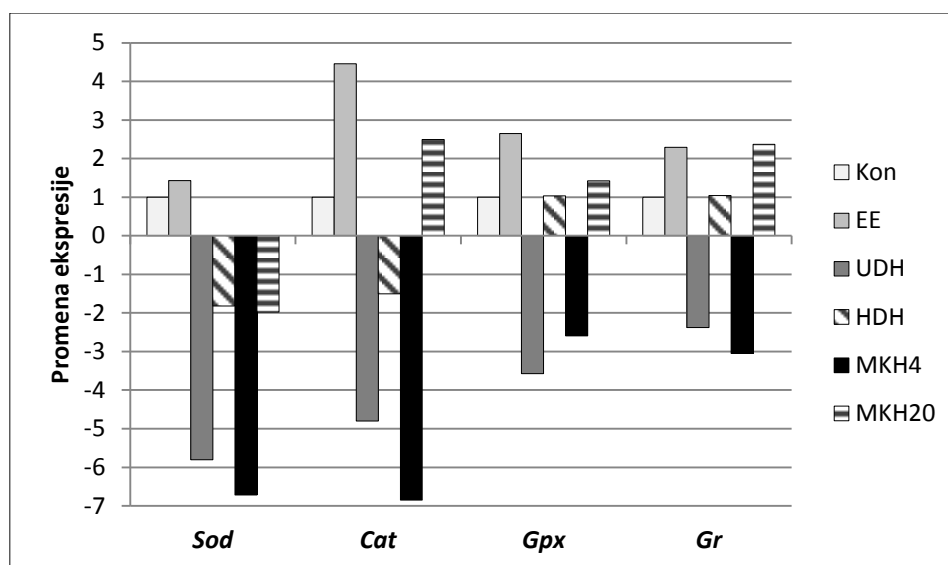
Grupa	<i>Sod</i>		<i>Cat</i>		<i>Gpx</i>		<i>Gr</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/	1	/	1	/
EE	3,46 ± 0,57	1	3,10 ± 0,73	1	5,44 ± 1,10	1	2,04 ± 0,46	1
UDH	3,24 ± 0,52	0,95 ± 0,15	1,71 ± 0,35	0,57 ± 0,12	2,51 ± 0,53	0,47 ± 0,10	2,08 ± 0,43	1,05 ± 0,22
HDH	1,76 ± 0,38	0,51 ± 0,11	2,00 ± 0,38	0,66 ± 0,13	2,45 ± 0,61	0,46 ± 0,12	1,64 ± 0,50	0,83 ± 0,25
MKH4	2,20 ± 0,45	0,64 ± 0,13	1,63 ± 0,34	0,54 ± 0,11	1,70 ± 0,45	0,32 ± 0,08	0,87 ± 0,23	0,44 ± 0,12
MKH20	3,39 ± 0,45	0,99 ± 0,13	3,98 ± 0,73	1,32 ± 0,24	4,95 ± 0,95	0,93 ± 0,18	5,05 ± 1,23	2,54 ± 0,62



**Grafikon 4.18.** Promene ekspresije mRNA za *Sod*, *Cat*, *Gpx* i *Gr* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

**Tabela 4.12.** Promene ekspresije mRNA za *Sod*, *Cat*, *Gpx* i *Gr* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

Grupa	<i>Sod</i>		<i>Cat</i>		<i>Gpx</i>		<i>Gr</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/	1	/	1	/
EE	1,43 ± 0,24	1	4,46 ± 1,09	1	2,65 ± 0,54	1	2,29 ± 0,50	1
UDH	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,21 ± 0,08	0,05 ± 0,02	0,28 ± 0,08	0,11 ± 0,03	0,42 ± 0,09	0,19 ± 0,04
HDH	0,55 ± 0,10	0,39 ± 0,07	0,67 ± 0,17	0,15 ± 0,04	1,03 ± 0,29	0,40 ± 0,11	1,04 ± 0,29	0,46 ± 0,13
MKH4	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,38 ± 0,12	0,15 ± 0,04	0,33 ± 0,12	0,15 ± 0,05
MKH20	0,51 ± 0,12	0,36 ± 0,08	2,49 ± 0,54	0,57 ± 0,12	1,42 ± 0,28	0,55 ± 0,11	2,36 ± 0,41	1,06 ± 0,18



**Grafikon 4.19.** Promene ekspresije mRNA za *Sod*, *Cat*, *Gpx* i *Gr* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

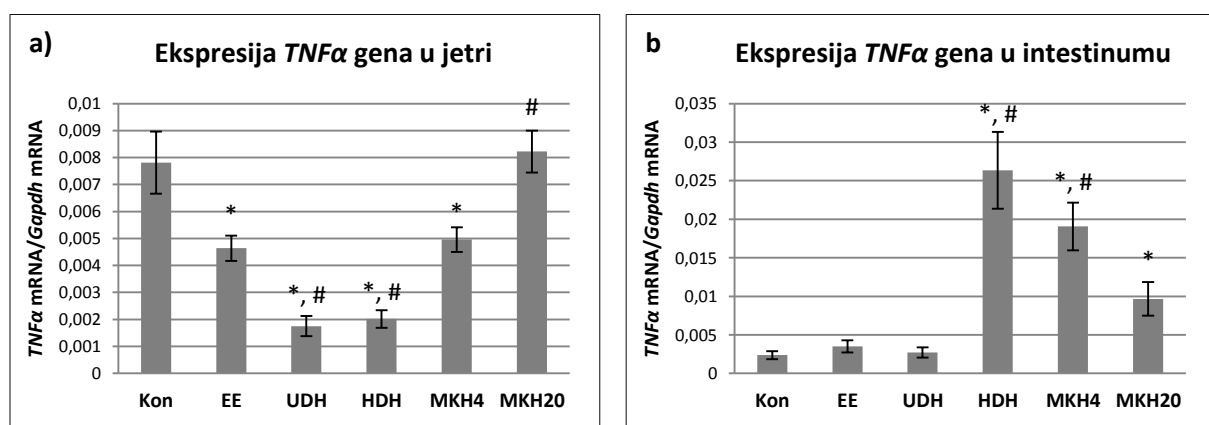
### 4.1.5.3. Ekspresiona analiza gena koji regulišu proces inflamacije

Vrednosti relativne ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije, određenih u jetri i intestinumu životinja tretiranih odabranim žučnim kiselinama, prikazane su u tabeli 4.13. i na grafikonima 4.20.-4.24.

**Tabela 4.13.** Relativna ekspresija mRNA za *TNF $\alpha$* , *iNos*, *Cox2*, *Pgdh* i *NF $\kappa$ B* u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama

Relativna ekspresija gena	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
<i>TNF<math>\alpha</math></i> u jetri	0,0078 ± 0,0011	0,0046 ± 0,0005	0,0018 ± 0,0004	0,0020 ± 0,0003	0,0049 ± 0,0005	0,0082 ± 0,0008
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, UDH, HDH, MKH4	vs. Kon, UDH, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH20	vs. EE, UDH, HDH, MKH4
<i>TNF<math>\alpha</math></i> u intestinumu	0,0024 ± 0,0005	0,0035 ± 0,0008	0,0027 ± 0,0007	0,0264 ± 0,0050	0,0191 ± 0,0031	0,0097 ± 0,0022
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4	vs. HDH, MKH4	vs. Kon, EE, UDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH20	vs. Kon, HDH, MKH4
<i>iNos</i> u jetri	6,4·10 <sup>-5</sup> ± 1,7·10 <sup>-5</sup>	1,6·10 <sup>-4</sup> ± 2,6·10 <sup>-5</sup>	9,9·10 <sup>-5</sup> ± 1,5·10 <sup>-5</sup>	3,9·10 <sup>-4</sup> ± 7,9·10 <sup>-5</sup>	2,6·10 <sup>-4</sup> ± 4,3·10 <sup>-5</sup>	1,3·10 <sup>-4</sup> ± 2,9·10 <sup>-5</sup>
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH, MKH4	vs. HDH	vs. HDH, MKH4	vs. Kon, EE, UDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH20	vs. HDH, MKH4
<i>iNos</i> u intestinumu	0,0001 ± 0,0000	0,0002 ± 0,0000	0,0004 ± 0,0000	0,0006 ± 0,0000	0,0007 ± 0,0001	0,0008 ± 0,0001
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, MKH20	vs. Kon, EE, UDH	vs. Kon, EE, UDH, HDH
<i>Cox2</i> u jetri	0,0105 ± 0,0022	0,0149 ± 0,0034	0,0060 ± 0,0007	0,0080 ± 0,0018	0,0064 ± 0,0012	0,0083 ± 0,0016
Statistički značajne razlike (p<0,05)	/	vs. UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. EE	vs. EE	vs. EE	vs. EE
<i>Cox2</i> u intestinumu	0,0023 ± 0,0005	0,0050 ± 0,0009	0,0033 ± 0,0006	0,0201 ± 0,0025	0,0235 ± 0,0043	0,0161 ± 0,0031
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, UDH	vs. Kon, EE, UDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4
<i>Pgdh</i> u jetri	0,0006 ± 0,0001	0,0023 ± 0,0003	0,0012 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0001	0,0008 ± 0,0002	0,0016 ± 0,0004
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. EE	vs. EE	vs. EE, MKH20	vs. Kon, EE, MKH4
<i>Pgdh</i> u intestinumu	0,0129 ± 0,0030	0,0903 ± 0,0159	0,0200 ± 0,0057	0,0319 ± 0,0066	0,0165 ± 0,0055	0,1329 ± 0,0138
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. EE, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>NF<math>\kappa</math>B</i> u jetri	0,0015 ± 0,0003	0,0035 ± 0,0006	0,0029 ± 0,0004	0,0069 ± 0,0009	0,0020 ± 0,0004	0,0111 ± 0,0013
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH, MKH20	vs. HDH, MKH20	vs. HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>NF<math>\kappa</math>B</i> u intestinumu	0,0002 ± 0,0000	0,0007 ± 0,0001	0,0001 ± 0,0000	0,0007 ± 0,0000	0,0003 ± 0,0000	0,0012 ± 0,0002
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4, MKH20	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4, MKH20	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4

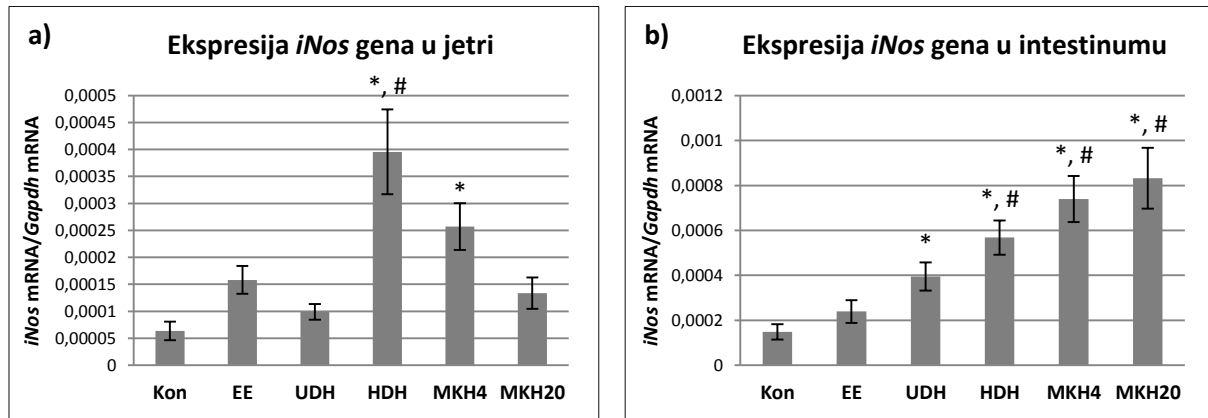
Grafikon 4.20. prikazuje relativne ekspresije mRNA za faktor nekroze tumora  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) u jetri i intestinumu životinja tretiranih sa UDH, HDH i MKH. Modulacija ekspresije i disregulacija ovog citokina i medijatora inflamacije je od velikog značaja i za sam proces kancerogeneze. Relativna ekspresija  $TNF\alpha$  gena je bila generalno niska i u jetri i intestinumu životinja, ali su indukovanje holestaze i tretman žučnim kiselinama statistički značajno izmenili nivo ekspresije ovog gena. U jetri je u model grupi životinja sa holestazom došlo do visoko statistički značajnog smanjenja ekspresije  $TNF\alpha$  gena ( $p < 0,001$  vs. Kon), koja je bila dodatno statistički značajno smanjena nakon tretmana sa UDH i HDH. Tretman sa MKH u dozi od 4 mg/kg nije značajno izmenio ekspresiju  $TNF\alpha$  gena u odnosu na grupu EE životinja, dok je primena MKH u dozi od 20 mg/kg dovela do povećanja ekspresije na nivo grupe zdravih životinja. U intestinumu, primena etinil-estradiola, samog i u kombinaciji sa UDH, nije statistički značajno promenila relativnu ekspresiju  $TNF\alpha$  gena u odnosu na zdrave životinje, ali je tretman sa HDH i MKH u obe doze doveo do statistički značajnog porasta u vrednostima ekspresije ovog gena, koji je bio najizraženiji u slučaju HDH i iznosio je približno 12 puta u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja i 8 puta u odnosu na model grupu životinja sa holestazom.



**Grafikon 4.20.** Relativna ekspresija mRNA za  $TNF\alpha$  u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

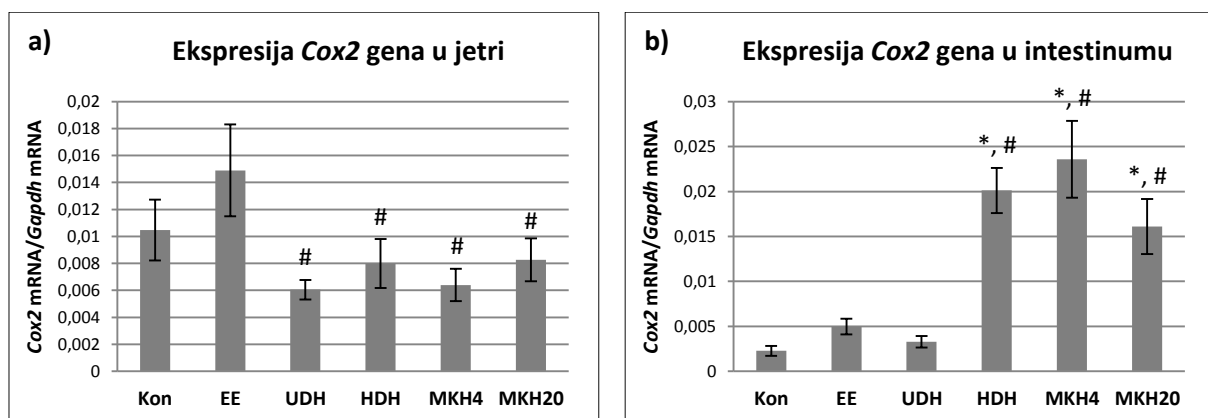
Na grafikonu 4.21. prikazane su vrednosti relativne ekspresije gena koji kodira sintezu inducibilne NO sintetaze, u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama. U model grupi životinja sa holestazom (grupa EE) relativna ekspresija  $iNos$  gena je bila viša u odnosu na zdrave životinje, i u jetri i intestinumu, ali bez statističke značajnosti. Primena žučnih kiselina imala je različit uticaj na ekspresiju ovog gena u jetri i intestinumu. U jetri je samo HDH dovela do statistički značajnog porasta ekspresije  $iNos$  gena u odnosu i na grupu Kon i

grupu EE, a u intestinumu su HDH i MKH u obe primenjene doze od 4 mg/kg i 20 mg/kg dovele do statistički značajnog povećanja u odnosu na netretirane životinje, sa i bez holestaze.



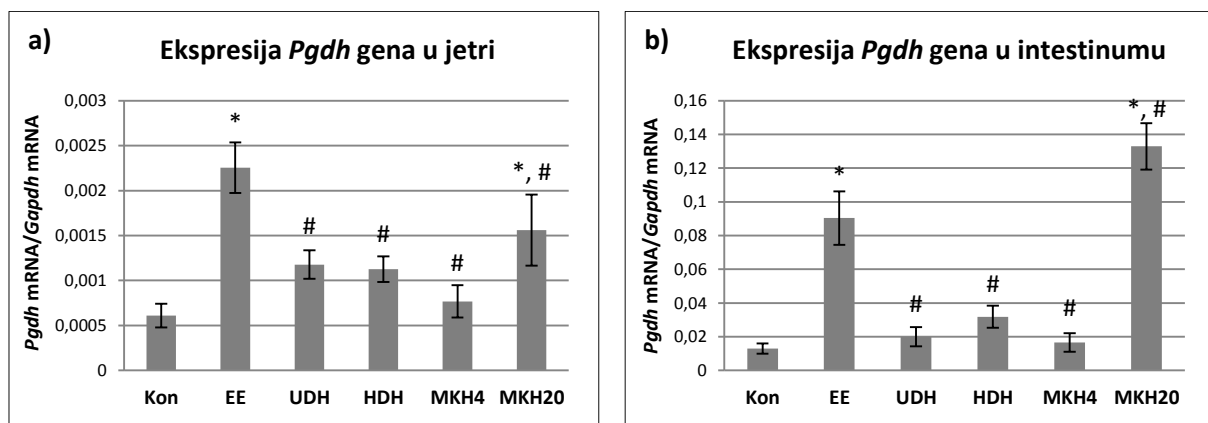
**Grafikon 4.21.** Relativna ekspresija mRNA za *iNos* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Vrednosti ekspresije *Cox2* gena, koji kodira sintezu inducibilne ciklooksigenaze-2, u jetri i intestinumu životinja, prikazani su na grafikonu 4.22. Relativna ekspresija mRNA za ovaj enzim koji dovodi do sinteze prostaglandina, kao medijatora inflamacije, različito je regulisana u jetri i intestinumu. Indukovanje holestaze bez dodatne primene žučnih kiselina je imalo za posledicu blago povećanje vrednosti relativne ekspresije *Cox2* gena u odnosu na zdrave životinje i u jetri i intestinumu, ali dok su u jetri svi eksperimentalni tretmani doveli do statistički značajnog sniženja ekspresije ovog gena u odnosu na grupu EE životinja, u intestinumu je tretman sa HDH i MKH u obe doze doveo do veoma intenzivnog povećanja ekspresije, koje je u slučaju grupa HDH i MKH4 iznosilo i do 10 puta u odnosu na zdrave životinje.



**Grafikon 4.22.** Relativna ekspresija mRNA za *Cox2* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

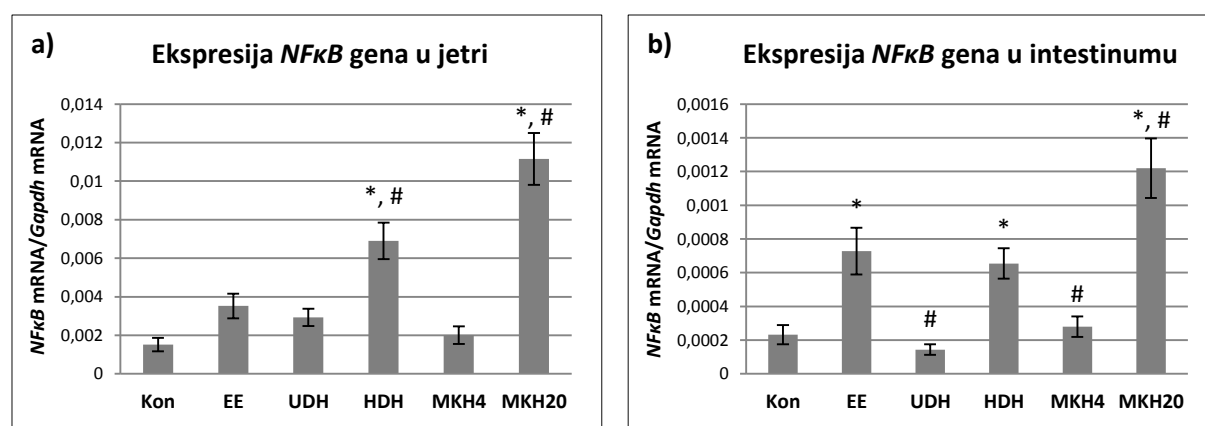
Na grafikonu 4.23. su prikazane vrednosti relativne ekspresije *Pgdh* gena, koji kodira sintezu 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaze, ključnog enzima u katabolizmu prostaglandina. Profil ekspresije ovog gena po eksperimentalnim grupama u jetri i intestinumu je bio sličan, osim u slučaju tretmana sa MKH u dozi od 20 mg/kg. U oba organa je primena etinil-estradiola dovela do višestrukog povećanja vrednosti relativne ekspresije *Pgdh* gena u odnosu na zdrave životinje. Primena UDH, HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg dovela je do statistički značajnog smanjenja ekspresije *Pgdh* gena na približni nivo ekspresije kod zdravih životinja. Tretman sa MKH u dozi od 20 mg/kg je u jetri imao za posledicu smanjenje relativne ekspresije *Pgdh* gena, ali je ekspresija ovog gena i dalje bila značajno veća u odnosu na grupu Kon, dok je u intestinumu došlo do statistički značajnog povećanja ekspresije *Pgdh* gena u odnosu na obe netretirane grupe životinja, sa i bez holestaze.



**Grafikon 4.23.** Relativna ekspresija mRNA za *Pgdh* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Vrednosti relativne ekspresije gena za nuklearni faktor  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ), koji može dalje da indukuje transkripciju proinflamatornih gena, prikazane su na grafikonu 4.24. Profil ekspresije ovog gena po eksperimentalnim grupama je bio sličan u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama. Tretman etinil-estradiolom je doveo do povećanja relativne ekspresije *NF $\kappa B$*  gena u odnosu na zdrave životinje, koje je u intestinumu bilo visoko statistički značajno ( $p < 0,001$  vs. Kon). Tretman sa UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg je doveo do sniženja ekspresije ovog gena ka vrednostima u kontrolnoj grupi zdravih životinja, dok je tretman sa MKH u dozi od 20 mg/kg imao za posledicu statistički značajno povećanje vrednosti ekspresije *NF $\kappa B$*  gena u odnosu na grupe Kon i EE. Primena HDH je takođe značajno povećala ekspresiju ovog gena u jetri u odnosu na grupe Kon i EE, dok u intestinumu nije statistički značajno izmenila ekspresiju u odnosu na model grupu životinja sa holestazom.





**Grafikon 4.24.** Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

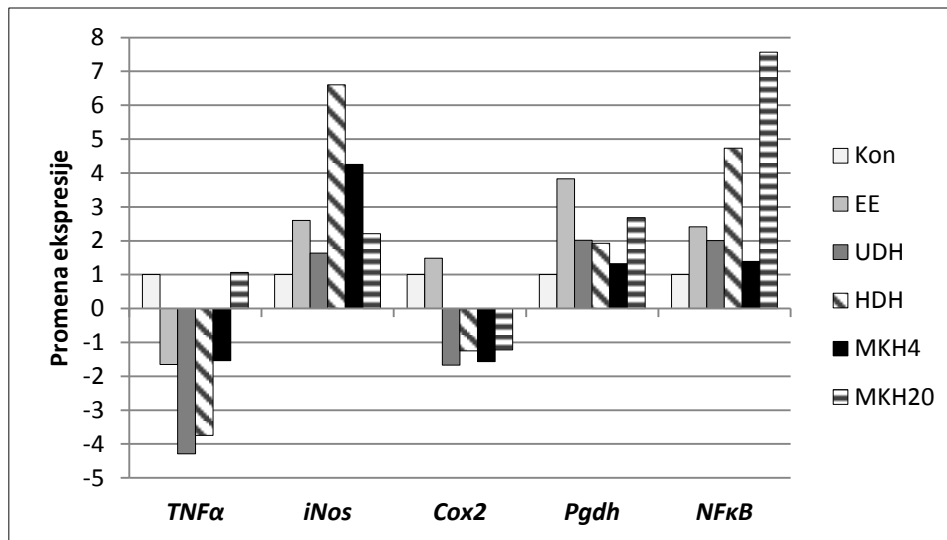
Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u proces inflamacije ćelije, određene u jetri, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ili model grupu životinja sa holestazom, prikazane su u tabeli 4.14. i na grafikonu 4.25.

**Tabela 4.14.** Promene ekspresije mRNA za *TNFα*, *iNos*, *Cox2*, *Pgdh* i *NFκB* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

Grupa	<i>TNFα</i>		<i>iNos</i>		<i>Cox2</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/	1	/
EE	0,61 ± 0,11	1	2,60 ± 0,62	1	1,49 ± 0,44	1
UDH	0,23 ± 0,07	0,39 ± 0,12	1,63 ± 0,40	0,65 ± 0,16	0,60 ± 0,13	0,42 ± 0,09
HDH	0,27 ± 0,07	0,45 ± 0,12	6,60 ± 2,01	2,61 ± 0,79	0,80 ± 0,24	0,56 ± 0,17
MKH4	0,65 ± 0,13	1,09 ± 0,21	4,25 ± 1,11	1,68 ± 0,44	0,64 ± 0,18	0,45 ± 0,13
MKH20	1,07 ± 0,18	1,80 ± 0,31	2,21 ± 0,64	0,88 ± 0,25	0,82 ± 0,21	0,58 ± 0,15

Grupa	<i>Pgdh</i>		<i>NFκB</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/
EE	3,83 ± 0,77	1	2,41 ± 0,59	1
UDH	2,01 ± 0,47	0,54 ± 0,13	2,01 ± 0,50	0,86 ± 0,22
HDH	1,93 ± 0,46	0,51 ± 0,12	4,74 ± 1,15	2,03 ± 0,49
MKH4	1,33 ± 0,42	0,35 ± 0,11	1,39 ± 0,44	0,60 ± 0,19
MKH20	2,69 ± 0,85	0,72 ± 0,23	7,57 ± 1,46	3,24 ± 0,63



**Grafikon 4.25.** Promene ekspresije mRNA za *TNFα*, *iNos*, *Cox2*, *Pgdh* i *NFκB* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

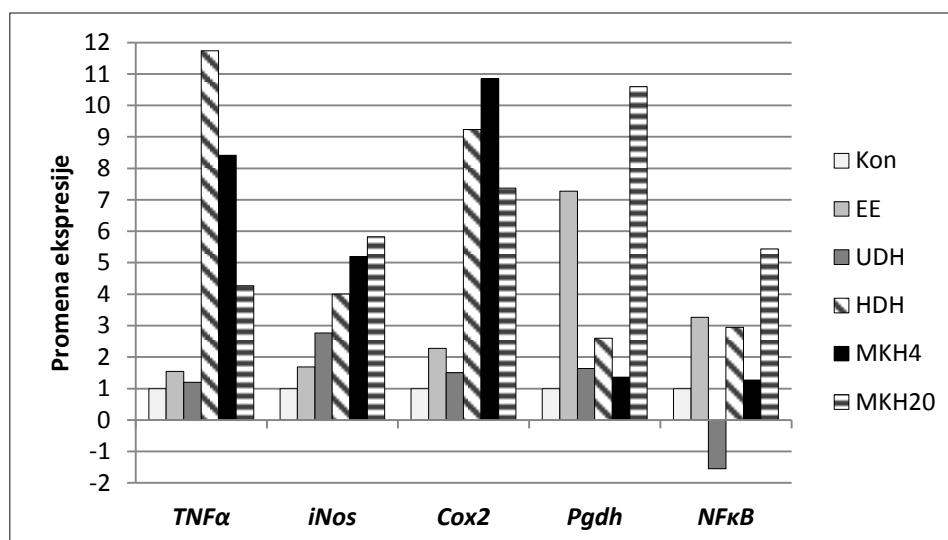
Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u proces inflamacije ćelije, određene u intestinumu, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ili model grupu životinja sa holestazom, prikazane su u tabeli 4.15. i na grafikonu 4.26.

**Tabela 4.15.** Promene ekspresije mRNA za *TNFα*, *iNos*, *Cox2*, *Pgdh* i *NFκB* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

Grupa	<i>TNFα</i>		<i>iNos</i>		<i>Cox2</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/	1	/
EE	1,55 ± 0,45	1	1,68 ± 0,47	1	2,28 ± 0,55	1
UDH	1,20 ± 0,37	0,81 ± 0,25	2,77 ± 0,62	1,71 ± 0,38	1,50 ± 0,38	0,68 ± 0,17
HDH	11,75 ± 3,51	7,93 ± 2,37	4,01 ± 1,01	2,48 ± 0,62	9,23 ± 2,23	4,18 ± 1,01
MKH4	8,42 ± 2,18	5,68 ± 1,47	5,19 ± 1,21	3,21 ± 0,75	10,85 ± 2,96	4,91 ± 1,34
MKH20	4,27 ± 1,21	2,88 ± 0,82	5,83 ± 1,34	3,60 ± 0,83	7,37 ± 1,88	3,34 ± 0,85

Grupa	<i>Pgdh</i>		<i>NFκB</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/
EE	7,27 ± 1,79	1	3,27 ± 0,83	1
UDH	1,63 ± 0,55	0,23 ± 0,08	0,65 ± 0,18	0,20 ± 0,06
HDH	2,61 ± 0,82	0,37 ± 0,12	2,95 ± 0,75	0,93 ± 0,24
MKH4	1,36 ± 0,52	0,19 ± 0,07	1,27 ± 0,38	0,40 ± 0,12
MKH20	10,60 ± 1,87	1,50 ± 0,26	5,44 ± 1,17	1,72 ± 0,37



**Grafikon 4.26.** Promene ekspresije mRNA za *TNFα*, *iNos*, *Cox2*, *Pgdh* i *NFκB* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

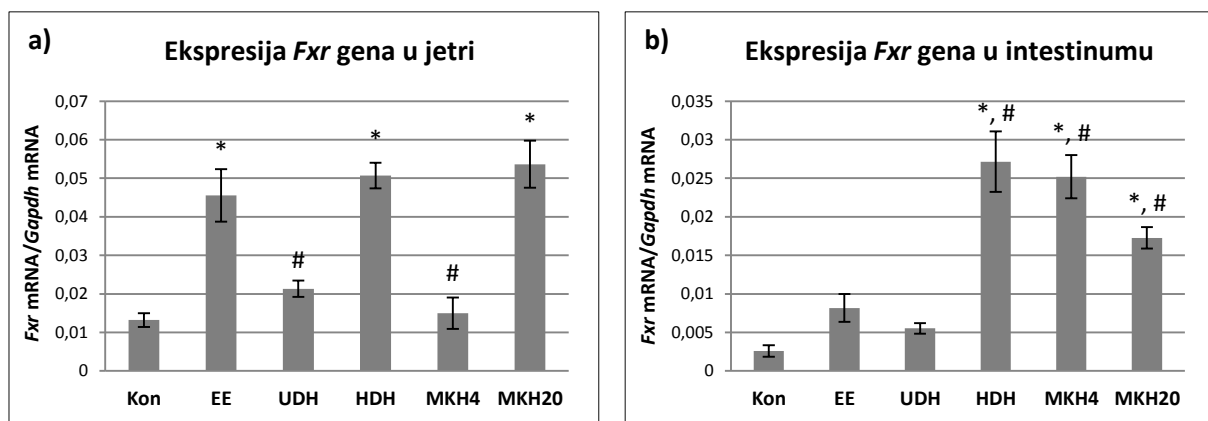
#### 4.1.5.4. Ekspresiona analiza gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina

Vrednosti relativne ekspresije *Fxr* i *Shp* gena u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, prikazane su u tabeli 4.16. i na grafikonima 4.27. i 4.28.

**Tabela 4.16.** Relativna ekspresija mRNA za *Fxr* i *Shp* u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama

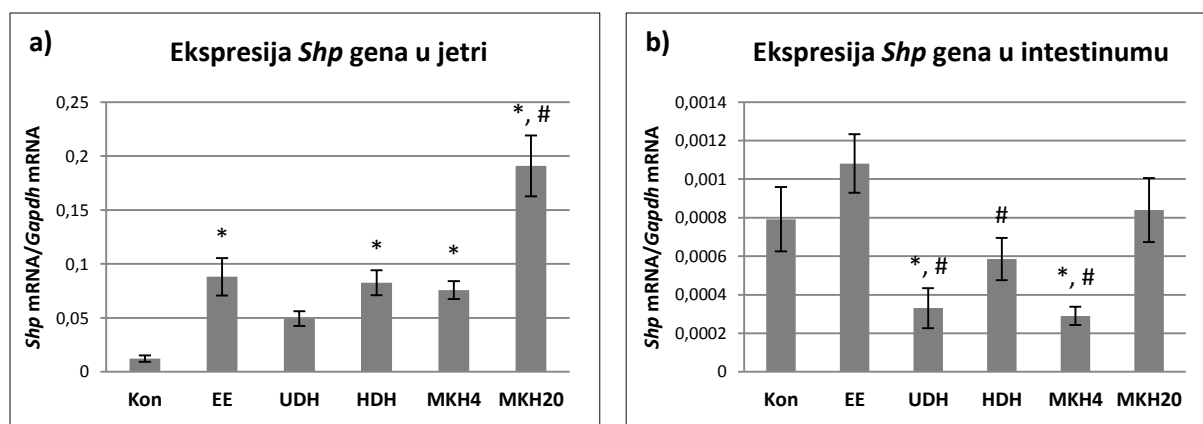
Relativna ekspresija gena	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
<i>Fxr</i> u jetri	0,0132 ± 0,0018	0,0456 ± 0,0068	0,0213 ± 0,0021	0,0507 ± 0,0033	0,0149 ± 0,0041	0,0536 ± 0,0061
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4
<i>Fxr</i> u intestinumu	0,0026 ± 0,0007	0,0082 ± 0,0018	0,0055 ± 0,0007	0,0271 ± 0,0039	0,0252 ± 0,0028	0,0172 ± 0,0014
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>Shp</i> u jetri	0,0121 ± 0,0029	0,0881 ± 0,0173	0,0495 ± 0,0068	0,0826 ± 0,0115	0,0757 ± 0,0083	0,1909 ± 0,0282
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, MKH20	vs. MKH20	vs. Kon, MKH20	vs. Kon, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, HDH, MKH4
<i>Shp</i> u intestinumu	0,0008 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0002	0,0003 ± 0,0001	0,0006 ± 0,0001	0,0003 ± 0,0000	0,0008 ± 0,0002
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. UDH, MKH4	vs. UDH, HDH, MKH4	vs. Kon, EE, MKH20	vs. EE	vs. Kon, EE, MKH20	vs. UDH, MKH4

Indukovanje holestaze je imalo za posledicu povećanje ekspresije *Fxr* i *Shp* gena u jetri i intestinumu u odnosu na zdrave životinje, i to povećanje ekspresije oba gena u jetri je bilo statistički značajno. Tretman životinja sa HDH i MKH u dozi od 20 mg/kg nije značajno promenio nivo ekspresije *Fxr* gena u jetri, dok su UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg statistički značajno smanjile ekspresiju ovog gena u jetri, u odnosu na model grupu životinja sa holestazom ( $p < 0,001$  vs. EE). U intestinumu, tretman sa UDH nije značajno promenio relativnu ekspresiju *Fxr* gena u odnosu na grupe životinja Kon i EE, dok su ostali eksperimentalni tretmani (grupe HDH, MKH4 i MKH20) doveli do statistički značajnog povećanja ekspresije u odnosu i na zdrave životinje i netretirane životinje sa holestazom. Najizraženiji efekat povećanja ekspresije *Fxr* gena u intestinumu je ostvarila HDH.



**Grafikon 4.27.** Relativna ekspresija mRNA za *Fxr* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Profil ekspresije *Shp* gena po eksperimentalnim grupama je delimično pratio ekspresiju *Fxr* gena u jetri. UDH je dovela do smanjenja ekspresije *Shp* gena u jetri u odnosu na model grupu životinja sa holestazom, HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg nisu statistički značajno promenile nivo ekspresije, dok je MKH u dozi od 20 mg/kg indukovala statistički značajno povećanje ekspresije *Shp* gena u jetri, u odnosu na obe netretirane grupe životinja, sa i bez holestaze. U intestinumu je tretman svim žučnim kiselinama doveo do smanjenja relativne ekspresije *Shp* gena u odnosu na grupu EE životinja, koje je u slučaju eksperimentalnih grupa UDH i MKH4 bilo statistički značajno niže, ne samo u odnosu na životinje sa holestazom, nego i u poređenju sa zdravim životinjama.

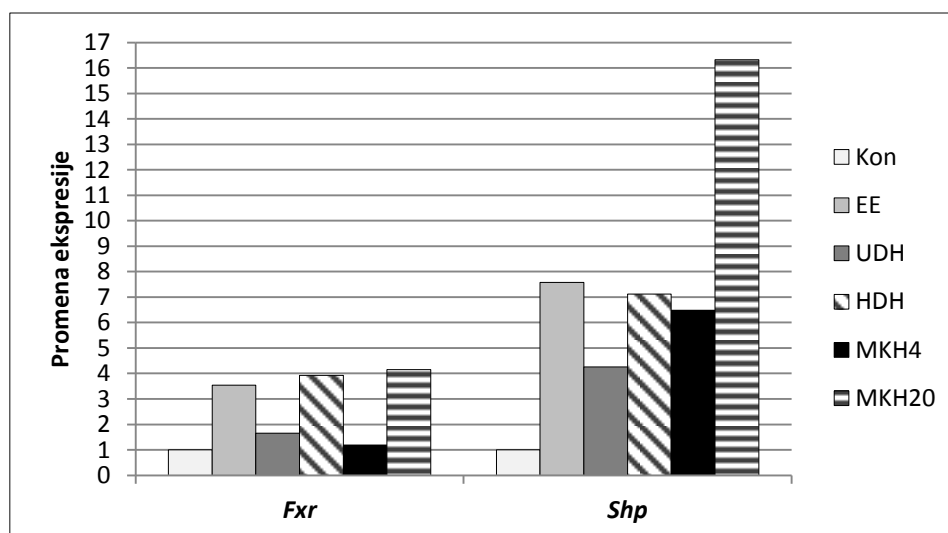


**Grafikon 4.28.** Relativna ekspresija mRNA za *Shp* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u proces održavanja homeostaze žučnih kiselina, određene u jetri i intestinumu, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ili model grupu životinja sa holestazom, prikazane su u tabelama 4.17. i 4.18., kao i na grafikonima 4.29. i 4.30.

**Tabela 4.17.** Promene ekspresije mRNA za *Fxr* i *Shp* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

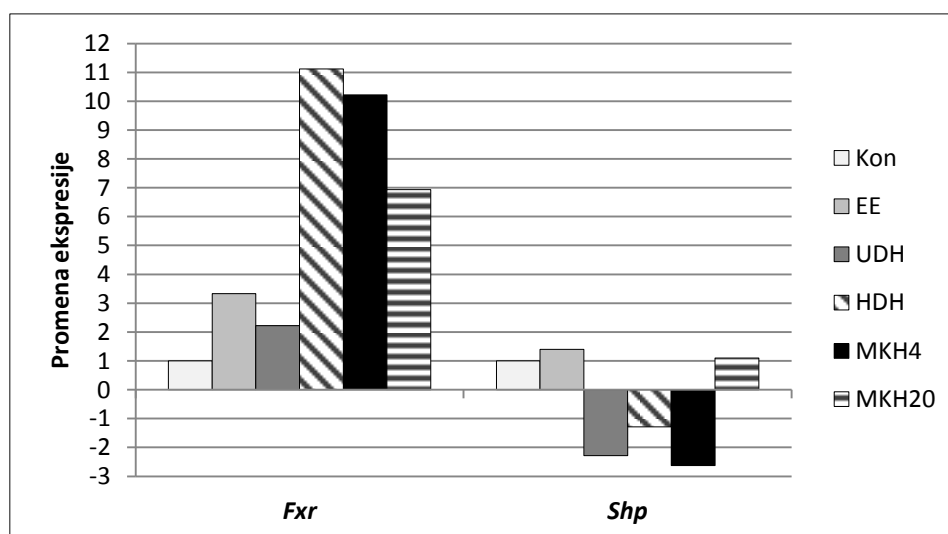
Grupa	<i>Fxr</i>		<i>Shp</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/
EE	3,54 ± 0,79	1	7,57 ± 1,98	1
UDH	1,66 ± 0,34	0,48 ± 0,10	4,25 ± 1,01	0,58 ± 0,14
HDH	3,93 ± 0,74	1,14 ± 0,21	7,13 ± 1,78	0,97 ± 0,24
MKH4	1,19 ± 0,42	0,34 ± 0,12	6,48 ± 1,35	0,89 ± 0,18
MKH20	4,15 ± 0,79	1,20 ± 0,23	16,33 ± 3,63	2,23 ± 0,50



**Grafikon 4.29.** Promene ekspresije mRNA za *Fxr* i *Shp* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

**Tabela 4.18.** Promene ekspresije mRNA za *Fxr* i *Shp* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

Grupa	<i>Fxr</i>		<i>Shp</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/
EE	3,33 ± 0,90	1	1,40 ± 0,28	1
UDH	2,23 ± 0,43	0,69 ± 0,13	0,44 ± 0,15	0,32 ± 0,11
HDH	11,11 ± 2,90	3,47 ± 0,91	0,78 ± 0,23	0,56 ± 0,17
MKH4	10,22 ± 2,15	3,19 ± 0,67	0,38 ± 0,10	0,28 ± 0,07
MKH20	6,94 ± 1,07	2,16 ± 0,33	1,10 ± 0,29	0,80 ± 0,21



**Grafikon 4.30.** Promene ekspresije mRNA za *Fxr* i *Shp* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

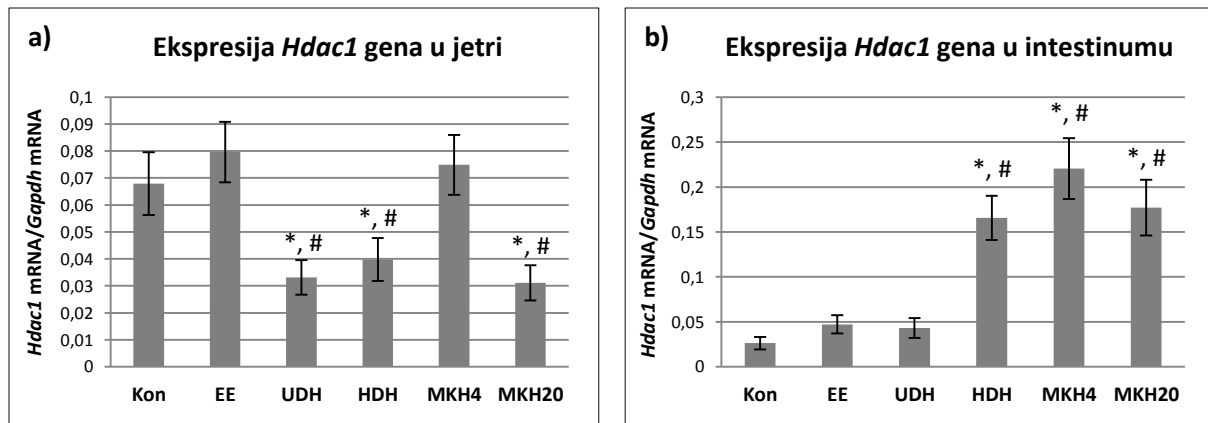
#### 4.1.5.5. Ekspresiona analiza gena uključenih u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa

Vrednosti relativne ekspresije *Hdac1* i *Hdac2* gena koji kodiraju sintezu histon deacetilaza, čija aktivnost dovodi do utišavanja brojnih gena, u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, prikazane su u tabeli 4.19. i na grafikonima 4.31. i 4.32.

**Tabela 4.19.** Relativna ekspresija mRNA za *Hdac1* i *Hdac2* u jetri i intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama

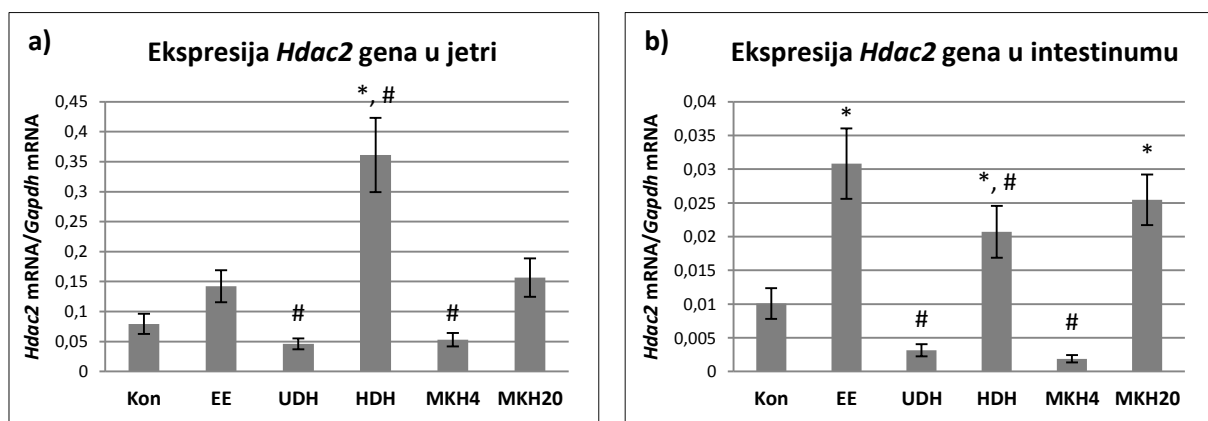
Relativna ekspresija gena	Kon	EE	UDH	HDH	MKH4	MKH20
<i>Hdac1</i> u jetri	0,0679 ± 0,0116	0,0796 ± 0,0112	0,0331 ± 0,0064	0,0398 ± 0,0080	0,0749 ± 0,0111	0,0312 ± 0,0065
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. UDH, HDH, MKH20	vs. UDH, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, MKH4	vs. Kon, EE, MKH4	vs. UDH, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, MKH4
<i>Hdac1</i> u intestinumu	0,0262 ± 0,0070	0,0472 ± 0,0103	0,0431 ± 0,0110	0,1658 ± 0,0246	0,2205 ± 0,0337	0,1770 ± 0,0309
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. HDH, MKH4, MKH20	vs. Kon, EE, UDH	vs. Kon, EE, UDH	vs. Kon, EE, UDH
<i>Hdac2</i> u jetri	0,0794 ± 0,0167	0,1423 ± 0,0265	0,0459 ± 0,0090	0,3612 ± 0,0620	0,0532 ± 0,0112	0,1568 ± 0,0320
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. HDH	vs. UDH, HDH, MKH4	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4, MKH20	vs. EE, HDH, MKH20	vs. UDH, HDH, MKH4
<i>Hdac2</i> u intestinumu	0,0101 ± 0,0023	0,0308 ± 0,0052	0,0031 ± 0,0009	0,0207 ± 0,0039	0,0019 ± 0,0005	0,0254 ± 0,0037
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, HDH, MKH4	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, EE, UDH, MKH4	vs. EE, HDH, MKH20	vs. Kon, UDH, MKH4

Primena etinil-estradiola je imala za posledicu povećanje relativne ekspresije *Hdac1* gena i u jetri i intestinumu životinja, ali bez statističke značajnosti. Profili ekspresije ovog gena u jetri i intestinumu su se razlikovali, ako se uporede grupe tretirane žučnim kiselinama. U jetri, primena MKH u dozi od 4 mg/kg nije značajno promenila ekspresiju *Hdac1* gena u odnosu na netretirane grupe životinja, sa i bezolestaze (grupe Kon i EE), dok je u grupama UDH, HDH i MKH20 došlo do statistički značajnog smanjenja nivoa ekspresije ovog gena u odnosu na grupe Kon i EE. Nasuprot tome, u intestinumu, tretman sa UDH nije značajno promenio ekspresiju *Hdac1* gena, dok su ostali eksperimentalni tretmani doveli do statistički značajnog povećanja relativne ekspresije ovog gena u odnosu na grupe Kon i EE.



**Grafikon 4.31.** Relativna ekspresija mRNA za *Hdac1* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE

Indukovanje holestaze je dovelo do povećanja ekspresije *Hdac2* gena u jetri i intestinumu životinja, koje je samo u intestinumu bilo statistički značajno u odnosu na zdrave životinje ( $p < 0,001$  vs. Kon) i iznosilo je više od 3 puta. U jetri, od svih tretmana sa žučnim kiselinama, jedino je primena HDH dovela do statistički značajne promene u odnosu na model grupu životinja sa holestazom. Relativna ekspresija *Hdac2* gena u jetri životinja tretiranih sa HDH je iznosila približno 5 puta više u odnosu na zdrave životinje. U intestinumu, svi eksperimentalni tretmani su doveli do smanjenja ekspresije *Hdac2* gena u odnosu na grupu EE, a nivo ekspresije ovog gena je u slučaju primene UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg bio statistički značajno niži čak i u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja.



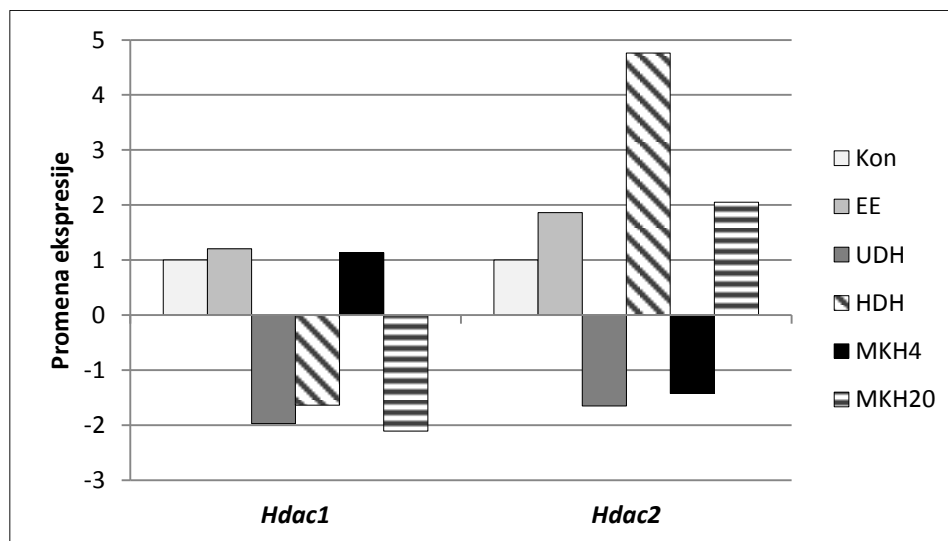
**Grafikon 4.32.** Relativna ekspresija mRNA za *Hdac2* u jetri (a) i intestinumu (b) životinja tretiranih žučnim kiselinama. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. EE



Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa, određene u jetri, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ili model grupu životinja sa holestazom, prikazane su u tabeli 4.20. i na grafikonu 4.33.

**Tabela 4.20.** Promene ekspresije mRNA za *Hdac1* i *Hdac2* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

Grupa	<i>Hdac1</i>		<i>Hdac2</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/
EE	1,21 ± 0,27	1	1,86 ± 0,54	1
UDH	0,51 ± 0,14	0,43 ± 0,12	0,61 ± 0,18	0,34 ± 0,09
HDH	0,61 ± 0,19	0,52 ± 0,16	4,76 ± 1,33	2,65 ± 0,74
MKH4	1,14 ± 0,28	0,97 ± 0,23	0,70 ± 0,21	0,39 ± 0,12
MKH20	0,48 ± 0,13	0,40 ± 0,11	2,06 ± 0,57	1,14 ± 0,31

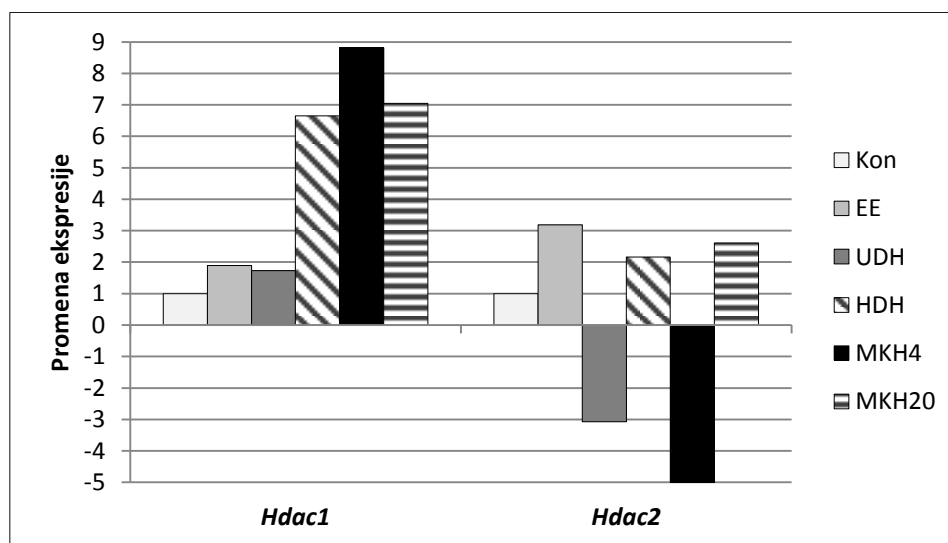


**Grafikon 4.33.** Promene ekspresije mRNA za *Hdac1* i *Hdac2* u jetri životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa, određene u intestinumu, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ili model grupu životinja sa holestazom, prikazane su u tabeli 4.21. i na grafikonu 4.34.

**Tabela 4.21.** Promene ekspresije mRNA za *Hdac1* i *Hdac2* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (Kon) i model grupu životinja sa holestazom (EE)

Grupa	<i>Hdac1</i>		<i>Hdac2</i>	
	vs. Kon	vs. EE	vs. Kon	vs. EE
Kon	1	/	1	/
EE	1,89 ± 0,54	1	3,18 ± 0,76	1
UDH	1,73 ± 0,54	0,96 ± 0,30	0,33 ± 0,10	0,11 ± 0,03
HDH	6,66 ± 1,75	3,67 ± 0,96	2,17 ± 0,64	0,70 ± 0,21
MKH4	8,81 ± 2,19	4,85 ± 1,21	0,20 ± 0,07	0,06 ± 0,02
MKH20	7,05 ± 1,71	3,88 ± 0,94	2,62 ± 0,57	0,85 ± 0,18



**Grafikon 4.34.** Promene ekspresije mRNA za *Hdac1* i *Hdac2* u intestinumu životinja tretiranih žučnim kiselinama, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na grupu zdravih životinja

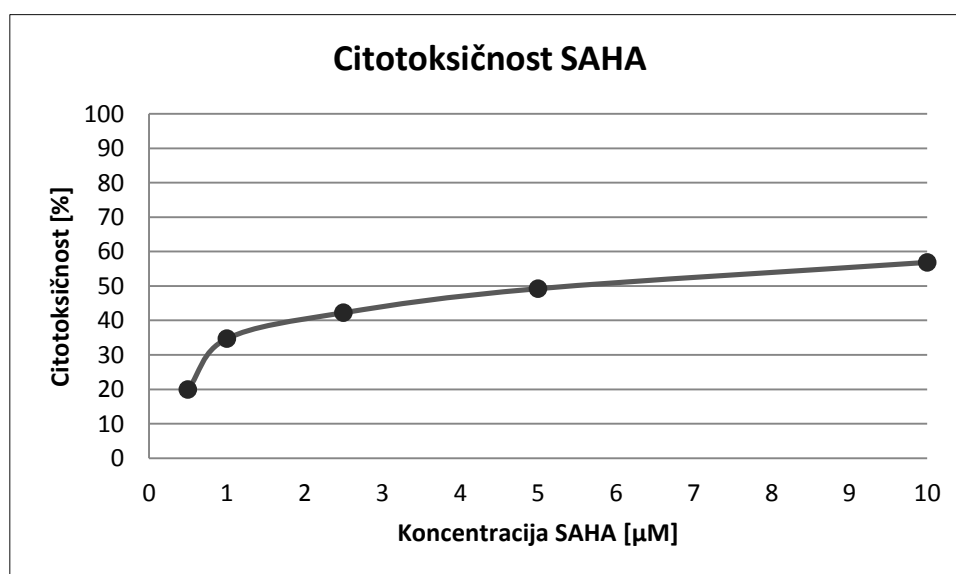
## 4.2. Rezultati *in vitro* studije na HT-29 ćelijskoj liniji humanog kolorektalnog karcinoma

### 4.2.1. Citotoksičnost vorinostata, žučnih kiselina i pro- i antioksidanasa prema HT-29 ćelijskoj liniji

Citotoksična aktivnost epigenetskog agensa i registrovanog antineoplastičnog leka vorinostata (SAHA) prema HT-29 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona je prikazana u tabeli 4.22. i na grafikonu 4.35. Utvrđena je koncentracijski zavisna citotoksična aktivnost vorinostata nakon tretmana HT-29 ćelija u trajanju od 48 h i u opsegu ispitivanih koncentracija od 0,5 do 10  $\mu\text{M}$ . Izračunata  $\text{IC}_{50}$  vrednost, odnosno koncentracija koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% ćelija, iznosi 5,17  $\mu\text{M}$ . Dobijeni rezultati ukazuju na umereno citotoksično dejstvo vorinostata u odnosu na većinu citostatskih lekova, pri čemu je u opsegu koncentracija od 0,5 do 2,5  $\mu\text{M}$  došlo do značajnog, više nego dvostrukog, povećanja citotoksičnosti, dok je u opsegu koncentracija od 2,5 do 10  $\mu\text{M}$  došlo do povećanja citotoksičnosti od svega približno 30%. Citotoksična aktivnost vorinostata prema HT-29 ćelijama u koncentracijama između 1 i 2  $\mu\text{M}$ , koje se smatraju klinički relevantnim jer se postižu *in vivo* kod ljudi, iznosila je 35-39%, što čini ovaj antineoplastični lek dobrim kandidatom za ispitivanje udruženog citotoksičnog dejstva sa različitim agensima.

**Tabela 4.22.** Uticaj vorinostata (SAHA) na vitalnost HT-29 ćelijske linije

SAHA ( $\mu\text{M}$ )	0,5	1	2,5	5	10	$\text{IC}_{50}$
% citotoksičnosti	19,90 $\pm$ 2,39	34,67 $\pm$ 1,67	42,23 $\pm$ 0,28	49,22 $\pm$ 1,14	56,86 $\pm$ 0,49	5,17

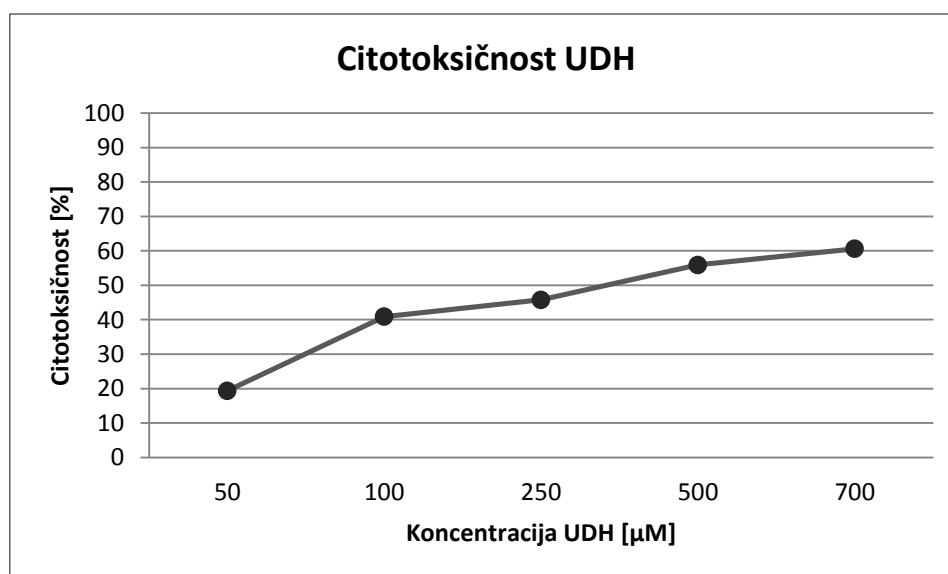


**Grafikon 4.35.** Citotoksično dejstvo vorinostata (SAHA) prema HT-29 ćelijama

Tabela 4.23. i grafikon 4.36. prikazuju rezultate tretiranja HT-29 ćelija prirodnom hidrofilnom žučnom kiselinom, ursodeoksiholnom kiselinom (UDH), tokom 48h na vitalnost ćelija. Utvrđen je koncentracijski zavisani porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u opsegu koncentracija od 50 do 700  $\mu\text{M}$ . Pokazan je statistički značajan porast procenta citotoksičnosti tokom porasta koncentracije UDH. Izračunata  $\text{IC}_{50}$  vrednost UDH prema HT-29 ćelijama iznosi 351,93  $\mu\text{M}$ , što ukazuje na veoma slabo citotoksično dejstvo ove žučne kiseline.

**Tabela 4.23.** Uticaj ursodeoksiholne kiseline (UDH) na vitalnost HT-29 ćelijske linije

UDH ( $\mu\text{M}$ )	50	100	250	500	700	$\text{IC}_{50}$
% citotoksičnosti	$19,38 \pm 1,07$	$40,92 \pm 3,34$	$45,80 \pm 0,69$	$55,91 \pm 1,73$	$60,62 \pm 0,71$	351,93

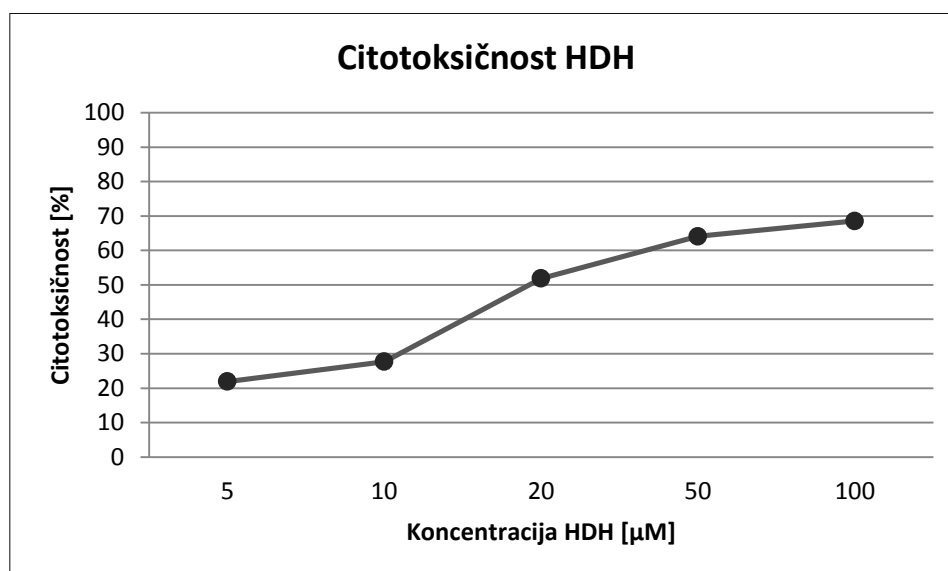


**Grafikon 4.36.** Citotoksično dejstvo ursodeoksiholne kiseline (UDH) prema HT-29 ćelijama

Tabela 4.24. i grafikon 4.37. prikazuju uticaj tretiranja HT-29 ćelija prirodnom žučnom kiselinom, henodeoksiholnom kiselinom (HDH), tokom 48h na vitalnost ćelija. Utvrđen je koncentracijski zavisani porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u opsegu koncentracija od 5 do 100  $\mu\text{M}$ . Dobijeni rezultati ukazuju na statistički značajan porast procenta citotoksičnosti tokom porasta koncentracije HDH. Poređenjem procenta citotoksičnosti između grupe tretirane sa 100  $\mu\text{M}$  HDH i grupa tretiranih sa 5 i 10  $\mu\text{M}$ , nađena je visoka statistička značajnost. Izračunata  $\text{IC}_{50}$  vrednost, odnosno koncentracija koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% ćelija, iznosi 19,58  $\mu\text{M}$ , što ukazuje na značajno izraženije citotoksično dejstvo ove hidrofobne žučne kiseline u poređenju sa hidrofilnom UDH.

**Tabela 4.24.** Uticaj henodeoksiholne kiseline (HDH) na vitalnost HT-29 ćelijske linije

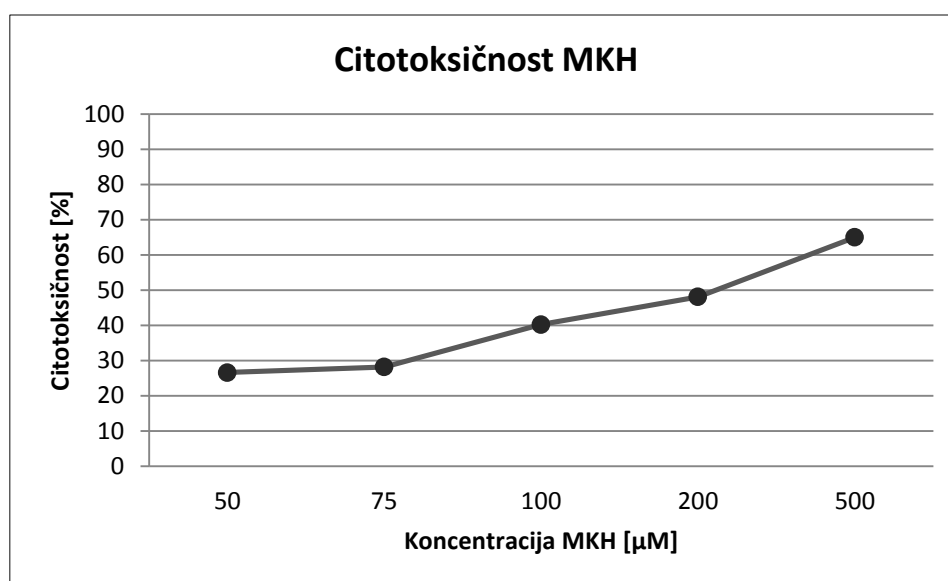
HDH ( $\mu\text{M}$ )	5	10	20	50	100	IC <sub>50</sub>
% citotoksičnosti	21,96 $\pm$ 0,84	27,70 $\pm$ 2,38	51,88 $\pm$ 2,12	64,11 $\pm$ 0,08	68,56 $\pm$ 0,86	19,58

**Grafikon 4.37.** Citotoksično dejstvo henodeoksiholne kiseline (HDH) prema HT-29 ćelijama

U tabeli 4.25. i na grafikonu 4.38. prikazani su rezultati dozno-zavisnih efekata polusintetske žučne kiseline, 12-monoketoholne kiseline (MKH), na vitalnost HT-29 ćelijske linije nakon tretmana u trajanju od 48h. Utvrđen je koncentracijski zavisani porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u opsegu koncentracija od 50 do 500  $\mu\text{M}$ . Dobijeni rezultati ukazuju na statistički značajan porast procenta citotoksičnosti sa porastom koncentracije MKH, pri čemu je kod primene MKH u koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$  došlo do 2,5 puta većeg citotoksičnog efekta nego kod primene koncentracije od 50  $\mu\text{M}$ . Izračunata IC<sub>50</sub> vrednost za ovaj keto derivat holne kiseline, odnosno koncentracija koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% ćelija, iznosi 212,38  $\mu\text{M}$ , što ukazuje na značajno slabije citotoksično dejstvo u poređenju sa hidrofobnom HDH, i nešto izraženije citotoksično dejstvo u odnosu na hidrofilnu UDH.

**Tabela 4.25.** Uticaj 12-monoketoholne kiseline (MKH) na vitalnost HT-29 ćelijske linije

MKH ( $\mu\text{M}$ )	50	75	100	200	500	IC <sub>50</sub>
% citotoksičnosti	26,56 $\pm$ 2,42	28,15 $\pm$ 3,34	40,22 $\pm$ 0,86	48,10 $\pm$ 0,84	65,02 $\pm$ 3,61	212,38



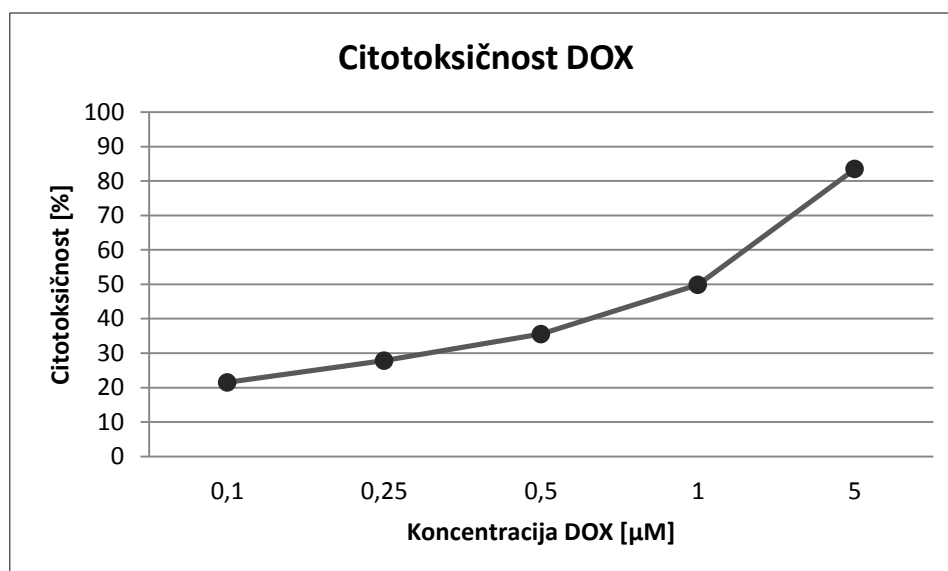
**Grafikon 4.38.** Citotoksično dejstvo 12-monoketoholne kiseline (MKH) prema HT-29 ćelijama

U tabeli 4.26. i grafikonu 4.39. prikazan je uticaj dobro poznatog citotoksičnog agensa i antitumorskog leka doksorubicina (DOX) na vitalnost HT-29 ćelija nakon tretmana u trajanju od 48h. Utvrđen je koncentracijski zavisani porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u opsegu koncentracija od 0,1 do 5  $\mu\text{M}$ . Pokazan je statistički značajan porast procenta citotoksičnosti sa porastom koncentracije DOX, pri čemu je citotoksično dejstvo primenjene koncentracije od 5  $\mu\text{M}$  iznosilo 4 puta više u odnosu na koncentraciju od 0,1  $\mu\text{M}$ .

Dobijeni rezultati ukazuju na veoma izraženo citotoksično dejstvo, s obzirom da  $\text{IC}_{50}$  vrednost, odnosno koncentracija agensa koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% tretiranih ćelija, iznosi samo 0,85  $\mu\text{M}$ , što je oko 6 puta manje od epigenetskog agensa i takođe antitumorskog leka vorinostata, a čak 25 puta manje u odnosu na HDH, kao hidrofobnu žučnu kiselinu sa dobro poznatim citotoksičnim efektima.

**Tabela 4.26.** Uticaj doksorubicina (DOX) na vitalnost HT-29 ćelijske linije

DOX ( $\mu\text{M}$ )	0,1	0,25	0,5	1	5	$\text{IC}_{50}$
% citotoksičnosti	21,53 $\pm$ 0,97	27,83 $\pm$ 7,59	35,54 $\pm$ 5,33	49,87 $\pm$ 0,68	83,49 $\pm$ 0,61	0,85

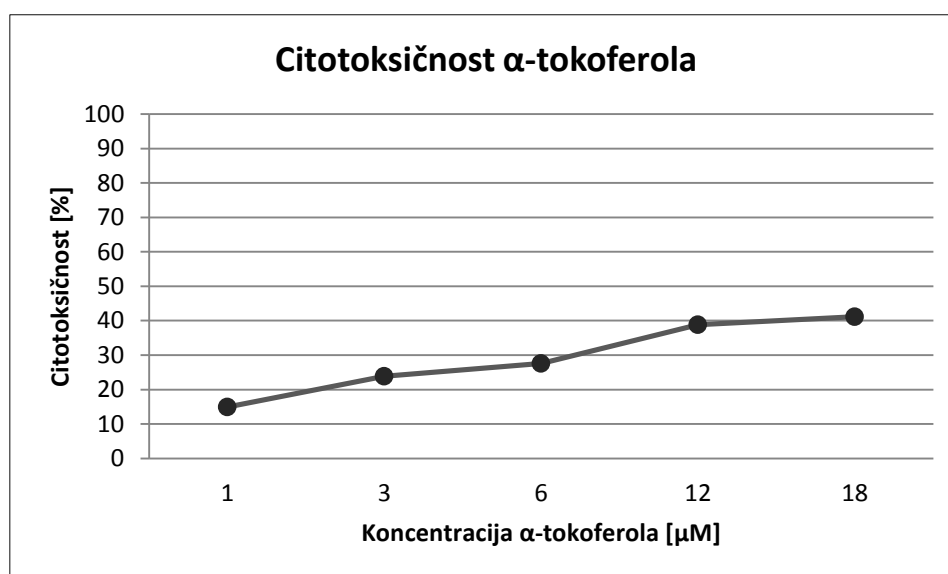


**Grafikon 4.39.** Citotoksično dejstvo doksorubicina (DOX) prema HT-29 ćelijama

Tabela 4.27. i grafikon 4.40. prikazuju uticaj tretiranja HT-29 ćelija  $\alpha$ -tokoferolom (vitaminom E), kao lipofilnim antioksidansom, tokom 48h na vitalnost ćelija. U opsegu ispitivanih koncentracija od 1 do 18  $\mu\text{M}$ ,  $\alpha$ -tokoferol nije ispoljio značajno citotoksično dejstvo, odnosno nije dostignuta  $\text{IC}_{50}$  vrednost. Utvrđen je, međutim, porast citotoksičnosti na koncentracijski-zavisani način u ispitivanom opsegu koncentracija.

**Tabela 4.27.** Uticaj  $\alpha$ -tokoferola na vitalnost HT-29 ćelijske linije

$\alpha$ -tokoferol ( $\mu\text{M}$ )	1	3	6	12	18	$\text{IC}_{50}$
% citotoksičnosti	14,92 $\pm$ 2,36	23,83 $\pm$ 1,48	27,58 $\pm$ 1,03	38,79 $\pm$ 0,46	41,12 $\pm$ 1,29	-

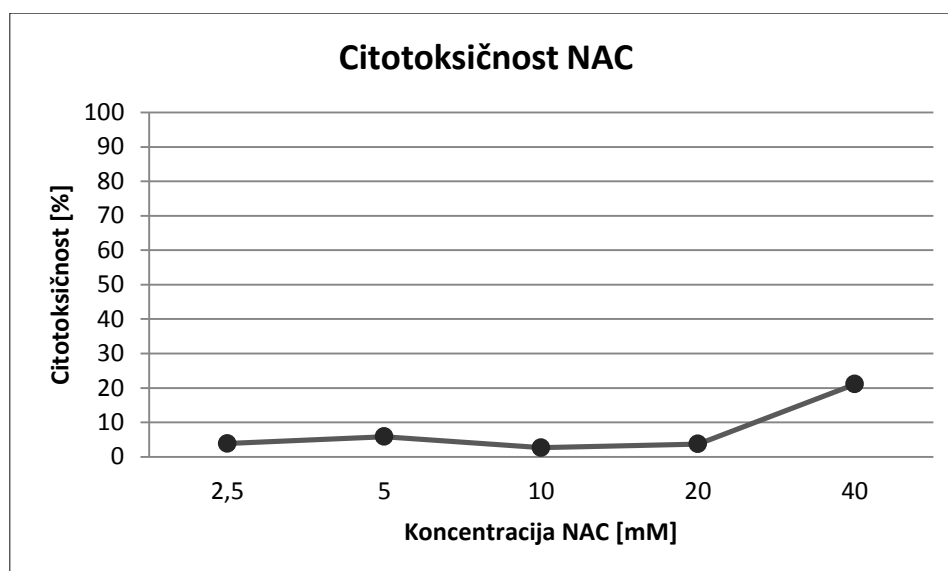


**Grafikon 4.40.** Citotoksično dejstvo  $\alpha$ -tokoferola prema HT-29 ćelijama

Tabela 4.28. i grafikon 4.41. prikazuju rezultate dozno-zavisnih efekata sintetskog antioksidansa i prekursora glutationa, N-acetil cisteina (NAC), na vitalnost HT-29 ćelijske linije nakon tretmana od 48h. U opsegu ispitivanih, veoma visokih koncentracija od 2,5 do 40 mM, NAC je ispoljio izuzetno slabo citotoksično dejstvo, daleko ispod  $IC_{50}$  vrednosti. U poređenju sa  $\alpha$ -tokoferolom, NAC je ispoljio slabije citotoksično dejstvo prema HT-29 ćelijskoj liniji.

**Tabela 4.28.** Uticaj N-acetil cisteina (NAC) na vitalnost HT-29 ćelijske linije

NAC (mM)	2,5	5	10	20	40	$IC_{50}$
% citotoksičnosti	3,85 ± 0,50	5,85 ± 0,88	2,14 ± 1,95	3,72 ± 1,65	21,12 ± 3,62	-



**Grafikon 4.41.** Citotoksično dejstvo N-acetil cisteina (NAC) prema HT-29 ćelijama

#### 4.2.2. Uticaj žučnih kiselina, doksorubicina i antioksidanasa na citotoksičnost vorinostata prema HT-29 ćelijskoj liniji

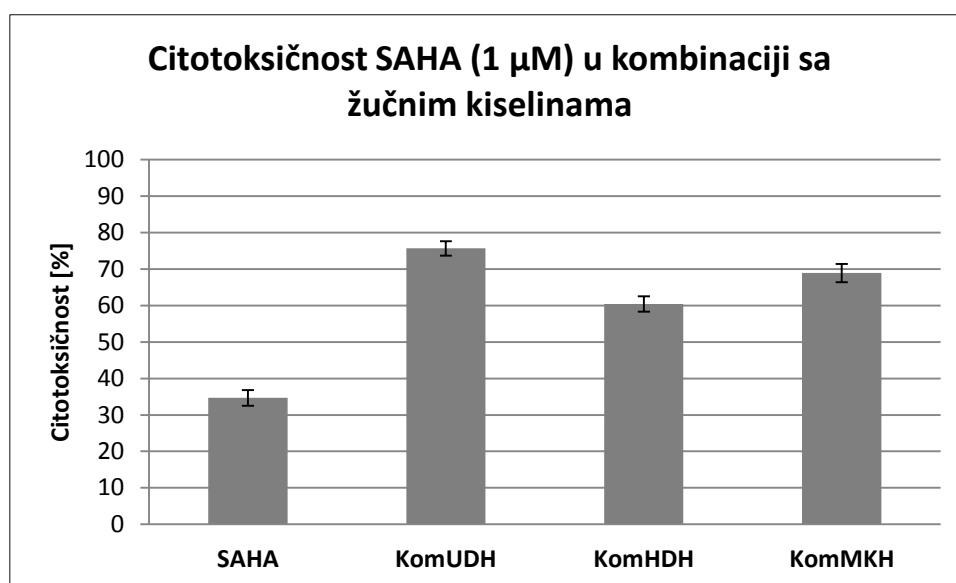
Epigenetski agens vorinostat, primenjen u klinički relevantnim koncentracijama od 1  $\mu$ M i 2  $\mu$ M, ispoljio je citotoksičnost od 34,67% i 39,01% prema HT-29 ćelijskoj liniji. Ispitan je uticaj žučnih kiselina u koncentracijama koje inhibiraju 20% ćelijskog rasta ( $IC_{20}$ ) na citotoksični efekat vorinostata prema HT-29 ćelijama. Takođe, ispitan je uticaj antitumorskog leka DOX sa izraženim prooksidativnim svojstvima, u koncentraciji koja odgovara  $IC_{20}$  vrednosti, kao i uticaj antioksidanasa  $\alpha$ -tokoferola (TOC) i N-acetil cisteina (NAC) u netoksičnim koncentracijama, na citotoksičnost vorinostata.



Rezultati kotretmana HT-29 ćelijske linije sa 1  $\mu\text{M}$  vorinostata i koncentracijama UDH od 50  $\mu\text{M}$ , HDH od 5  $\mu\text{M}$  i MKH od 35  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{20}$  vrednosti), prikazani su u tabeli 4.29. i na grafikonu 4.42. Kotretman ćelija sa sve tri ispitivane žučne kiseline je doveo do povećanja citotoksičnosti vorinostata koje je bilo visoko statistički značajno ( $p < 0,001$ ). Najizraženiji efekat je ostvarila hidrofilna žučna kiselina UDH u kombinaciji sa vorinostatom (grupa KomUDH), zatim MKH (grupa KomMKH), i na kraju hidrofobna HDH (grupa KomHDH). Sve tretirane grupe ćelija razlikovale su se međusobno statistički značajno u vrednostima citotoksičnosti.

**Tabela 4.29.** Uticaj žučnih kiselina na citotoksičnu aktivnost vorinostata u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  prema HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Koncentracija agensa	Citotoksičnost [%]	CI indeks	Tip interakcije
SAHA	SAHA 1 $\mu\text{M}$	34,67 $\pm$ 2,18	/	/
KomUDH	SAHA 1 $\mu\text{M}$ UDH 50 $\mu\text{M}$	75,69 $\pm$ 1,99	0,049 $\pm$ 0,009	sinergizam
KomHDH	SAHA 1 $\mu\text{M}$ HDH 5 $\mu\text{M}$	60,40 $\pm$ 2,10	0,186 $\pm$ 0,021	sinergizam
KomMKH	SAHA 1 $\mu\text{M}$ MKH 35 $\mu\text{M}$	68,92 $\pm$ 2,51	0,101 $\pm$ 0,017	sinergizam

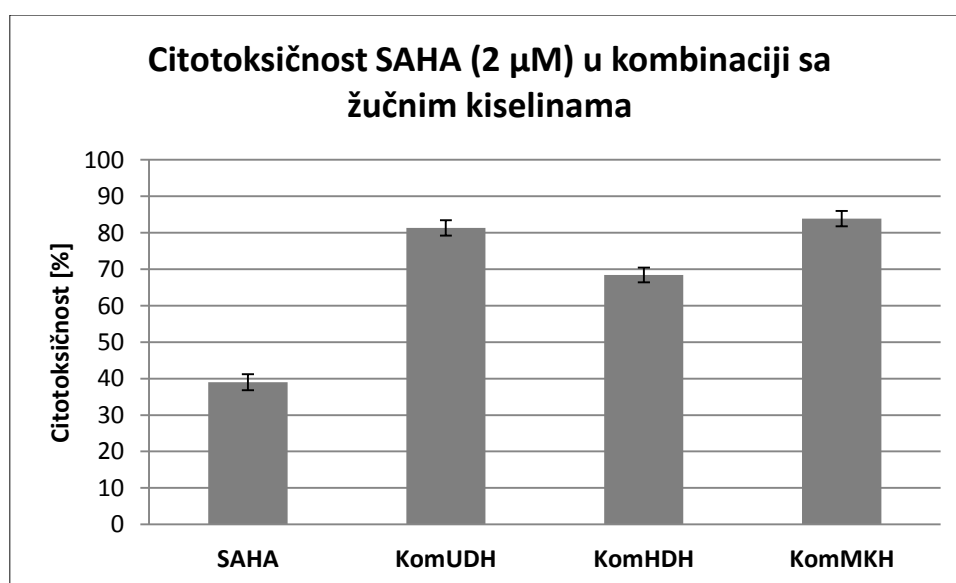


**Grafikon 4.42.** Citotoksičnost vorinostata u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  u kombinaciji sa žučnim kiselinama prema HT-29 ćelijskoj liniji

U tabeli 4.30. i na grafikonu 4.43. prikazani su rezultati citotoksičnosti vorinostata u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  prema HT-29 ćelijama, a u kombinaciji sa žučnim kiselinama u  $\text{IC}_{20}$  koncentracijama. Kotretman ćelija sa sve tri ispitivane žučne kiseline imao je sličan uticaj na citotoksičnu aktivnost SAHA u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  kao i u nižoj koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ , jer je doveo do povećanja citotoksičnosti koje je bilo visoko statistički značajno u sva tri slučaja ( $p < 0,001$ ). Najizraženiji citotoksični efekat je utvrđen u KomUDH grupi ćelija, a najslabiji u KomHDH tretiranoj grupi. Sve ispitivane grupe su se međusobno statistički značajno razlikovale u vrednostima citotoksičnosti, osim grupa ko-tretiranih sa UDH i MKH.

**Tabela 4.30.** Uticaj žučnih kiselina na citotoksičnu aktivnost vorinostata u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  prema HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Koncentracija agensa	Citotoksičnost [%]	CI indeks	Tip interakcije
SAHA	SAHA 2 $\mu\text{M}$	39,01 $\pm$ 2,20	/	/
KomUDH	SAHA 2 $\mu\text{M}$ UDH 50 $\mu\text{M}$	81,35 $\pm$ 2,11	0,039 $\pm$ 0,008	sinergizam
KomHDH	SAHA 2 $\mu\text{M}$ HDH 5 $\mu\text{M}$	68,40 $\pm$ 2,01	0,149 $\pm$ 0,024	sinergizam
KomMKH	SAHA 2 $\mu\text{M}$ MKH 35 $\mu\text{M}$	83,91 $\pm$ 2,09	0,036 $\pm$ 0,009	sinergizam

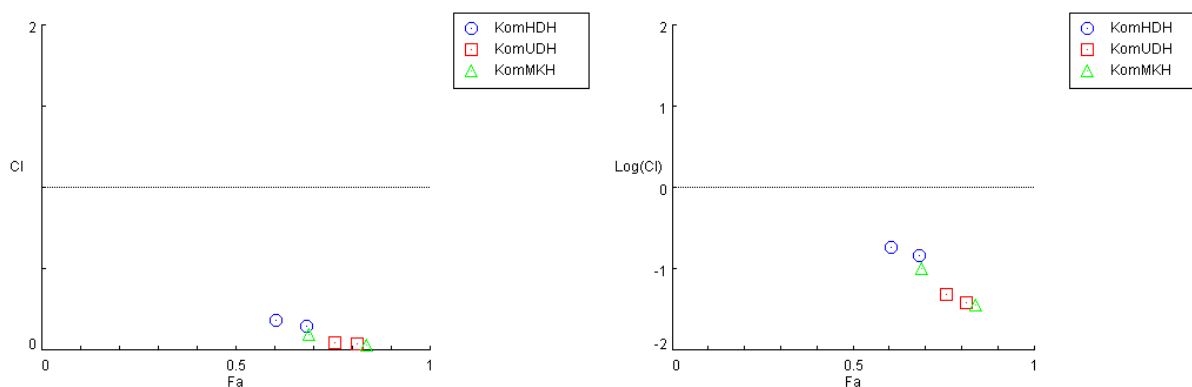


**Grafikon 4.43.** Citotoksičnost vorinostata u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  u kombinaciji sa žučnim kiselinama prema HT-29 ćelijskoj liniji

Primenom CompuSyn softvera izvršena je kvantitativna analiza odnosa doza-efekat na osnovu vrednosti citotoksičnosti vorinostatata u kombinaciji sa odabranim žučnim kiselinama i izračunat je CI indeks (*Combination Index*) koji određuje tip interakcije dva istovremeno primenjena agensa. CI indeks je kvantitativni pokazatelj tipa interakcije i može imati vrednost od 0 do 2, pri čemu CI vrednosti bliske 2 ukazuju na antagonistički efekat, vrednosti bliske 0 na sinergistički efekat, dok vrednosti bliske 1 ukazuju na aditivni efekat. Logaritam CI indeksa se takođe može koristiti za procenu i prikaz tipa interakcije, pri čemu pozitivne vrednosti ukazuju na antagonizam, a negativne na sinergizam.

Primenom CI algoritma odnosa doze i efekta utvrđeno je da sve tri ispitivane žučne kiseline ostvaruju sinergistički efekat sa vorinostatatom u obe primenjene koncentracije. Vrednosti CI indeksa za kombinacije vorinostatata sa UDH, HDH, i MKH navedene su u tabelama 4.29. i 4.30., dok su CI i  $\log(\text{CI})$  vrednosti prikazane na grafikonu 4.44.

U kombinaciji sa vorinostatatom u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ , najizraženiji sinergistički efekat je ostvarila hidrofilna UDH (CI=0,049), zatim MKH (CI=0,101), a najmanje izražen sinergistički efekat je ostvarila hidrofobna HDH (CI=0,186), iako sve tri vrednosti CI indeksa ukazuju na jak sinergizam. Dok su prirodne žučne kiseline UDH i HDH ostvarile slične vrednosti CI indeksa u kombinaciji sa vorinostatatom u koncentracijama od 1  $\mu\text{M}$  i od 2  $\mu\text{M}$ , sintetska žučna kiselina MKH je ostvarila mnogo izraženiji sinergistički efekat sa vorinostatatom u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$ , pri čemu je došlo do sniženja vrednosti CI indeksa sa 0,186 u kombinaciji sa vorinostatatom u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  na 0,036 u kombinaciji sa vorinostatatom u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$ .

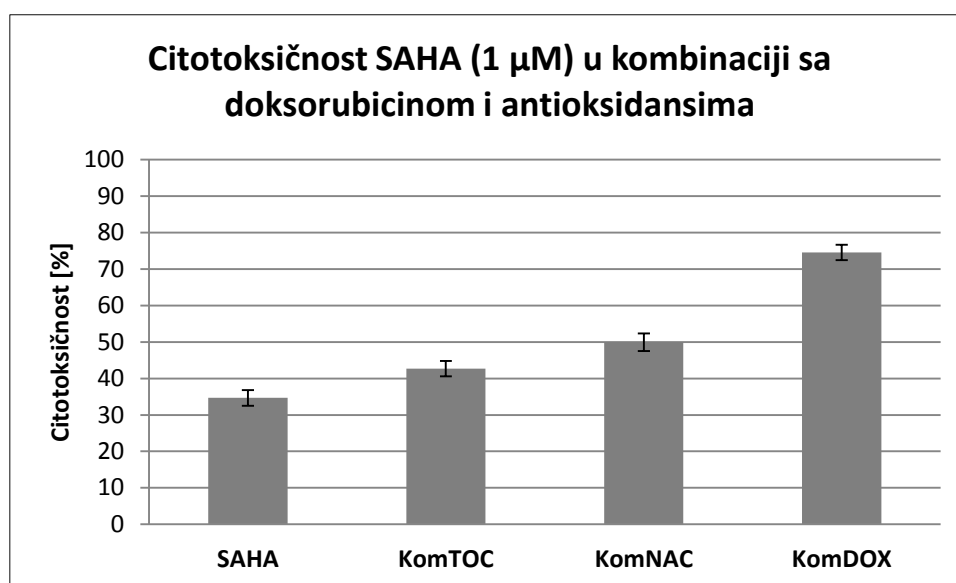


**Grafikon 4.44.** Vrednosti CI indeksa i  $\log(\text{CI})$  kao pokazatelja tipa interakcije vorinostatata u koncentracijama od 1  $\mu\text{M}$  i 2  $\mu\text{M}$  i žučnih kiselina primenjenih na HT-29 ćelijskoj liniji

U tabeli 4.31. i na grafikonu 4.45. prikazani su rezultati citotoksičnosti vorinostata u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  prema HT-29 ćelijama, u uslovima povišenog oksidativnog stresa usled primene doksorubicina i uslovima sniženog oksidativnog stresa nakon ko-inkubacije sa vitaminom E i N-acetil cisteinom. Kotretman ćelija sa DOX doveo je povećanja citotoksičnosti koje je bilo visoko statistički značajno ( $p < 0,001$ ), u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo vorinostatom, ali i u odnosu na obe grupe ko-tretirane antioksidansima (grupe KomTOC i KomNAC). Kotretman sa NAC je doveo do statistički značajnih većih vrednosti citotoksičnosti u odnosu na grupu ćelija tretiranih sa SAHA i  $\alpha$ -tokoferolom ( $p = 0,017$ ).

**Tabela 4.31.** Uticaj doksorubicina i antioksidanasa na citotoksičnu aktivnost vorinostata u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  prema HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Koncentracija agensa		Citotoksičnost [%]	CI indeks	Tip interakcije
SAHA	SAHA 1 $\mu\text{M}$		34,67 $\pm$ 2,18	/	/
KomTOC	SAHA 1 $\mu\text{M}$	TOC 3 $\mu\text{M}$	42,72 $\pm$ 2,11	0,357 $\pm$ 0,084	sinergizam
KomNAC	SAHA 1 $\mu\text{M}$	NAC 10 mM	49,95 $\pm$ 2,39	0,198 $\pm$ 0,045	sinergizam
KomDOX	SAHA 1 $\mu\text{M}$	DOX 0,1 $\mu\text{M}$	74,57 $\pm$ 2,10	0,053 $\pm$ 0,012	sinergizam

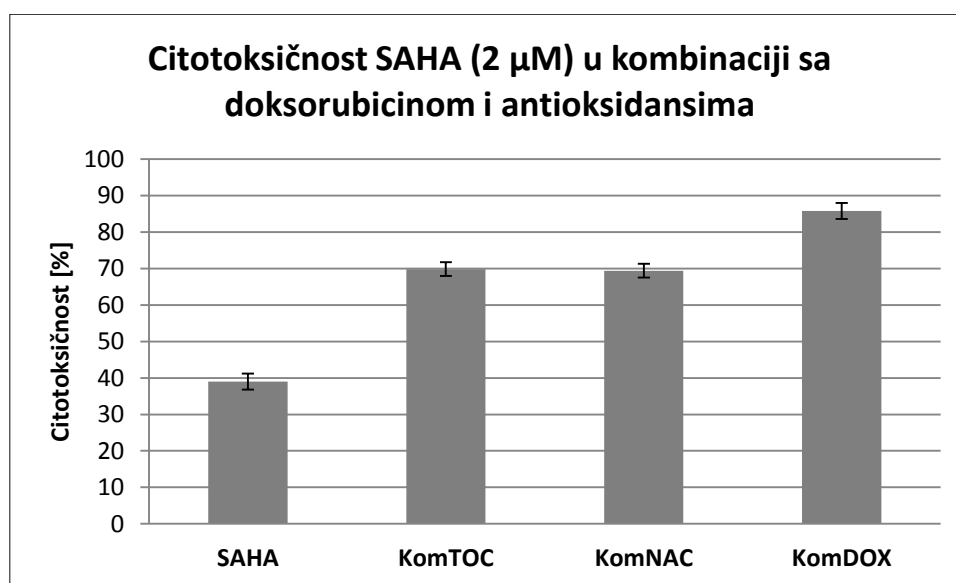


**Grafikon 4.45.** Citotoksičnost vorinostata u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  u kombinaciji sa doksorubicinom i antioksidansima prema HT-29 ćelijskoj liniji

Rezultati tretiranja HT-29 ćelijske linije vorinostatom u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$ , u kombinaciji sa  $\alpha$ -tokoferolom (KomTOC), N-acetil cisteinom (KomNAC) i doksorubicinom (KomDOX), prikazani su u tabeli 4.32. i na grafikonu 4.46. Kotretman ćelija sa prooksidativnim agensom DOX i antioksidansima imao je sličan uticaj na citotoksičnu aktivnost SAHA u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  kao i u nižoj koncentraciji. Kotretman ćelija sa DOX doveo je visoko statistički značajnog povećanja citotoksičnosti ( $p < 0,001$ ) u odnosu na grupu ćelija tretiranih samo vorinostatom, ali i u odnosu na grupe KomTOC i KomNAC. Za razliku od kombinacija sa vorinostatom u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ , kombinacije  $\alpha$ -tokoferola i NAC sa 2  $\mu\text{M}$  vorinostata nisu ispoljile statistički značajno različite vrednosti citotoksičnosti.

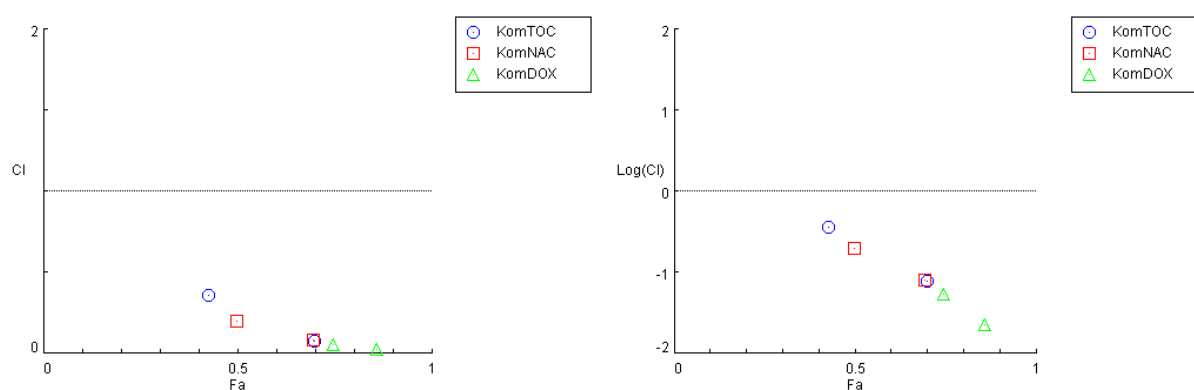
**Tabela 4.32.** Uticaj doksorubicina i antioksidanasa na citotoksičnu aktivnost vorinostata u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  prema HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Koncentracija agensa	Citotoksičnost [%]	CI indeks	Tip interakcije
SAHA	SAHA 2 $\mu\text{M}$	39,01 $\pm$ 2,20	/	/
KomTOC	SAHA 2 $\mu\text{M}$ TOC 3 $\mu\text{M}$	69,87 $\pm$ 1,90	0,077 $\pm$ 0,011	sinergizam
KomNAC	SAHA 2 $\mu\text{M}$ NAC 10 mM	69,41 $\pm$ 1,89	0,080 $\pm$ 0,016	sinergizam
KomDOX	SAHA 2 $\mu\text{M}$ DOX 0,1 $\mu\text{M}$	85,82 $\pm$ 2,19	0,023 $\pm$ 0,007	sinergizam



**Grafikon 4.46.** Citotoksičnost vorinostata u koncentraciji od 2  $\mu\text{M}$  u kombinaciji sa doksorubicinom i antioksidansima prema HT-29 ćelijskoj liniji

Primenom CI algoritma odnosa doze i efekta utvrđeno je da prooksidativni lek DOX, ali i antioksidansi  $\alpha$ -tokoferol i NAC, ostvaruju sinergistički efekat sa vorinostatom u obe primenjene koncentracije od 1  $\mu$ M i 2  $\mu$ M. Vrednosti CI indeksa za kombinacije vorinostata sa  $\alpha$ -tokoferolom, NAC i DOX navedene su u tabelama 4.31. i 4.32., dok su CI i  $\log(\text{CI})$  vrednosti prikazane na grafikonu 4.47. U kombinaciji sa vorinostatom u obe koncentracije, najizraženiji sinergistički efekat je ostvario DOX. Sva tri primenjena agensa su ostvarila jači sinergistički efekat u kombinaciji sa SAHA u koncentraciji od 2  $\mu$ M nego u koncentraciji od 1  $\mu$ M. Dok je u kombinaciji sa nižom koncentracijom SAHA, NAC ispoljio jači sinergistički efekat u odnosu na  $\alpha$ -tokoferol (CI za KomNAC 0,198 vs. CI za KomTOC 0,357), pri višoj koncentraciji SAHA, CI indeksi za ova dva primenjena antioksidansa su bila približno jednaka (CI za KomNAC 0,080 vs. CI za KomTOC 0,077).



**Grafikon 4.47.** Vrednosti CI indeksa i  $\log(\text{CI})$  kao pokazatelja tipa interakcije vorinostata u koncentracijama od 1  $\mu$ M i 2  $\mu$ M sa doksorubicinom i antioksidansima na HT-29 ćelijskoj liniji

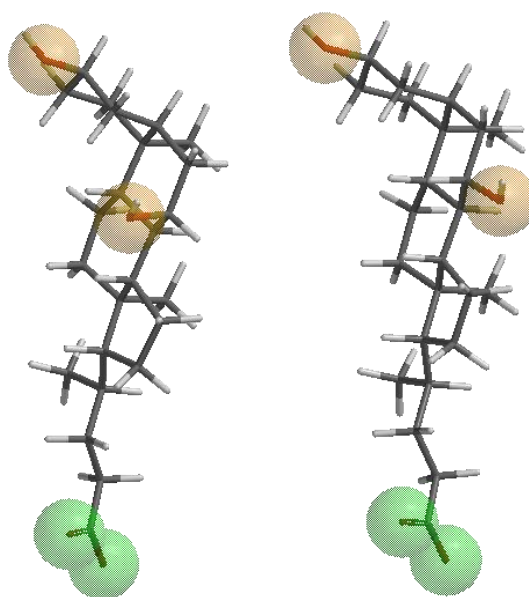
#### 4.2.3. *In silico* analiza vrednosti citotoksičnosti ursodeoksiholne kiseline (UDH) i henodeoksiholne kiseline (HDH) prema HT-29 ćelijskoj liniji

UDH i HDH predstavljaju 7 $\beta$ -epimere, odnosno razlikuju se samo u orijentaciji hidroksilne grupe u položaju 7 molekula, ali su ove dve ispitivane žučne kiseline ispoljile veoma različit nivo citotoksičnosti prema HT-29 ćelijama adenokarcinoma kolona. Koncentracije HDH i UDH koje inhibiraju ćelijski rast za 50% ( $\text{IC}_{50}$  vrednosti) iznosile su 19,58  $\mu$ M i 351,93  $\mu$ M, što ukazuje na izuzetno značajan uticaj stereochemije hidroksilnih grupa u strukturi žučnih kiselina na njihovu antiproliferativnu aktivnost. U cilju objašnjenja dobijenih rezultata testa citotoksičnosti, pomoću VolSurf+ programa iz optimizovanih 3D struktura HDH i UDH izračunato je 12 molekulskih deskriptora koji ukazuju na polarnost,

rastvorljivost i transport kroz membrane, a čije su vrednosti prikazane u tabeli 4.33. Geometrijska optimizacija struktura HDH i UDH je izvršena semiempirijskom metodom Austin Model 1 (AM1) korišćenjem Spartan 14 softverskog paketa i optimizovane 3D strukture HDH i UDH su prikazane na grafikonu 4.48.

**Tabela 4.33.** Molekulski deskriptori izračunati za henodeoksiholnu kiselinu (HDH) i ursodeoksiholnu kiselinu (UDH) pomoću VolSurf+ programa

VolSurf+ molekularni deskriptori	HDH	UDH
Amfifilni momenat (A)	5,62	4,87
LogP oktanol/voda (LOGP n-Oct)	4,38	4,38
LogP cikloheksan/voda (LOGP c-Hex)	-1,45	-1,45
Veličina polarne površine (PSA)	86,58	86,58
Veličina hidrofobne površine (HSA)	464,20	462,27
Odnos polarne i ukupne površine (PSAR)	0,1572	0,1577
Odnos polarne i hidrofobne površine (PHSAR)	0,1865	0,1873
Intrinzička rastvorljivost (SOLY)	-4,26	-4,30
% vezivanja za proteine (PB)	59,19	56,32
Permeabilnost kroz Caco-2 ćelije (CACO2)	-0,2489	-0,3552
Permeabilnost kroz kožu (SKIN)	-3,31	-3,62
Distribucija kroz krvno-moždanu barijeru (LgBB)	-1,38	-1,50



**Grafikon 4.48.** Optimizovane 3D strukture henodeoksiholne kiseline (HDH) i ursodeoksiholne kiseline (UDH) dobijene upotrebom softvera Spartan 14

Molekulski deskriptor pomoću kog se mogu objasniti ovi različiti citotoksični efekti ispitivanih žučnih kiselina jeste amfifilni momenat (A), koji se definiše kao vektor koji se pruža od centra hidrofobnog do centra hidrofilnog domena. Dužina vektora određuje sposobnost jedinjenja da prolazi kroz biološke membrane i iznosi 5,62 za HDH i 4,87 za UDH. Ovaj rezultat je dodatno potkrepljen vrednostima CACO2, SKIN i LgBB deskriptora koji ukazuju na bolji prodor HDH u odnosu na UDH kroz Caco-2 ćelije, kožu i krvno-moždanu barijeru.

#### 4.2.4. Uticaj žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj vorinostatom

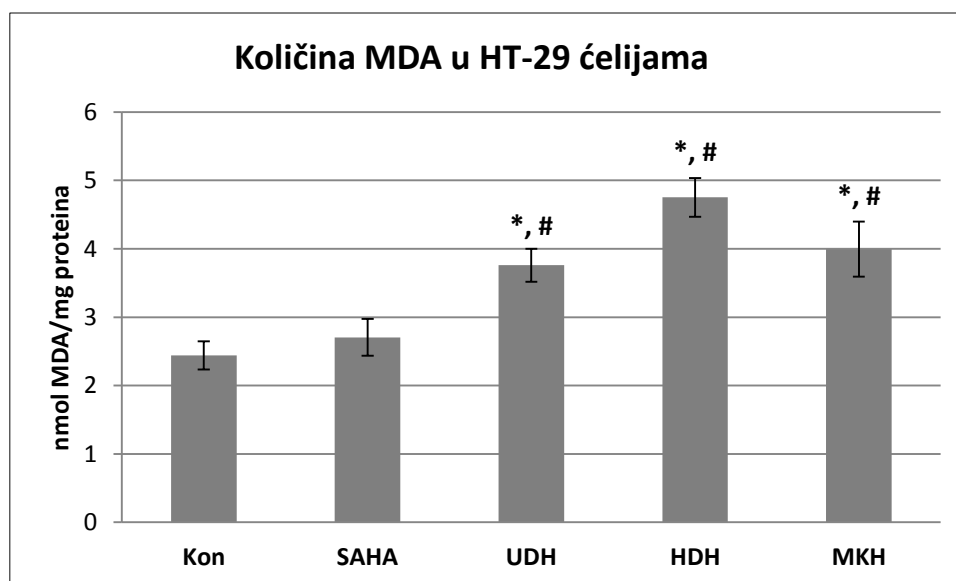
Rezultati merenja koncentracije malon-dialdehida (MDA), kao pokazatelja lipidne peroksidacije, u HT-29 ćelijskoj liniji humanog karcinoma kolona, prikazani su u tabeli 4.34. i na grafikonu 4.49.

Tretiranje ćelija vorinostatom dovelo je do povećanja intenziteta lipidne peroksidacije koje nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu ćelija tretiranih čistim rastvaračem. Primena sve tri ispitivane žučne kiseline je dovela do statistički značajnog porasta koncentracije MDA u odnosu i na kontrolnu grupu ćelija (grupa Kon) i grupu ćelija tretiranu samim vorinostatom (grupa SAHA). Najizraženiji efekat povećanja intenziteta lipidne peroksidacije je ispoljila HDH, sa visoko statistički značajno većom količinom MDA u odnosu na grupe Kon i SAHA ( $p < 0,001$ ). Kada se uporedi intenzitet lipidne peroksidacije među ćelijama tretiranim različitim žučnim kiselinama, utvrđena je statistička značajnost u količini MDA između grupe tretirane kombinacijom vorinostata i HDH i grupe tretirane kombinacijom vorinostata i UDH ( $p = 0,012$ ).

**Tabela 4.34.** Količina MDA kao pokazatelj lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
Količina MDA (nmol MDA/mg proteina)	2,44 ± 0,21	2,70 ± 0,27	3,76 ± 0,24	4,75 ± 0,28	4,00 ± 0,40
Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )	vs. UDH, HDH, MKH	vs. UDH, HDH, MKH	vs. Kon, SAHA, HDH	vs. Kon, SAHA, UDH	vs. Kon, SAHA





**Grafikon 4.49.** Količina MDA kao pokazatelj lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. SAHA

#### 4.2.5. Uticaj žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj vorinostatom

Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD), jednog od ključnih enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu ćelije, određena je u HT-29 ćelijama, i rezultati su prikazani u tabeli 4.35. i na grafikonu 4.50.

U grupi ćelija tretiranih samim vorinostatom (grupa SAHA) došlo je do neznatnog povećanja aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Primena žučnih kiselina u  $IC_{20}$  koncentracijama, u kombinaciji sa vorinostatom u koncentraciji od  $1 \mu\text{M}$ , dovela je do porasta aktivnosti SOD u odnosu i na kontrolnu grupu ćelija i na ćelije tretirane samim vorinostatom. Povećanje aktivnosti SOD je bilo najmanje kod kombinacije SAHA sa HDH i u tom slučaju nije bilo statističke značajnosti. U grupi ćelija MKH ( $1 \mu\text{M}$  SAHA +  $35 \mu\text{M}$  MKH) je došlo do statistički značajnog porasta aktivnosti SOD, u odnosu i na grupu Kon i grupu SAHA ( $p < 0,05$ ), dok je u grupi ćelija UDH ( $1 \mu\text{M}$  SAHA +  $50 \mu\text{M}$  UDH) to povećanje aktivnosti bilo najizraženije, visoko statistički značajno u odnosu na grupe Kon i SAHA ( $p < 0,001$ ). Kada se upoređi specifična aktivnost SOD među ćelijama tretiranim različitim žučnim kiselinama, utvrđena je statistička značajnost između grupe tretirane kombinacijom SAHA i UDH i grupe tretirane kombinacijom SAHA i HDH ( $p = 0,006$ ).

**Tabela 4.35.** Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
Aktivnost enzima (U/mg proteina)	196,84 ± 5,05	197,87 ± 5,07	233,92 ± 8,07	208,15 ± 5,48	221,37 ± 8,85
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. UDH, MKH	vs. UDH, MKH	vs. Kon, SAHA, HDH	vs. UDH	vs. Kon, SAHA

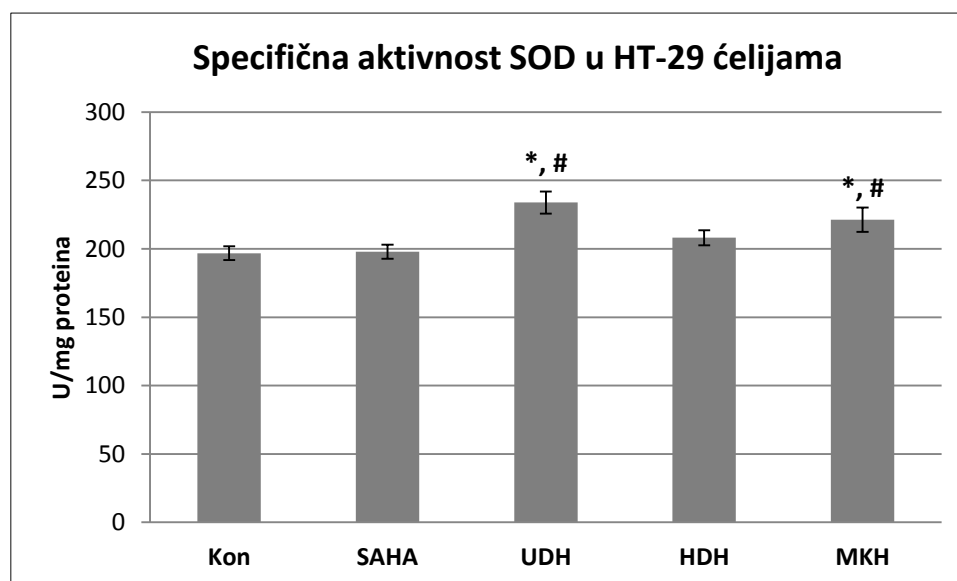
**Grafikon 4.50.** Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u HT-29 ćelijskoj liniji. \*p<0,05 vs. Kon; #p<0,05 vs. SAHA

Tabela 4.36. i grafikon 4.51. prikazuju rezultate specifične aktivnosti katalaze (CAT), enzima koji usko povezano funkcioniše sa SOD u antioksidativnoj odbrani ćelije. U grupi ćelija tretiranoj samo epigenetskim agensom vorinostatom (grupa SAHA) došlo je do porasta u aktivnosti CAT u odnosu kontrolne ćelije, ali taj porast nije bio statistički značajan. Sve tri primenjene žučne kiseline su smanjile aktivnost ovog enzima u odnosu na grupu SAHA. Kotretmani ćelija sa kombinacijama vorinostata i UDH (grupa UDH) i vorinostata i HDH (grupa HDH) doveli su do statistički značajnog sniženja aktivnosti CAT u odnosu na ćelije tretirane samim vorinostatom (p<0,001 UDH vs. SAHA, p=0,025 HDH vs. SAHA), dok za kombinaciju vorinostata i MKH to sniženje nije bilo statistički značajno. Kada se upoređi specifična aktivnost CAT među ćelijskim grupama ko-tretiranim različitim žučnim kiselinama, utvrđena je statistička značajnost samo između grupe tretirane kombinacijom SAHA i UDH i grupe tretirane kombinacijom SAHA i HDH (p=0,003).

**Tabela 4.36.** Specifična aktivnost katalaze (CAT) u HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
Aktivnost enzima (U/mg proteina)	5,71 ± 0,28	6,81 ± 0,69	3,02 ± 1,01	4,61 ± 0,77	6,03 ± 0,66
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. UDH	vs. UDH, HDH	vs. Kon, SAHA, MKH	vs. SAHA	vs. UDH

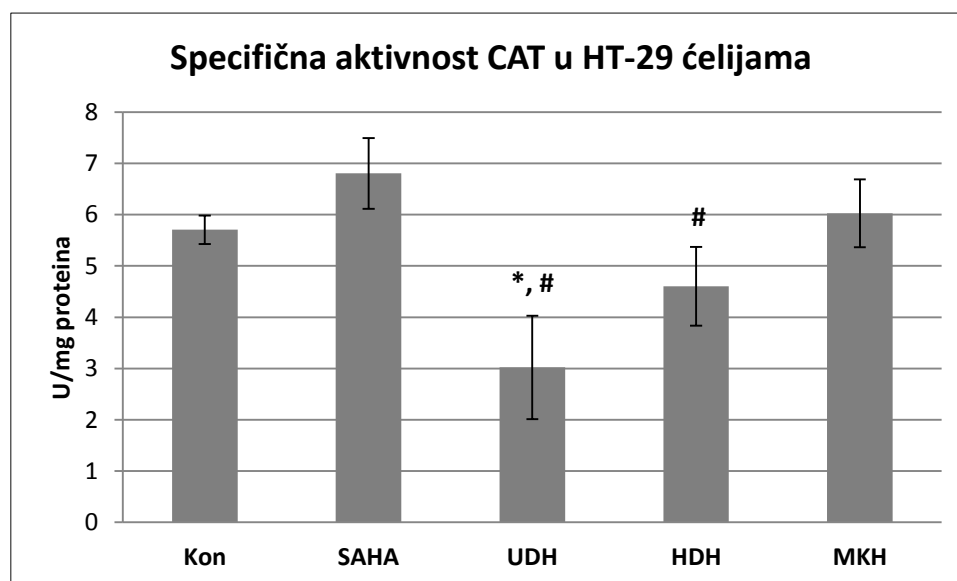
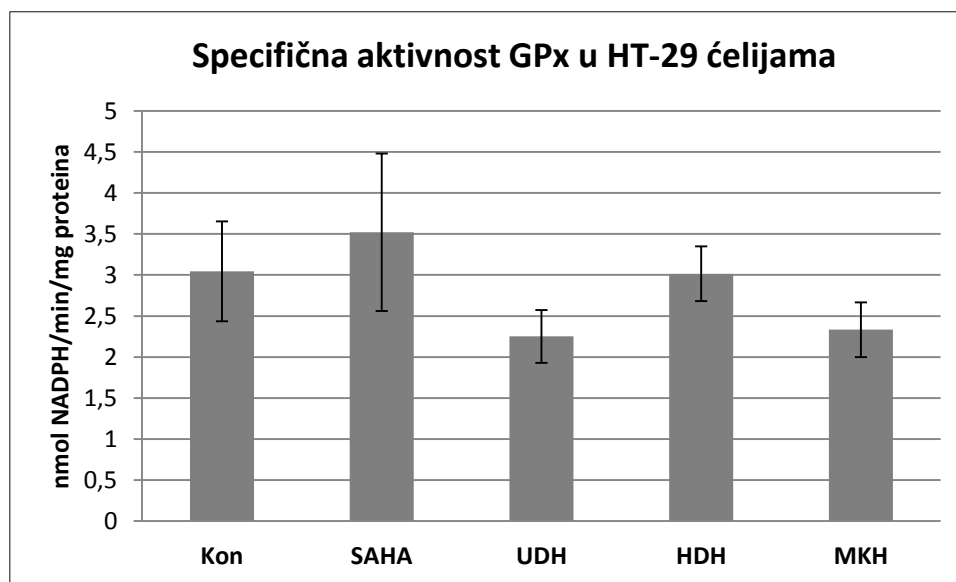
**Grafikon 4.51.** Specifična aktivnost katalaze (CAT) u HT-29 ćelijskoj liniji. \*p<0,05 vs. Kon; #p<0,05 vs. SAHA

Tabela 4.37. i grafikon 4.52. prikazuju vrednosti specifične aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx) u HT-29 ćelijskoj liniji. U svim eksperimentalnim grupama je aktivnost ovog enzima bila niska, u opsegu od 2,25 do 3,52 nmol NADPH/min/mg proteina.

**Tabela 4.37.** Specifična aktivnost glutacion peroksidaze (GPx) u HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
Aktivnost enzima (nmol NADPH/min/mg proteina)	3,04 ± 0,61	3,52 ± 0,96	2,25 ± 0,32	3,01 ± 0,33	2,33 ± 0,33
Statistički značajne razlike (p<0,05)	/	/	/	/	/

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti GPx među eksperimentalnim grupama ćelija, iako se uočava trend rasta aktivnosti GPx nakon tretiranja vorinostatom, kao i sniženje nakon kotretmana sa sve tri ispitivane žučne kiseline. Smanjenje aktivnosti GPx u odnosu na grupu SAHA je bilo najizraženije kod kombinacije vorinostata sa hidrofilnom UDH, dok je najmanje izraženo bilo kod kombinacije vorinostata sa hidrofobnom HDH.

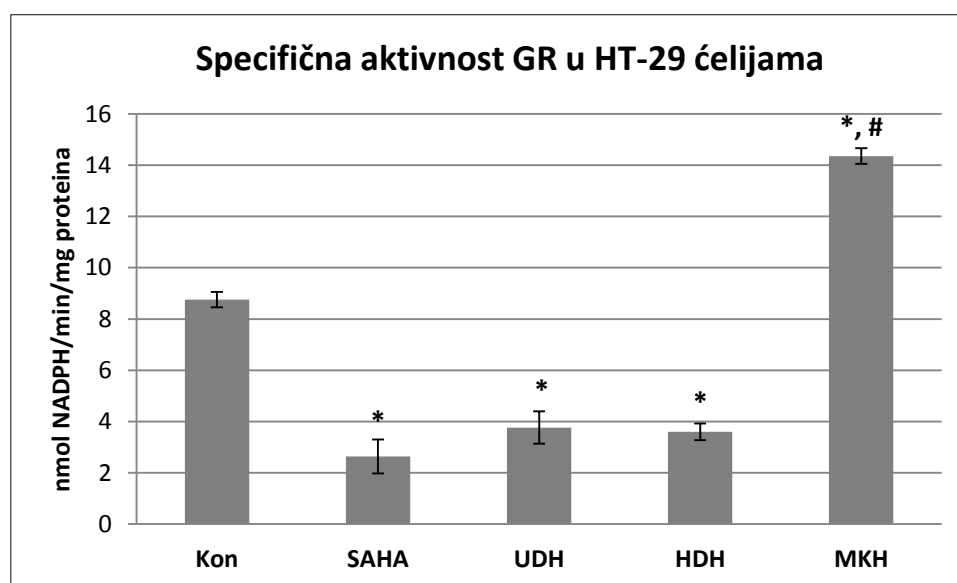


**Grafikon 4.52.** Specifična aktivnost glutacion peroksidaze (GPx) u HT-29 ćelijskoj liniji

Vrednosti specifične aktivnosti glutacion reduktaze (GR), enzima koji funkcioniše usko povezano sa GPx tako što održava adekvatne koncentracije redukovanog glutationa u ćeliji, prikazane su u tabeli 4.38. i na grafikonu 4.53. Profil aktivnosti ovog enzima u HT-29 ćelijama nakon tretmana ispitivanim agensima, u velikoj meri se razlikovao u odnosu na aktivnost GPx. Primena samog epigenetskog agensa vorinostata (grupa SAHA) dovela je do visoko statistički značajnog smanjenja aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu grupu ćelija tretiranih čistim rastvaračem ( $p < 0,001$ ). Kotretman sa UDH i HDH nije uspeo statistički značajno da izmeni aktivnost GR u odnosu na ćelije tretirane samim vorinostatom, odnosno aktivnost ovog enzima je ostala visoko statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Nasuprot tome, kotretman vorinostata sa MKH (grupa MKH) doveo je do visoko statistički značajnog povećanja aktivnosti GR u odnosu i na kontrolnu grupu i na grupu tretiranu samim vorinostatom ( $p < 0,001$  vs. Kon, SAHA). Kada se uporedi specifična aktivnost GR među ćelijskim grupama ko-tretiranim različitim žučnim kiselinama, utvrđeno je da se aktivnost u grupi MKH visoko statistički značajno razlikuje u odnosu na grupe UDH i HDH ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 4.38.** Specifična aktivnost glutation reduktaze (GR) u HT-29 ćelijskoj liniji

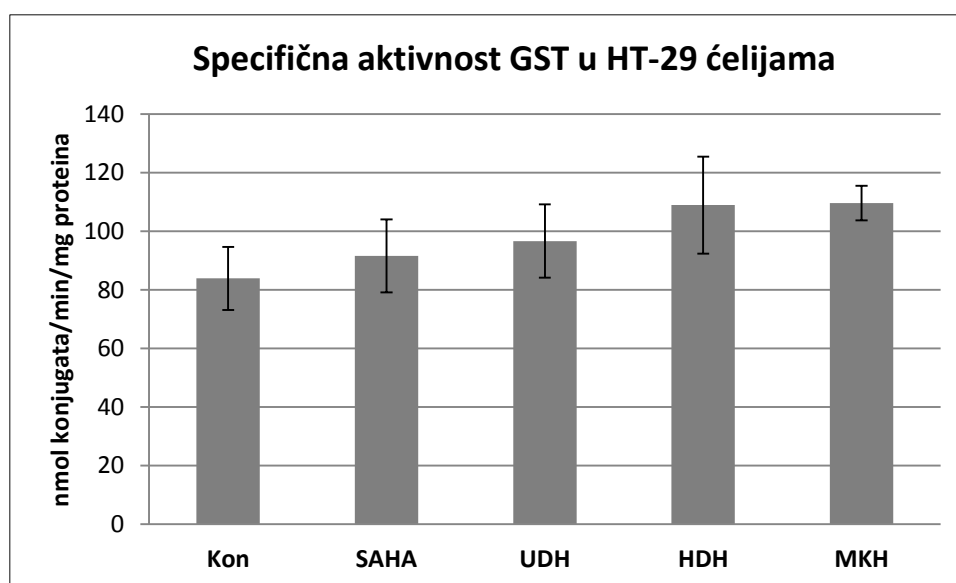
Grupa	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
Aktivnost enzima (nmol NADPH/ min/mg proteina)	8,75 ± 0,30	2,64 ± 0,66	3,77 ± 0,63	3,60 ± 0,33	14,36 ± 0,31
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. SAHA, UDH, HDH, MKH	vs. Kon, MKH	vs. Kon, MKH	vs. Kon, MKH	vs. Kon, SAHA, UDH, HDH

**Grafikon 4.53.** Specifična aktivnost glutation reduktaze (GR) u HT-29 ćelijskoj liniji. \*p<0,05 vs. Kon; #p<0,05 vs. SAHA

U tabeli 4.39. i na grafikonu 4.54. prikazane su vrednosti specifične aktivnosti enzima glutation-S-transferaze (GST) u HT-29 ćelijskoj liniji. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti GST među tretiranim grupama ćelija, iako se uočava trend rasta aktivnosti GST u grupi ćelija tretiranoj samim vorinostatom (grupa SAHA), kao i dalje povećanje aktivnosti nakon kotretmana sa sve tri ispitivane žučne kiseline (grupe UDH, HDH i MKH). Povećanje aktivnosti GST u odnosu na kontrolnu grupu ćelija, ali i grupu SAHA, bilo je najizraženije kod kombinacije vorinostata sa MKH, dok je najmanje izraženo bilo kod kombinacije vorinostata sa UDH, iako između ispitivanih grupa nije bilo statistički značajnih razlika.

**Tabela 4.39.** Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u HT-29 ćelijskoj liniji

Grupa	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
Aktivnost enzima (nmol konjugata/ min/mg proteina)	83,91 ± 10,76	91,60 ± 12,44	96,64 ± 12,51	108,92 ± 16,6	109,59 ± 5,89
Statistički značajne razlike (p<0,05)	/	/	/	/	/

**Grafikon 4.54.** Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u HT-29 ćelijskoj liniji

#### 4.2.6. Uticaj žučnih kiselina na ekspresiju gena u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj vorinostatom

Pomoću kvantitativne *real-time* PCR metode mereni su nivoi ekspresije gena, odnosno količine mRNA ispitivanih gena u odnosu na  $\beta$ -aktin kao referentni gen, u svim tretiranim grupama HT-29 ćelijske kulture humanog adenokarcinoma kolona. Ćelije su tretirane tokom 6 sati epigenetskim agensom vorinostatom u koncentraciji od 1  $\mu$ M, samim ili u kombinaciji sa tri odabrane žučne kiseline (UDH, HDH i MKH) u  $IC_{20}$  koncentracijama, koje su primenjene 30 minuta pre vorinostata. Ispitivane su grupe gena čiji su proteinski proizvodi uključeni u regulaciju procesa apoptoze i proliferacije (*BAX*, *BCL2*, *TP53*, *CD1*, *NF $\kappa$ B*, *PGDH*), oksidativnog statusa ćelije (*SOD*, *CAT*, *GR*, *GST*, *NRF2*), homeostaze žučnih kiselina (*FXR*, *SHP*) i epigenetske regulacije ćelijskih procesa (*HDAC1*, *HDAC2*). Svi ovi ćelijski procesi su od izuzetnog značaja za razvoj, a samim tim i za potencijalnu terapiju karcinoma kolona.

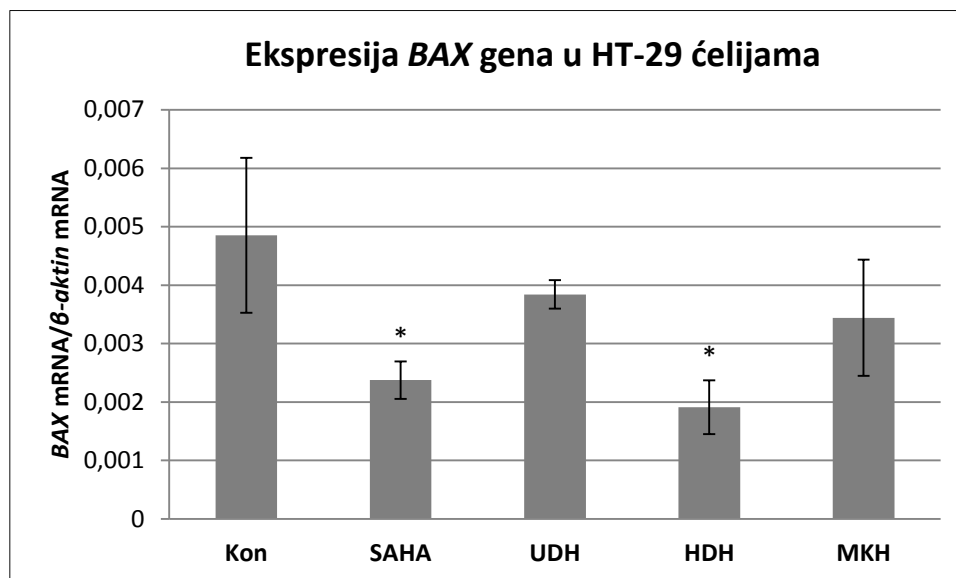
#### 4.2.6.1. Ekspresiona analiza gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije

Vrednosti relativne ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom, sa ili bez žučnih kiselina, prikazane su u tabeli 4.40. i na grafikonima 4.55.-4.60. Apoptoza i proliferacija su veoma povezani procesi i, zapravo, ravnoteža između ova dva ćelijska procesa određuje homeostazu tkiva. Komparativnom Ct metodom izračunate su promene ekspresije (*fold change*) koje pokazuju koliko je puta relativna ekspresija određenog gena manja ili veća u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samim vorinostatom. Vrednosti promene ekspresije gena uključenih u procese apoptoze i proliferacije u HT-29 ćelijskoj liniji prikazane su u tabeli 4.41. i na grafikonu 4.61.

**Tabela 4.40.** Relativna ekspresija mRNA za *BAX*, *BCL2*, *TP53*, *CD1*, *NFκB* i *PGDH* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom

Relativna ekspresija gena	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
<i>BAX</i>	0,0049 ± 0,0013	0,0024 ± 0,0003	0,0038 ± 0,0002	0,0019 ± 0,0005	0,0034 ± 0,0010
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. SAHA, HDH	vs. Kon	/	vs. Kon	/
<i>BCL2</i>	0,0055 ± 0,0005	0,0018 ± 0,0001	0,0046 ± 0,0002	0,0036 ± 0,0002	0,0016 ± 0,0004
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs.SAHA,UDH, HDH, MKH	vs. Kon, UDH, HDH	vs. Kon, SAHA, HDH, MKH	vs. Kon, SAHA, UDH, MKH	vs. Kon, UDH, HDH
<i>TP53</i>	0,0223 ± 0,0036	0,0065 ± 0,0014	0,0154 ± 0,0034	0,0077 ± 0,0011	0,0089 ± 0,0035
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. SAHA, HDH, MKH	vs. Kon, UDH	vs. SAHA, HDH	vs. Kon, UDH	vs. Kon
<i>CD1</i>	0,0058 ± 0,0013	0,0027 ± 0,0003	0,0037 ± 0,0004	0,0020 ± 0,0004	0,0020 ± 0,0008
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs.SAHA,UDH, HDH, MKH	vs. Kon	vs. Kon	vs. Kon	vs. Kon
<i>NFκB</i>	0,0382 ± 0,0123	0,0036 ± 0,0006	0,0043 ± 0,0003	0,0037 ± 0,0003	0,0076 ± 0,0010
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs.SAHA,UDH, HDH, MKH	vs. Kon	vs. Kon	vs. Kon	vs. Kon
<i>PGDH</i>	0,0300 ± 0,0103	0,0385 ± 0,0120	0,0207 ± 0,0038	0,0127 ± 0,0011	0,0377 ± 0,0096
Statistički značajne razlike (p<0,05)	/	vs. HDH	/	vs. SAHA, MKH	vs. HDH

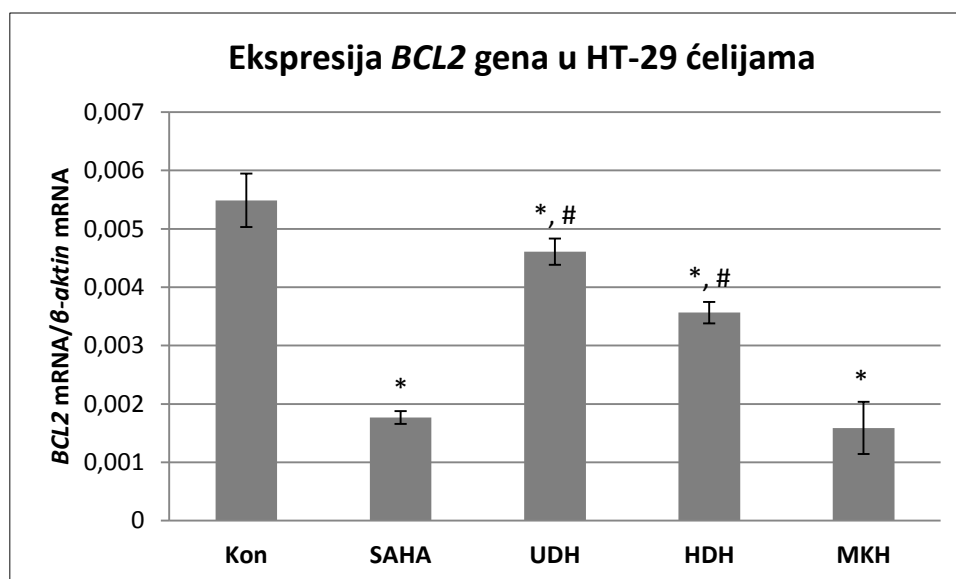
Na grafikonu 4.55. prikazana je relativna ekspresija *BAX* gena koji kodira sintezu proapoptotskog Bax proteina u ćeliji. Ekspresija *BAX* gena je bila negativno regulisana u svim tretiranim grupama HT-29 ćelija. Smanjenje relativne ekspresije ovog gena je bilo statistički značajno ( $p < 0,05$ ) u ćelijama tretiranim vorinostatom, sa ili bez dodatka HDH (grupe SAHA i HDH) u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Kada se uporede grupe ko-tretirane različitim žučnim kiselinama, nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima relativne ekspresije *BAX* mRNA između tri ispitivane grupe.



**Grafikon 4.55.** Relativna ekspresija mRNA za *BAX* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon

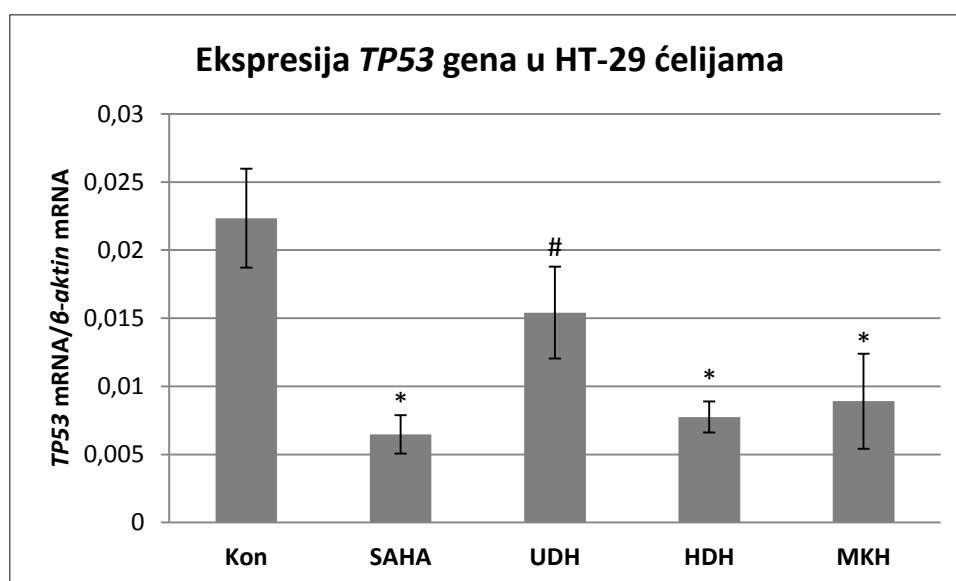
Vrednosti relativne ekspresije antiapoptotskog gena *BCL2* u HT-29 ćelijama su prikazane na grafikonu 4.56. Kao i u slučaju *BAX* gena, došlo je do smanjenja ekspresije *BCL2* u svim tretiranim grupama ćelija u odnosu na kontrolne ćelije, ali je to smanjenje u slučaju grupa SAHA i MKH bilo visoko statistički značajno ( $p < 0,001$ ) i iznosilo je više od 3 puta. Kada se uporedi relativna ekspresija *BCL2* među ćelijskim grupama ko-tretiranim različitim žučnim kiselinama, utvrđena je statistička značajnost između svih grupa, pri čemu je to smanjenje bilo najintenzivnije u slučaju kotretmana sa MKH ( $p < 0,001$  vs. Kon), a najmanje izraženo kod kotretmana sa UDH ( $p = 0,043$  vs. Kon).





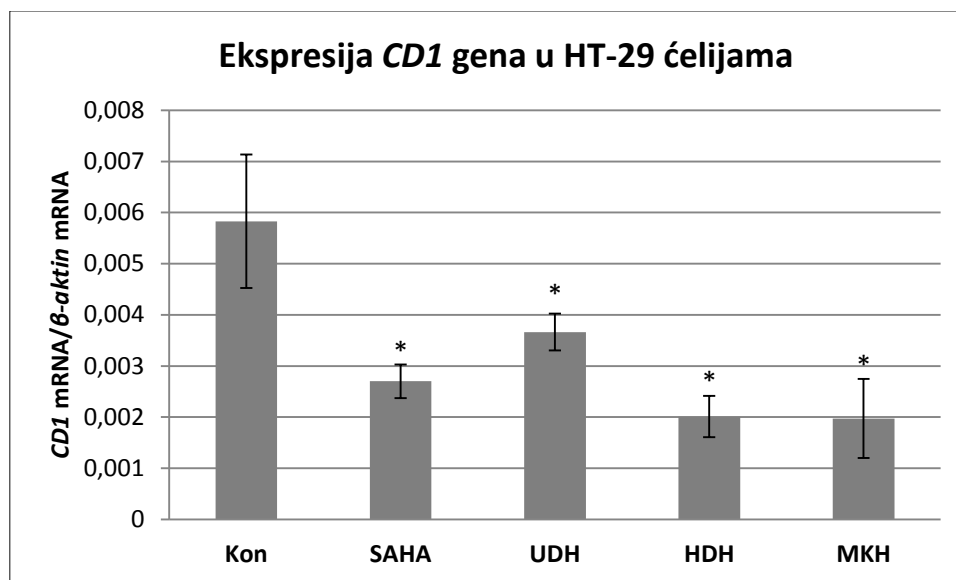
**Grafikon 4.56.** Relativna ekspresija mRNA za *BCL2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. SAHA

Protein p53, kodiran *TP53* genom, ima značajnu ulogu u sprečavanju razvoja kancera, jer ukoliko dođe do oštećenja DNK, on zaustavlja ćelijski ciklus i inicira apoptozu oštećene ćelije. Na grafikonu 4.57. se uočava da tretman HT-29 ćelija vorinostatom dovodi do trostrukog smanjenja ekspresije ovog tumor supresora u odnosu na kontrolne ćelije ( $p < 0,001$  vs. Kon). Kotretman sa ispitivanim žučnim kiselinama je doveo do povećanja relativne ekspresije *TP53* gena ka vrednostima u kontrolnoj grupi, ali je to povećanje bilo statistički značajno samo u slučaju kotretmana sa UDH ( $p = 0,02$  vs. SAHA).



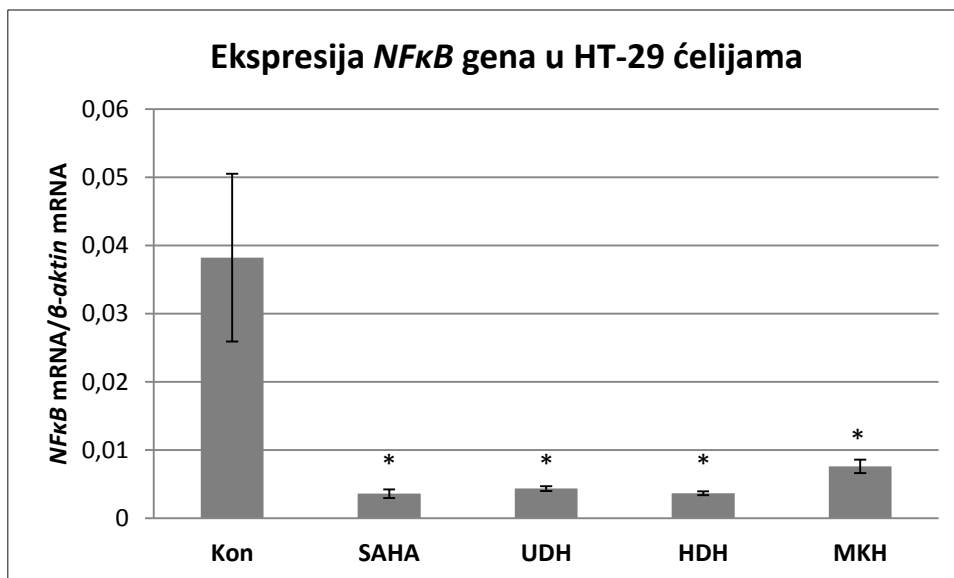
**Grafikon 4.57.** Relativna ekspresija mRNA za *TP53* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. SAHA

Na grafikonu 4.58. su prikazane vrednosti relativne ekspresije *CD1* gena koji kodira sintezu ciklin D1 proteina, jednog od najvažnijih faktora neophodnih za proliferaciju ćelije. Ekspresija *CD1* gena je bila negativno regulisana u svim tretiranim grupama HT-29 ćelija, pri čemu je to smanjenje relativne ekspresije bilo visoko statistički značajno u odnosu na kontrolu u grupama HDH i MKH ( $p < 0,001$  vs. Kon). Ispitivane žučne kiseline u kotretmanu sa vorinostatom nisu ispoljile statistički značajne razlike u vrednostima ekspresije *CD1* gena.



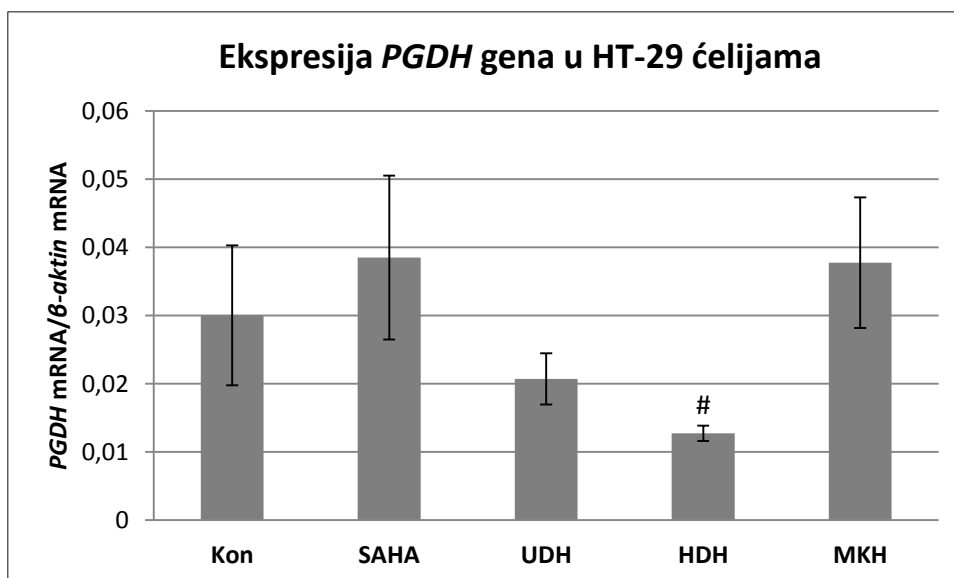
**Grafikon 4.58.** Relativna ekspresija mRNA za *CD1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon

Vrednosti relativne ekspresije gena za nuklearni faktor  $\kappa$ B ( $NF\kappa B$ ), čija perzistentna aktivacija dovodi do rezistencije na apoptozu, prikazane su na grafikonu 4.59. Profil ekspresije po eksperimentalnim grupama je sličan za ovaj redoks-senzitivni transkripcioni faktor kao i za *CD1* gen, ali je ovde smanjenje ekspresije u odnosu na kontrolnu grupu bilo mnogo intenzivnije, visoko statistički značajno ( $p < 0,001$ ) u svim grupama u odnosu na kontrolu. U slučaju HT-29 ćelija tretiranih samim vorinostatom i u kombinaciji sa HDH, to smanjenje ekspresije *NF $\kappa$ B* gena je iznosilo više od 10 puta. Kada se uporede grupe kotretirane različitim žučnim kiselinama, nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima relativne ekspresije ovog gena.



**Grafikon 4.59.** Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon

Na grafikonu 4.60. su prikazane vrednosti relativne ekspresije *PGDH* gena, koji kodira sintezu 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaze, ključnog enzima u katabolizmu prostaglandina, čija je ekspresija značajno smanjena u brojnim tumorima u odnosu na odgovarajuća zdrava tkiva. Tretman HT-29 ćelija vorinostatom doveo je do blagog povećanja ekspresije *PGDH* gena, dok je kotretman sa odabranim žučnim kiselinama doveo do smanjenja ekspresije, ali je to smanjenje bilo statistički značajno samo u grupi HDH ćelija ( $p = 0,03$  vs. SAHA).



**Grafikon 4.60.** Relativna ekspresija mRNA za *PGDH* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. # $p < 0,05$  vs. SAHA

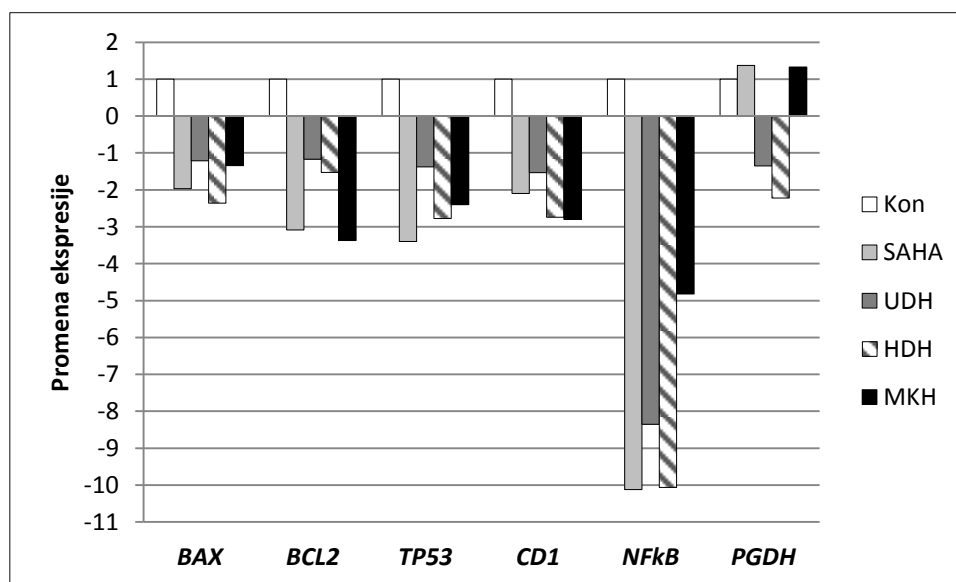
Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u procese apoptoze i proliferacije u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samim vorinostatom, prikazane su u tabeli 4.41. i na grafikonu 4.61.

**Tabela 4.41.** Promene ekspresije mRNA za *BAX*, *BCL2*, *TP53*, *CD1*, *NFκB* i *PGDH* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranih vorinostatom

Grupa	<i>BAX</i>		<i>BCL2</i>		<i>TP53</i>	
	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA
Kon	1	/	1	/	1	/
SAHA	0,51 ± 0,10	1	0,32 ± 0,03	1	0,29 ± 0,06	1
UDH	0,82 ± 0,15	1,65 ± 0,30	0,85 ± 0,15	2,65 ± 0,47	0,72 ± 0,23	2,52 ± 0,82
HDH	0,42 ± 0,15	0,85 ± 0,30	0,66 ± 0,08	2,04 ± 0,27	0,36 ± 0,10	1,25 ± 0,34
MKH	0,74 ± 0,22	1,49 ± 0,46	0,30 ± 0,09	0,92 ± 0,28	0,42 ± 0,17	1,45 ± 0,58

Grupa	<i>CD1</i>		<i>NFκB</i>		<i>PGDH</i>	
	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA
Kon	1	/	1	/	1	/
SAHA	0,48 ± 0,09	1	0,10 ± 0,02	1	1,38 ± 0,48	1
UDH	0,65 ± 0,14	1,39 ± 0,30	0,12 ± 0,02	1,24 ± 0,24	0,74 ± 0,22	0,57 ± 0,16
HDH	0,37 ± 0,12	0,78 ± 0,25	0,10 ± 0,01	1,03 ± 0,12	0,45 ± 0,10	0,35 ± 0,08
MKH	0,36 ± 0,15	0,76 ± 0,31	0,21 ± 0,04	2,16 ± 0,34	1,33 ± 0,35	1,03 ± 0,27



**Grafikon 4.61.** Promene ekspresije mRNA za *BAX*, *BCL2*, *TP53*, *CD1*, *NFκB* i *PGDH* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija

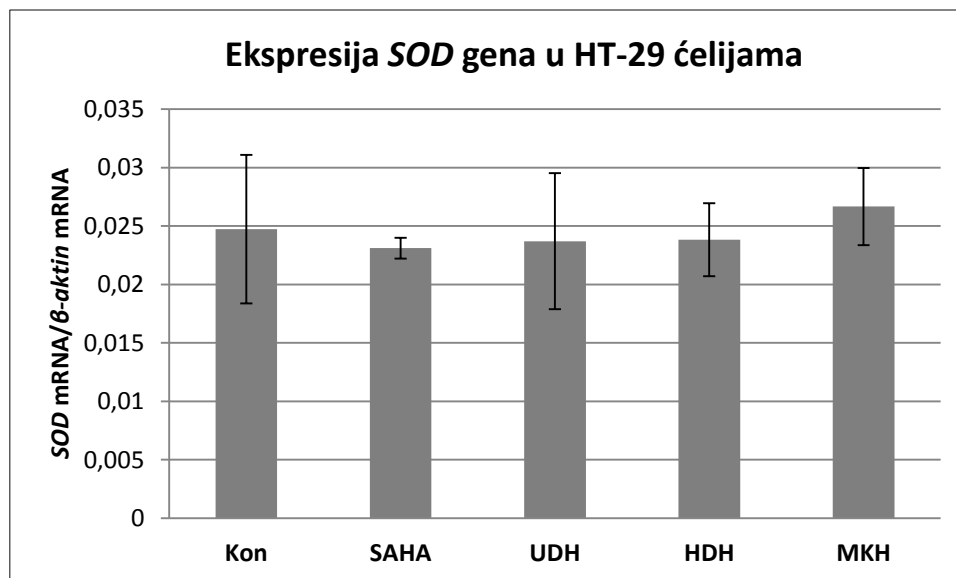
#### 4.2.6.2. Ekspresiona analiza gena antioksidativne zaštite

Vrednosti relativne ekspresije gena koji regulišu oksidativni status u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom, u prisustvu ili odsustvu odabranih žučnih kiselina, prikazane su u tabeli 4.42. i na grafikonima 4.62.-4.66. Komparativnom Ct metodom izračunate su promene ekspresije (*fold change*) gena antioksidativne zaštite u HT-29 ćelijskoj liniji i te vrednosti su prikazane u tabeli 4.43. i na grafikonu 4.67.

**Tabela 4.42.** Relativna ekspresija mRNA za *SOD*, *CAT*, *GR*, *GST* i *NRF2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom

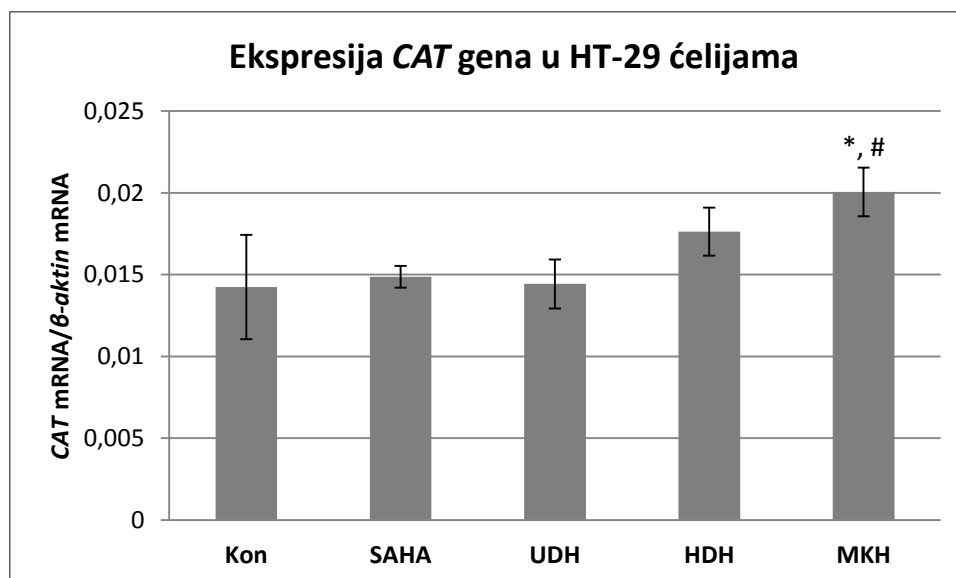
Relativna ekspresija gena	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
<i>SOD</i>	0,0247 ± 0,0064	0,0231 ± 0,0009	0,0237 ± 0,0058	0,0238 ± 0,0031	0,0267 ± 0,0033
Statistički značajne razlike (p<0,05)	/	/	/	/	/
<i>CAT</i>	0,0142 ± 0,0032	0,0149 ± 0,0007	0,0144 ± 0,0015	0,0176 ± 0,0015	0,0200 ± 0,0015
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. MKH	vs. MKH	vs. MKH	/	vs. Kon, SAHA, UDH
<i>GR</i>	0,0103 ± 0,0027	0,0083 ± 0,0010	0,0071 ± 0,0003	0,0067 ± 0,0005	0,0161 ± 0,0035
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. MKH	vs. MKH	vs. MKH	vs. MKH	vs. Kon, SAHA, UDH, HDH
<i>GST</i>	0,0004 ± 0,0001	0,0001 ± 0,0000	0,0002 ± 0,0000	0,0003 ± 0,0000	0,0004 ± 0,0000
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. SAHA	vs. Kon, MKH	/	/	vs. SAHA
<i>NRF2</i>	0,0413 ± 0,0072	0,0271 ± 0,0017	0,0161 ± 0,0014	0,0127 ± 0,0008	0,0318 ± 0,0068
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. SAHA, UDH, HDH	vs. Kon, HDH	vs. Kon, MKH	vs. Kon, SAHA, MKH	vs. UDH, HDH

Na grafikonu 4.62. su prikazane relativne ekspresije mRNA za antioksidativni enzim superoksid dismutazu (*SOD*) u HT-29 ćelijskoj liniji. Nijedan eksperimentalni tretman nije doveo do statistički značajnih promena u relativnoj ekspresiji *SOD* gena, mada se može uočiti da sam vorinostat dovodi do smanjenja ekspresije ovog gena, dok se u kombinaciji sa žučnim kiselinama relativna ekspresija *SOD* vraća na nivo kontrolnih ćelija.



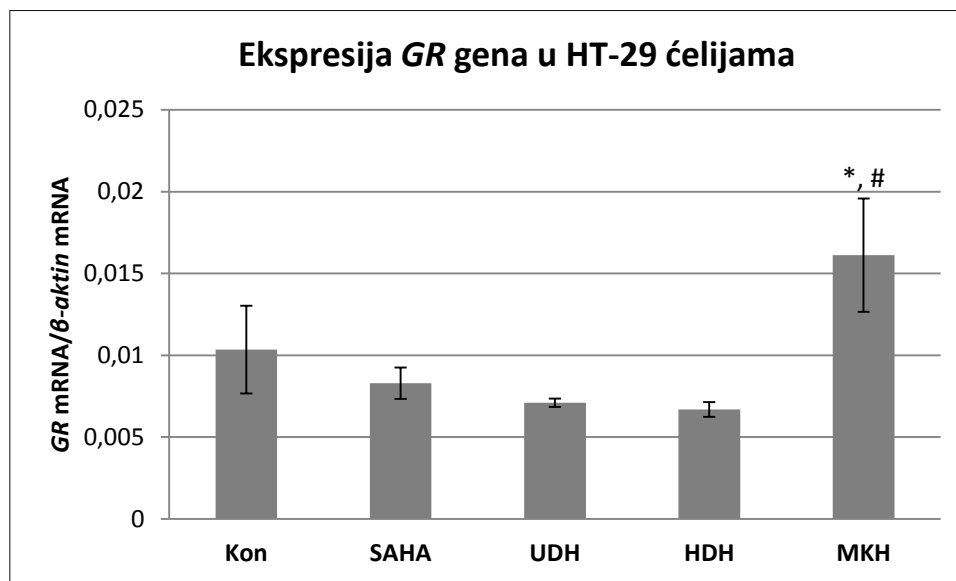
**Grafikon 4.62.** Relativna ekspresija mRNA za *SOD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom

Vrednosti relativne ekspresije mRNA za katalazu (*CAT*) prikazane su na grafikonu 4.63. Tretman HT-29 ćelija vorinostatom doveo je do neznatnog povećanja ekspresije *CAT* gena. Kotretman sa HDH i MKH je imao za posledicu dalje povećanje relativne ekspresije ovog gena, koje je samo u slučaju grupe MKH bilo statistički značajno u odnosu na grupe Kon i SAHA ( $p=0,02$  vs. Kon;  $p=0,04$  vs. SAHA). Kada se uporede grupe ko-tretirane različitim žučnim kiselinama, nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima relativne ekspresije *CAT* gena.



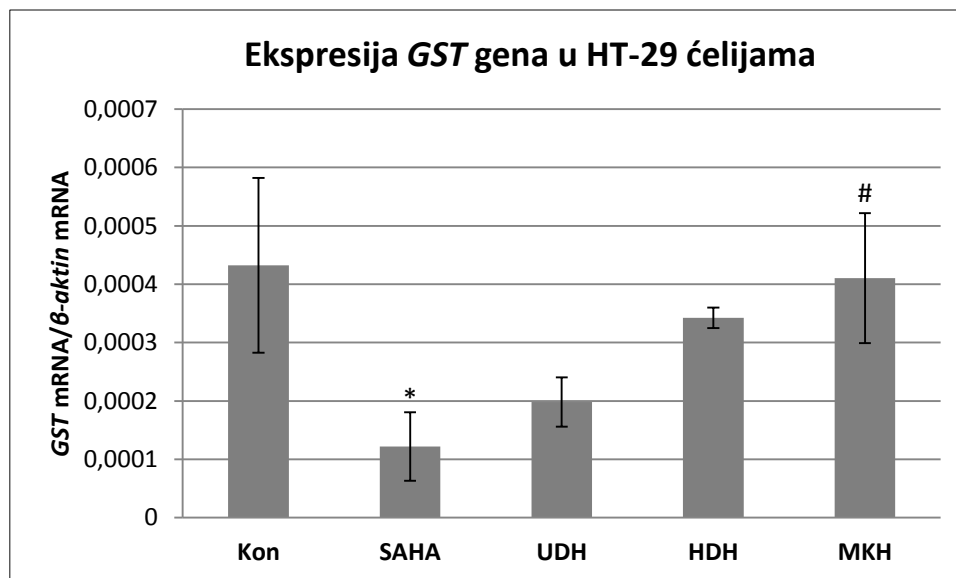
**Grafikon 4.63.** Relativna ekspresija mRNA za *CAT* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. SAHA

Relativna ekspresija *GR* gena, koji kodira sintezu antioksidativnog enzima glutation reduktaze, nakon tretmana vorinostatom i žučnim kiselinama u HT-29 ćelijama, prikazana je na grafikonu 4.64. Tretman samim epigenetskim agensom vorinostatom, kao i kotretmani sa UDH i HDH, doveli su do smanjenja ekspresije *GR* gena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija, ali bez statističke značajnosti. Kotretman ćelija sa vorinostatom i MKH je, nasuprot tome, doveo do statistički značajnog povećanja relativne ekspresije *GR* gena u odnosu i na kontrolne ćelije i ćelije tretirane samo vorinostatom ( $p=0,04$  vs. Kon;  $p=0,005$  vs. SAHA).



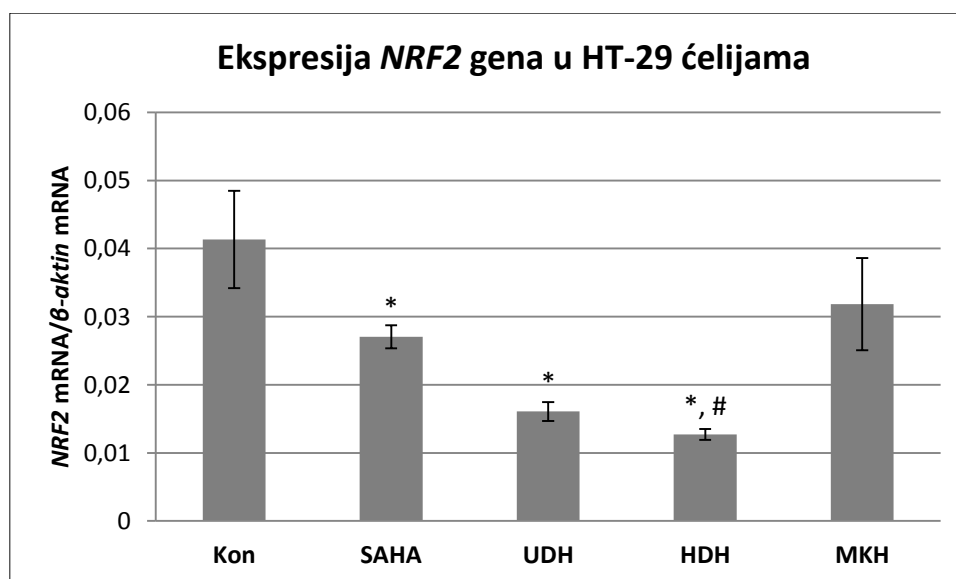
**Grafikon 4.64.** Relativna ekspresija mRNA za *GR* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p<0,05$  vs. Kon; # $p<0,05$  vs. SAHA

Grafikon 4.65. prikazuje vrednosti relativne ekspresije gena za glutation-S-transferazu (*GST*) u HT-29 ćelijama. Vorinostat primenjen sam u koncentraciji od 1  $\mu$ M doveo je do trostrukog smanjenja nivoa ekspresije *GST* gena u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Kotretman žučnim kiselinama doveo je do povećanja relativne ekspresije ovog gena, koje je samo u slučaju grupe MKH bilo statistički značajno u odnosu na grupu tretiranu samim vorinostatom ( $p=0,02$  vs. SAHA).



**Grafikon 4.65.** Relativna ekspresija mRNA za *GST* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. SAHA

Vrednosti relativne ekspresije *NRF2* gena u HT-29 ćelijskoj liniji prikazane su na grafikonu 4.66. *NRF2* (*nuclear factor E2-related factor 2*) ima značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ćelije, jer stimuliše ekspresiju gena koji kodiraju sintezu antioksidativnih enzima. Uočava se negativna regulacija relativne ekspresije *NRF2* gena nakon svih eksperimentalnih tretmana. Najizraženije smanjenje ekspresije ovog gena je bilo nakon kotretmana sa HDH, iznosilo je više od 3 puta u odnosu na kontrolu ( $p < 0,001$  vs. Kon), a bilo je statistički značajno i u odnosu na grupu SAHA ( $p = 0,02$  vs. SAHA).



**Grafikon 4.66.** Relativna ekspresija mRNA za *NRF2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. SAHA



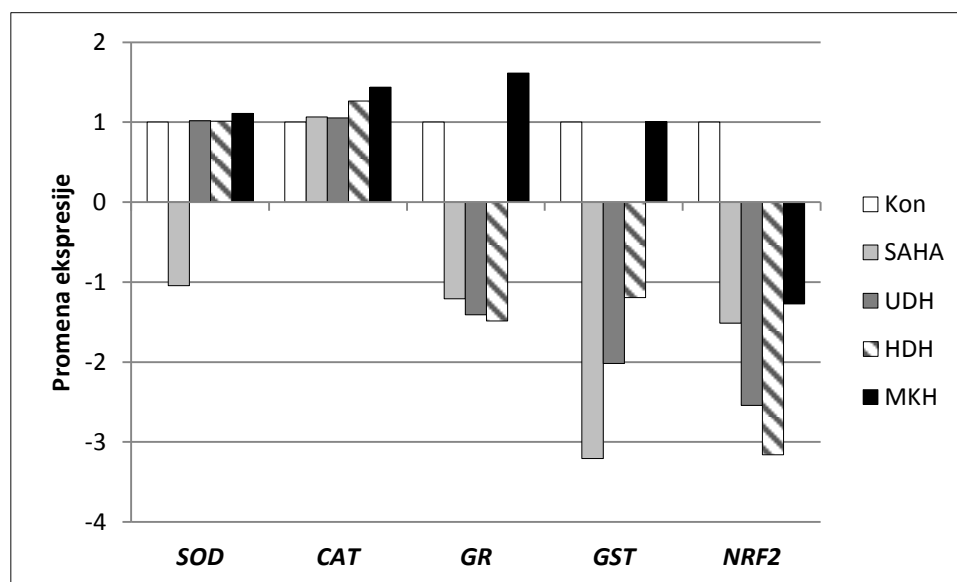
Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u proces antioksidativne zaštite u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samim vorinostatom, prikazane su u tabeli 4.43. i na grafikonu 4.67.

**Tabela 4.43.** Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT*, *GR*, *GST* i *NRF2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranih vorinostatom

Grupa	<i>SOD</i>		<i>CAT</i>		<i>GR</i>	
	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA
Kon	1	/	1	/	1	/
SAHA	0,96 ± 0,09	1	1,06 ± 0,06	1	0,83 ± 0,14	1
UDH	1,02 ± 0,33	1,07 ± 0,35	1,05 ± 0,23	0,99 ± 0,22	0,71 ± 0,12	0,87 ± 0,14
HDH	1,01 ± 0,26	1,06 ± 0,27	1,27 ± 0,15	1,19 ± 0,13	0,67 ± 0,13	0,82 ± 0,16
MKH	1,11 ± 0,17	1,16 ± 0,17	1,44 ± 0,15	1,35 ± 0,13	1,61 ± 0,37	1,98 ± 0,46

Grupa	<i>GST</i>		<i>NRF2</i>	
	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA
Kon	1	/	1	/
SAHA	0,31 ± 0,15	1	0,66 ± 0,03	1
UDH	0,50 ± 0,16	1,83 ± 0,59	0,39 ± 0,04	0,60 ± 0,06
HDH	0,84 ± 0,16	3,10 ± 0,60	0,32 ± 0,07	0,48 ± 0,10
MKH	1,01 ± 0,30	3,72 ± 1,08	0,79 ± 0,17	1,19 ± 0,27



**Grafikon 4.67.** Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT*, *GR*, *GST* i *NRF2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija

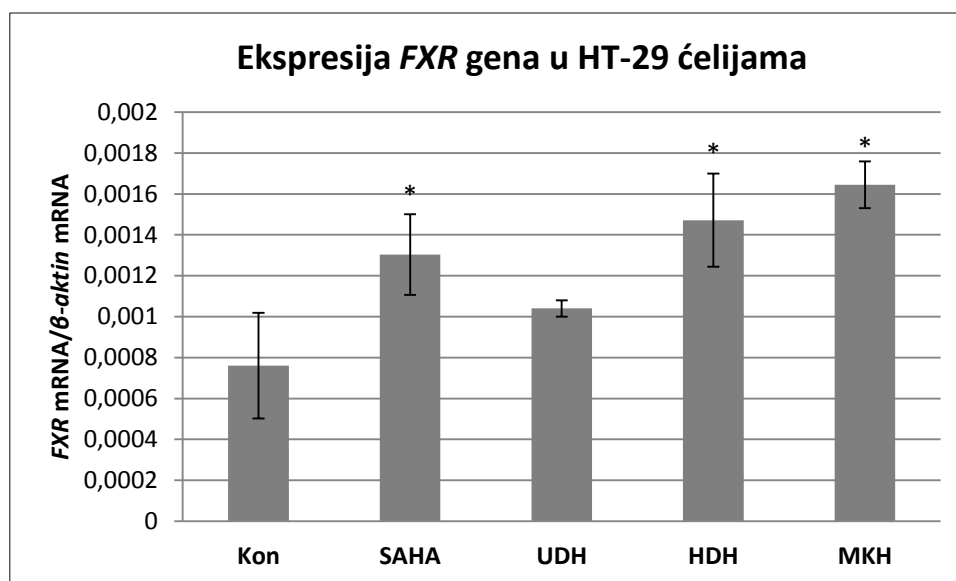
#### 4.2.6.3. Ekspresiona analiza gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina

Farnezoid X receptor (FXR) je nuklearni receptor koji, kao transkripcijski faktor, ima centralnu ulogu u sprovođenju funkcija žučnih kiselina, koje su ligandi za ovaj receptor. Značajan deo svojih funkcija FXR sprovodi preko SHP (*small heterodimer partner*) proteina, drugog nuklearnog receptora, tako što ushodno reguliše ekspresiju *SHP* gena. Vrednosti relativne ekspresije *FXR* i *SHP* gena u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom i žučnim kiselinama, prikazane su u tabeli 4.44. i na grafikonima 4.68. i 4.69. Komparativnom Ct metodom izračunate su promene ekspresije (*fold change*) ovih gena i te vrednosti su prikazane u tabeli 4.45. i na grafikonu 4.70.

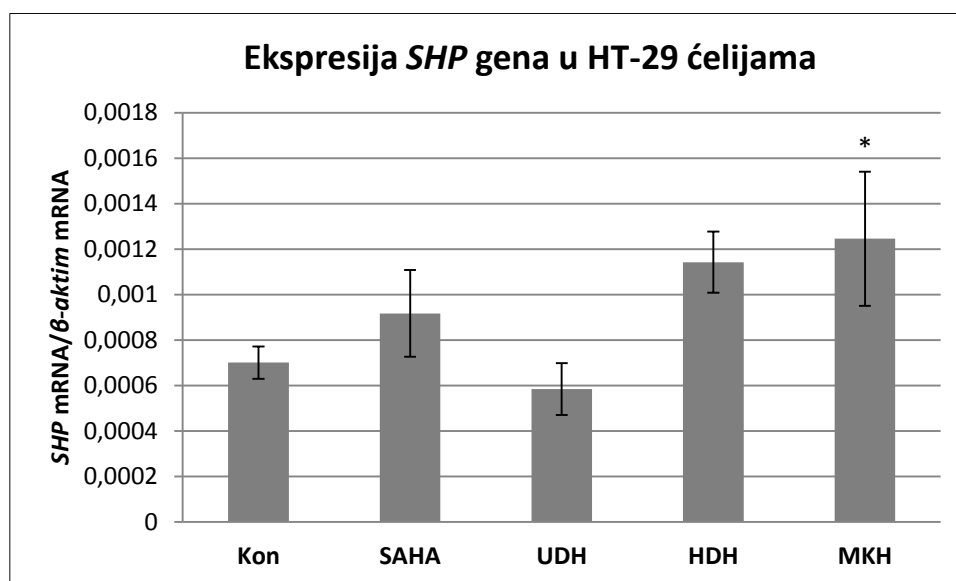
**Tabela 4.44.** Relativna ekspresija mRNA za *FXR* i *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom

Relativna ekspresija gena	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
<i>FXR</i>	0,0008 ± 0,0003	0,0013 ± 0,0002	0,0010 ± 0,0000	0,0015 ± 0,0002	0,0016 ± 0,0001
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. SAHA, HDH, MKH	vs. Kon	vs. MKH	vs. Kon	vs. Kon, UDH
<i>SHP</i>	0,0007 ± 0,0000	0,0009 ± 0,0002	0,0006 ± 0,0001	0,0011 ± 0,0001	0,0012 ± 0,0003
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. MKH	/	vs. HDH, MKH	vs. UDH	vs. Kon, UDH

Primena samog vorinostata u HT-29 ćelijskoj liniji dovela je do statistički značajnog porasta u relativnoj ekspresiji *FXR* gena u odnosu na kontrolu (p=0,03 vs. Kon). Kotretman sa UDH je doveo do smanjenja ekspresije ovog gena ka vrednostima kontrolne grupe ćelija, ali bez statističke značajnosti, dok je istovremena primena vorinostata sa HDH i MKH imala za posledicu dodatno povećanje nivoa ekspresije *FXR* gena. Kada se uporedi relativna ekspresija *FXR* među ćelijskim grupama ko-tretiranim različitim žučnim kiselinama, utvrđena je statistička značajnost između grupa UDH i MKH (p=0,017). Profil ekspresije *SHP* gena po eksperimentalnim grupama HT-29 ćelija je bio sličan kao i kod *FXR* gena, ali je samo kotretman sa MKH doveo do statistički značajnog porasta relativne ekspresije *SHP* gena u odnosu na kontrolu (p=0,025 vs. Kon), dok ostali eksperimentalni tretmani nisu ispoljili statistički značajne razlike.



**Grafikon 4.68.** Relativna ekspresija mRNA za *FXR* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon

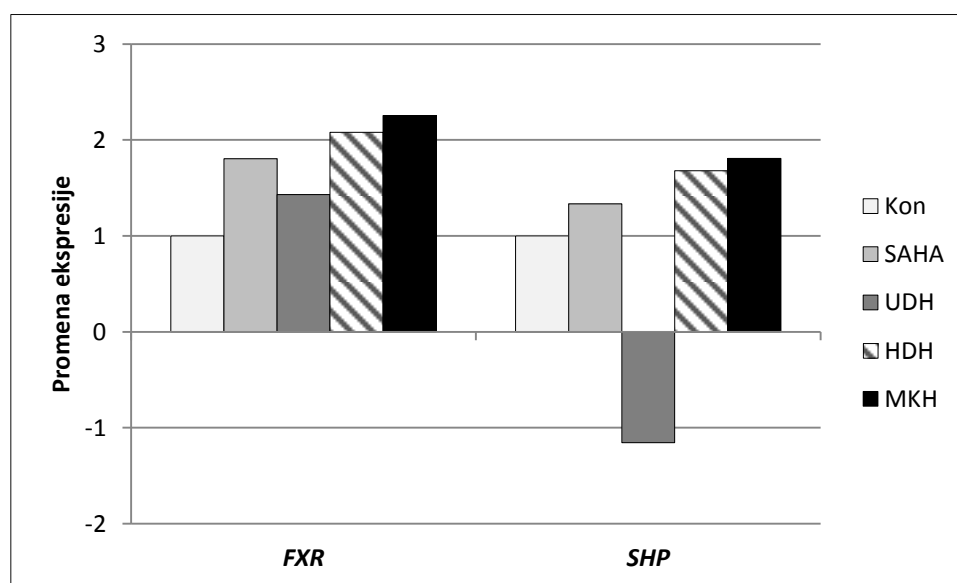


**Grafikon 4.69.** Relativna ekspresija mRNA za *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u proces održavanja homeostaze žučnih kiselina u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samim vorinostatom, prikazane su u tabeli 4.45. i na grafikonu 4.70.

**Tabela 4.45.** Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranih vorinostatom

Grupa	<i>FXR</i>		<i>SHP</i>	
	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA
Kon	1	/	1	/
SAHA	1,80 ± 0,35	1	1,33 ± 0,31	1
UDH	1,43 ± 0,17	0,81 ± 0,10	0,87 ± 0,27	0,67 ± 0,20
HDH	2,08 ± 0,59	1,18 ± 0,34	1,68 ± 0,42	1,30 ± 0,32
MKH	2,26 ± 0,22	1,27 ± 0,12	1,81 ± 0,44	1,39 ± 0,34



**Grafikon 4.70.** Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija

#### 4.2.6.4. Ekspresiona analiza gena uključenih u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa

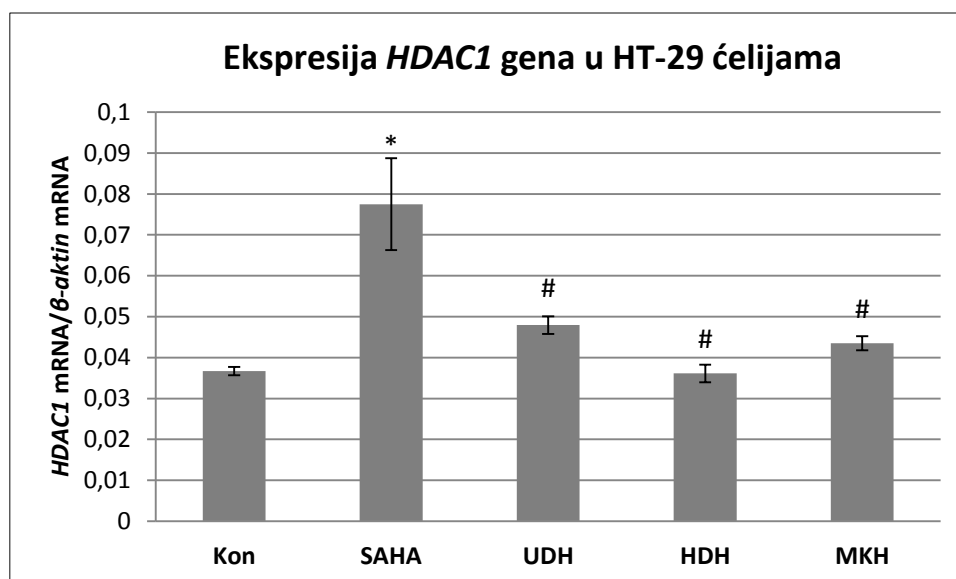
Enzimi histon deacetilaze (HDAC) katalizuju uklanjanje acetil grupa sa molekula histona, pri čemu hromatin biva tesno pakovan i teško dostupan transkripcionim faktorima, što dovodi do utišavanja brojnih gena, uključujući i tumor supresorne gene. Vrednosti relativne ekspresije *HDAC1* i *HDAC2* gena u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom, sa ili bez žučnih kiselina, prikazane su u tabeli 4.46. i na grafikonima 4.71. i 4.72. Komparativnom Ct metodom izračunate su promene ekspresije (*fold change*) ovih gena i te vrednosti su prikazane u tabeli 4.47. i na grafikonu 4.73.

**Tabela 4.46.** Relativna ekspresija mRNA za *HDAC1* i *HDAC2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom

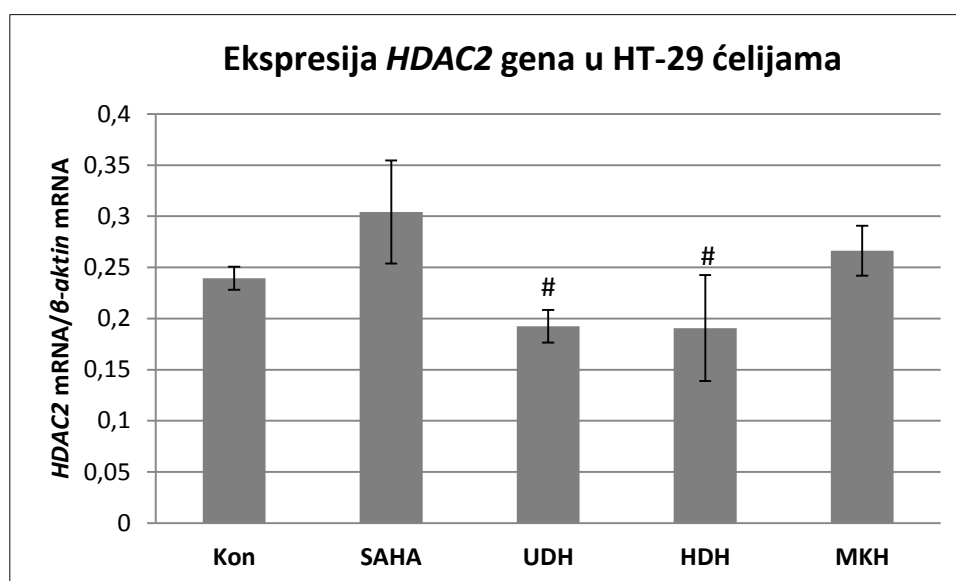
Relativna ekspresija gena	Kon	SAHA	UDH	HDH	MKH
<i>HDAC1</i>	0,0367 ± 0,0010	0,0775 ± 0,0112	0,0479 ± 0,0022	0,0361 ± 0,0021	0,0435 ± 0,0017
Statistički značajne razlike (p<0,05)	vs. SAHA	vs. Kon, UDH, HDH, MKH	vs. SAHA	vs. SAHA	vs. SAHA
<i>HDAC2</i>	0,2394 ± 0,0111	0,3042 ± 0,0504	0,1925 ± 0,0160	0,1907 ± 0,0518	0,2662 ± 0,0243
Statistički značajne razlike (p<0,05)	/	vs. UDH, HDH	vs. SAHA	vs. SAHA	/

Tretman HT-29 ćelija samim vorinostatom doveo je do visoko statistički značajnog porasta relativne ekspresije *HDAC1* gena u odnosu na netretirane ćelije (p<0,001 vs. Kon). Kotretman sa sve tri ispitivane žučne kiseline doveo je do smanjenja ekspresije ovog gena na nivo kontrolnih ćelija. Kada se uporede grupe ko-tretirane različitim žučnim kiselinama, nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima relativne ekspresije *HDAC1* gena.

Ekspresija *HDAC2* gena je generalno bila viša u HT-29 ćelijama u odnosu na *HDAC1* gen, ali je uticaj vorinostata i žučnih kiselina na relativnu ekspresiju *HDAC2* gena bio sličan kao i za *HDAC1* gen. Primena samog vorinostata je dovela do povećanja ekspresije *HDAC2* gena u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti. Sve tri žučne kiseline primenjene zajedno sa vorinostatom su dovele do smanjenja ekspresije u odnosu na grupu SAHA, ali je to smanjenje bilo statistički značajno samo u grupama UDH (p=0,020 vs. SAHA) i HDH (p=0,018 vs. SAHA).



**Grafikon 4.71.** Relativna ekspresija mRNA za *HDAC1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. \* $p < 0,05$  vs. Kon; # $p < 0,05$  vs. SAHA

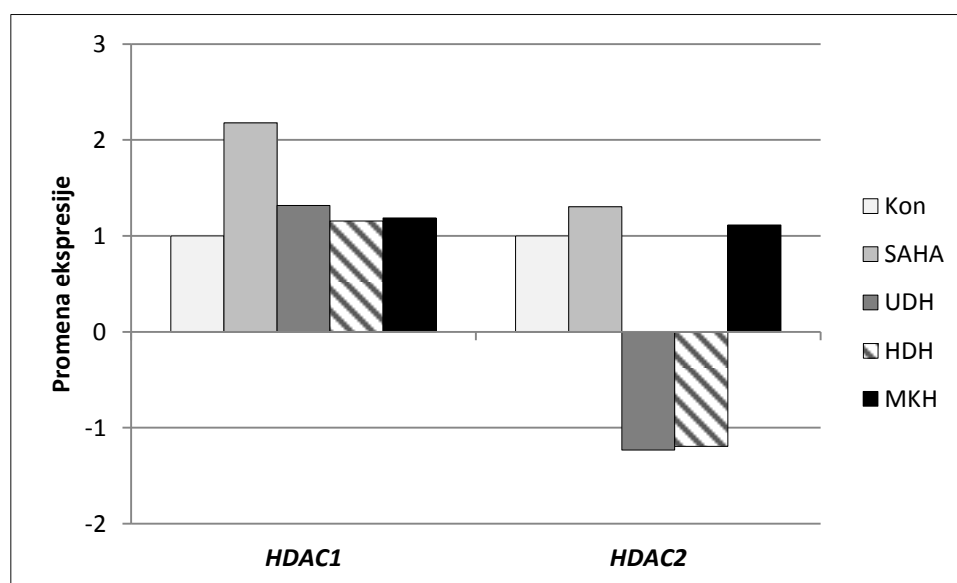


**Grafikon 4.72.** Relativna ekspresija mRNA za *HDAC2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom. # $p < 0,05$  vs. SAHA

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samim vorinostatom, prikazane su u tabeli 4.47. i na grafikonu 4.73.

**Tabela 4.47.** Promene ekspresije mRNA za *HDAC1* i *HDAC2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranih vorinostatom

Grupa	<i>HDAC1</i>		<i>HDAC2</i>	
	vs. Kon	vs. SAHA	vs. Kon	vs. SAHA
Kon	1	/	1	/
SAHA	2,18 ± 0,58	1	1,30 ± 0,33	1
UDH	1,32 ± 0,15	0,63 ± 0,07	0,81 ± 0,12	0,64 ± 0,09
HDH	1,16 ± 0,61	0,55 ± 0,29	0,84 ± 0,33	0,67 ± 0,25
MKH	1,19 ± 0,06	0,57 ± 0,03	1,12 ± 0,10	0,88 ± 0,08



**Grafikon 4.73.** Promene ekspresije mRNA za *HDAC1* i *HDAC2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana vorinostatom ili kotretmana vorinostatom i žučnom kiselinom, izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija

## 5. Diskusija

Žučne kiseline deluju kao signalni molekuli u organizmu i uključene su u regulaciju metabolizma glukoze i lipida, termogeneze, inflamatornih i imunomodulatornih procesa. Ova endogena jedinjenja ostvaruju svoje efekte najvećim delom putem nuklearnih receptora za koje se vežu, pre svega putem farnezoid X receptora (FXR), ali i vitamin D receptora (VDR), pregnan X receptora (PXR) i konstitutivnog androstanskog receptora (CAR). Nuklearni receptori obezbeđuju mrežu mehanizama negativne i pozitivne povratne sprege, pre svega u cilju odbrane ćelija jetre i intestinuma od akumulacije žučnih kiselina, sprečavajući njihovu sintezu i preuzimanje u ćelije, a istovremeno indukujući detoksikacione i eksport sisteme za žučne kiseline. Sa identifikacijom membranskog TGR5 receptora za žučne kiseline, koji se prevashodno nalazi izvan enterohepatičnog sistema i čiji osnovni efekti u organizmu nisu usmereni ka održavanju homeostaze žučnih kiselina, već ka regulaciji energetskeg metabolizma i homeostaze glukoze, postalo je jasno da žučne kiseline imaju brojne, još uvek nepoznate funkcije u organizmu [16].

Najznačajniji fiziološki i farmakološki efekti žučnih kiselina determinisani su njihovom polarnošću. Dok su hidrofobne žučne kiseline povezane sa razvojem brojnih patoloških stanja, pre svega indukovanjem oksidativnog stresa u ćelijama, aktivacijom inflamatornih signalnih puteva i iniciranjem apoptoze, hidrofilne žučne kiseline su netoksične i smatraju se citoprotektivnim agensima. Utvrđeno je da male strukturne razlike imaju za posledicu značajne razlike u afinitetu žučnih kiselina prema nuklearnim receptorima, a samim tim i u efektima koje ostvaruju [9]. Stoga se danas naučna oblast farmakologije žučnih kiselina intenzivno razvija, posebno nakon kristalografskih studija kojima je utvrđena trodimenzionalna struktura ligand-vezujućih domena receptora za žučne kiseline, čime je otvorena mogućnost za razvoj polusintetskih derivata žučnih kiselina sa većim afinitetom ka receptorima, boljom selektivnošću i sa poboljšanim farmakokinetičkim karakteristikama [11].

S obzirom na citotoksičnost hidrofobnih žučnih kiselina, stroga kontrola njihovih intracelularnih, ali i serumskih koncentracija je neophodna pod normalnim uslovima. FXR je glavni regulator homeostaze žučnih kiselina u organizmu, aktivira se kod povećanja njihove koncentracije u organizmu i transkripciono reguliše ekspresiju gena uključenih u sintezu, transport i metabolizam žučnih kiselina. Svi efekti aktivacije FXR receptora su protektivni, jer rezultuju smanjenjem intracelularnih koncentracija žučnih kiselina, pre svega u hepatocitima i



enterocitima. Stoga je FXR jedna od najznačajnijih farmakoloških meta u terapiji holestatskih poremećaja jetre [34]. Pokazano je, međutim, da je FXR značajno uključen i u procese inflamacije i kancerogeneze, pre svega u jetri i intestinalnom traktu. Ekspresija FXR je veoma niska u delovima intestinuma zahvaćenim vidljivom inflamacijom, a pronađena je veza i između gubitka FXR i kancerogeneze u intestinumu. Aktivacija FXR smanjuje inflamaciju u intestinalnom traktu tako što inhibira funkciju NF- $\kappa$ B, a samim tim i produkciju proinflamatornih citokina. Takođe, dok sniženje nivoa FXR u enterocitima doprinosi razvoju tumora, njegova aktivacija u ćelijama karcinoma kolona dovodi do supresije proliferacije ovih ćelija i indukcije apoptoze [149]. Holestaza, inflamatorna bolest creva (IBC) i karcinom kolona su zasebni patofiziološki entiteti, ali ih odlikuje povezanost u brojnim signalnim putevima, uključujući i one posredovane receptorima na koje deluju žučne kiseline. FXR receptor je uključen u patogenetske mehanizme holestaze, IBC i karcinoma kolona i stoga predstavlja atraktivnu terapijsku metu za ove bolesti.

Žučne kiseline su uključene u brojne signalne puteve koji regulišu ćelijski ciklus i doprinose razvoju ili regresiji maligniteta. Definisana je uloga žučnih kiselina u procesima apoptoze, inflamacije i oksidativnog stresa u normalnim i malignim ćelijama, ali je malo poznat uticaj ovih jedinjenja na epigenetske mehanizme regulacije ključnih ćelijskih procesa. Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je *in vitro* i *in vivo* ispitivanje uticaja sintetski dobijenog keto derivata holne kiseline, 12-monoketoholne kiseline (MKH), u komparaciji sa prirodnim žučnim kiselinama, hidrofobnom henodeoksiholnom kiselinom (HDH) i hidrofilnom ursodeoksiholnom kiselinom (UDH), na ćelijske procese apoptoze, oksidativnog stresa i inflamacije, koji su od značaja za hemoprevenciju i terapiju kolorektalnog karcinoma. Predmet istraživanja, takođe, obuhvata i ispitivanje uloge odabranih žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji ovih procesa u ćelijama karcinoma kolona, kao i uticaj žučnih kiselina na aktivnost epigenetskog antitumorskog leka vorinostata.

Na *in vivo* modelu intrahepatične holestaze kod pacova, indukovane primenom etinil-estradiola, ispitan je uticaj odabranih žučnih kiselina na vrednosti biohemijskih pokazatelja holestatskog oštećenja jetre u serumu, kao i uticaj na pokazatelje oksidativnog oštećenja i antioksidativne zaštite u jetri i intestinumu. Primenom qRT-PCR metode, mereni su nivoi ekspresije gena uključenih u procese apoptoze, antioksidativne zaštite, inflamacije, signalizacije žučnih kiselina i epigenetske regulacije ćelijskih procesa, u jetri i intestinumu životinja sa holestazom. S obzirom da su jetra i intestinalni trakt u bliskoj vezi u pogledu anatomske strukture i fizioloških funkcija, kao i da bolesti jetre često dovode do poremećaja

funkcije intestinuma, i obrnuto, cilj našeg rada je bio da se ispituju i ključni ćelijski procesi u intestinumu koji mogu uticati na razvoj inflamacije intestinuma i kancerogeneze kod eksperimentalnih životinja sa holestazom.

Holestaza predstavlja poremećaj u transportu žuči iz jetre u intestinalni trakt, što dovodi do akumulacije žučnih kiselina u organizmu. Intrahepatična holestaza podrazumeva poremećaje sekrecije žuči koji nastaju na nivou hepatocita ili žučnih kanalića unutar jetre. Brojni lekovi, uključujući i oralne kontraceptive, mogu da izazovu intrahepatičnu holestazu, pre svega kompetitivnom inhibicijom funkcije BSEP proteina, koji vrši efluks žučnih kiselina u lumen žučnih kanalića. Etinil-estradiol je sintetski estrogen za koji je utvrđeno da indukuje intrahepatičnu holestazu kod pacova kroz alteracije u kanalikularnom membranskom transportu žučnih kiselina i organskih anjona u hepatocitima [228].

Tretman eksperimentalnih životinja etinil-estradiolom tokom pet dana u našoj studiji imao je za posledicu značajno smanjenje telesne mase životinja sa indukovanom holestazom, za razliku od kontrolnih životinja koje su napredovale u pogledu telesne mase. Gubitak telesne mase je očekivan kod holestaze, s obzirom da je holestaza praćena otežanom apsorpcijom liposolubilnih nutrijenata, a potvrđen je i u drugim studijama sa eksperimentalno indukovanom holestazom kod pacova [229]. Pored toga, primena etinil-estradiola je dovela i do značajnog povećanja relativne mase jetre i neznatnog smanjenja relativne mase intestinuma u odnosu na zdrave životinje. Povećanje mase jetre je uočeno i u drugim studijama na modelima intra- i ekstrahepatične holestaze kod eksperimentalnih životinja i objašnjava se akumulacijom lipida i kolagena u jetri. Takođe, tokom holestaze dolazi do proliferacije epitelnih ćelija bilijarnog trakta i drugih tipova ćelija, kao i do smanjenja udela hepatocita u jetri [230]. Uticaj holestatskog oboljenja jetre na relativnu masu intestinuma nije ispitan, ali je pokazano da totalna parenteralna ishrana (TPN) tokom 14 dana kod eksperimentalnih životinja indukuje holestazu, praćenu hepatomegalijom i porastom relativne mase jetre, ali i atrofiju creva, odnosno značajno smanjenje mase tankog creva i gubitak značajnog broja crevnih resica [231]. U našoj studiji, smanjenje relativne mase intestinuma nije bilo statistički značajno u odnosu na zdrave životinje, što se može objasniti pre svega dužinom trajanja eksperimentalnog protokola.

Primena ispitivanih žučnih kiselina u našoj studiji nije uspela da ublaži gubitak telesne mase izazvan indukovanjem holestaze kod eksperimentalnih životinja. Takođe, primena UDH u dozi od 25 mg/kg, HDH u dozi od 10 mg/kg i MKH u dozama od 4 mg/kg i 20 mg/kg, nije dovela do značajnih promena u relativnoj masi jetre i intestinuma, u odnosu na netretirane

životinje sa holestazom. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima. Pokazano je, naime, da UDH, kao hidrofilna žučna kiselina sa klinički dokazanim antiholestatskim dejstvom, nije uspela da ublaži gubitak telesne mase, kao ni povećanje mase jetre kod pacova sa holestazom, iako stimuliše holerezu i ispoljava brojne druge protektivne efekte kod holestaze [232]. Takođe, intraperitonealna primena snažnih i selektivnih agonista FXR receptora, obetiholne kiseline u opsegu doza od 1 mg/kg do 10 mg/kg i GW4064 u dozi od 30 mg/kg, nije uspela da spreči gubitak telesne mase i povećanje mase jetre kod pacova sa estrogen-indukovanom intrahepatičnom holestazom [119]. Obetiholna kiselina je, pored UDH, jedini registrovani lek za terapiju holestatskih oboljenja kod ljudi i ispoljava niz drugih korisnih efekata kod holestaze.

Biohemijski pokazatelji holestaze u serumu ukazuju na hepatocelularno i holangiocelularno oštećenje indukovano visokim koncentracijama žučnih kiselina, kao i na funkcionalne posledice smanjenja sekrecije žuči. Najznačajniji serumski pokazatelji oštećenja ćelija jetre tokom holestaze su alkalna fosfataza (ALP), gama-glutamil transferaza (GGT) i 5'-nukleotidaza, kao i nespecifični pokazatelji oštećenja jetre aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT) [233]. ALP je najspecifičniji biohemijski pokazatelj holestaze u serumu, s obzirom da žučne kiseline direktno indukuju sintezu ovog enzima u hepatocitima tokom holestaze post-transkripcionim mehanizmom. S obzirom da je neophodno vreme da dođe do sinteze ALP u hepatocitima u holestatskim uslovima, povećanje aktivnosti ovog enzima u serumu tokom akutne bilijarne opstrukcije se javlja tek nakon povećanja aktivnosti aminotransferaza. GGT je membranski enzim koji je ekspimiran u različitim tkivima, a u jetri je najveća atktivnost ovog enzima u ćelijama bilijarnog stabla. Povećanje aktivnosti GGT u serumu je najosetljiviji i najraniji biohemijski pokazatelj holestatskih bolesti, ali nije u potpunosti specifičan, jer se nalazi u različitim tkivima, a takođe alkohol i pojedini lekovi mogu da indukuju povećanje aktivnosti ovog enzima u serumu. Enzim 5'-nukleotidaza je uključen u metabolizam nukleinskih kiselina u mnogim tkivima, ali aktivnost u serumu potiče prevashodno od enzima iz jetre. Ovaj enzim je u hepatocitima lokalizovan najviše u sinusoidalnoj i kanalikularnoj membrani i usled membranolitičkog dejstva visokih koncentracija žučnih kiselina prelazi u sistemska cirkulaciju [89]. Usled smanjenja ekskrecije žuči tokom holestaze, u serumu dolazi do povećanja koncentracije žučnih kiselina, bilirubina i holesterola, koji takođe predstavljaju biohemijske parametre holestatskog oboljenja jetre. Hiperbilirubinemija je znak uznapredovale holestaze i ona je uglavnom konjugovanog tipa. Iako određivanje koncentracije bilirubina u serumu nema veliki dijagnostički značaj za samu

holestazu, ima prognostički značaj pre svega kod primarne bilijarne ciroze (PBC) i primarnog sklerozirajućeg holangitisa (PSH) [90].

U našoj *in vivo* studiji, ispitivani su AST, ALT, GGT, ukupni i konjugovani bilirubin, kao pokazatelji holestaze u serumu. Rezultati našeg rada pokazuju da je indukovanje intrahepatične holestaze kod eksperimentalnih životinja imalo za posledicu povećanje vrednosti svih ispitivanih biohemijskih pokazatelja u serumu, dok je ono bilo statistički značajno samo za ALT i konjugovani bilirubin. Primena ispitivanih žučnih kiselina je generalno dovela do smanjenja vrednosti ovih biohemijskih parametara. Najveće sniženje vrednosti GGT, kao najosetljivijeg pokazatelja holestaze, je ostvareno nakon primene UDH. S druge strane, primena HDH je u najvećoj meri smanjila aktivnost ALT u serumu ispitivanih životinja, dok je primena MKH u dozi od 20 mg/kg bila superiornija od ostalih tretmana žučnim kiselinama u efektima smanjenja aktivnosti AST i koncentracije bilirubina.

Varijabilne vrednosti biohemijskih pokazatelja holestaze u serumu su dobijene u različitim studijama, što zavisi pre svega od korišćenog modela holestaze, vrste i soja životinje u ogledu, dužine eksperimentalnog protokola itd. Rezultati studije u kojoj je intrahepatična holestaza indukovana na isti način kao u našem eksperimentu, primenom etinil-estradiola tokom pet dana kod mužjaka pacova soja Wistar, pokazali su da holestaza nije bila praćena značajnim povećanjem aktivnosti GGT i ALT, kao ni značajnim porastom koncentracije bilirubina u serumu. Jedino je aktivnost ALP bila statistički značajno povećana kod pacova sa holestazom, i tu aktivnost je mogla da smanji primena obetiholne kiseline u dozi od 10 mg/kg, dok je primena HDH dodatno povećala aktivnost ALP [119]. Na modelu estrogen-indukovane intrahepatične holestaze kod pacova soja Sprague-Dawley, pokazano je da je kod životinja sa holestazom povećana aktivnost ALP i ALT u serumu. Peroralna primena UDH u dozi od 100 mg/kg nije uspela značajno da smanji aktivnosti ovih enzima u serumu, za razliku od intraperitonealne primene biljnog alkaloida matrina u dozi od 60 mg/kg dnevno. Oba ispitivana jedinjenja, matrin i UDH, su međutim uspela da povećaju ekskreciju glikoholne kiseline, koju je inhibirao etinil-estradiol, na nivo zdravih životinja [228]. Nasuprot tome, primena UDH u dozi od 100 mg/kg dnevno kod pacova sa intrahepatičnom holestazom indukovanom kombinovanom primenom etinil-estradiola i hlorpromazina, dovela je do statistički značajnog smanjenja vrednosti GGT, ALP, AST, ALT, kao i ukupnog i konjugovanog bilirubina u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. Vrednosti ispitivanih biohemijskih pokazatelja holestaze u serumu su ipak ostale veće u odnosu na zdrave, netretirane životinje [234].

UDH predstavlja najznačajniju farmakološku opciju za terapiju holestatskih bolesti jetre. Iako mnoge studije nisu uspele da potvrde protektivni efekat ove hidrofilne žučne kiseline prema povećanju vrednosti biohemijskih pokazatelja holestaze u serumu eksperimentalnih životinja, UDH nedvosmisleno ima korisno terapijsko dejstvo kod ovih oboljenja jetre. Utvrđeno je da UDH, pre svega, povećava ekskreciju žučnih kiselina iz jetre, kao i sam protok žuči. Drugi korisni efekti UDH obuhvataju povećanje polarnosti, ali ne i veličine ukupnog pula žučnih kiselina u organizmu, što doprinosi smanjenju štetnih efekata od strane hidrofobnih i toksičnih žučnih kiselina. Osim toga, terapijska efikasnost UDH u značajnoj meri potiče i od antioksidativnih i citoprotektivnih svojstava ove žučne kiseline, odnosno od uključenosti UDH u procese smanjenja oksidativnog stresa i inhibicije apoptoze u hepatocitima tokom holestaze [235]. Na modelu intrahepatične holestaze indukovane etinil-estradiolom kod pacova je pokazano da primena UDH u dozi od 25 mg/kg ispoljava snažno antiholestatsko dejstvo, koje je, između ostalog, posledica i smanjenja ekspresije UDP-glukuronozil transferaze 2B1 (UGT2B1) i sledstvene  $17\beta$ -glukuronidacije etinil-estradiola, s obzirom da je konjugacija sa glukuronskom kiselinom neophodan metabolički korak da bi estrogene ostvarili holestatsko dejstvo [236].

Uloga oksidativnog stresa u patogenezi holestaze je utvrđena kako u modelima intra- i ekstrahepatične holestaze kod eksperimentalnih životinja, tako i kod pacijenata sa holestatskim oboljenjima jetre. Pokazano je da je oksidativni stres uključen u mehanizme hepatocelularnog oštećenja i fibroze jetre kod holestatskih poremećaja [91].

Oksidativni status ćelija u organizmu je određen stepenom stvaranja reaktivnih čestica koje mogu da iniciraju oksidativne procese u ćeliji i antioksidativnim kapacitetom, koji potiče od aktivnosti antioksidativnih enzima, ali i prisustva neenzimskih antioksidanasa. Najznačajniju klasu prooksidativnih čestica u živim sistemima predstavljaju reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS), u koje spadaju pre svega molekuli sa kiseonikom koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj spoljašnjoj orbitali. Nespareni elektron je uzrok visoke i neselektivne reaktivnosti. Najznačajnije ROS u organizmu su superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) i hidroksi radikal ( $OH^{\cdot}$ ), mada postoje i reaktivni neradikalni oblici ROS poput vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ), organskih hidroperoksida (ROOH) i hipohloraste kiseline (HClO). Sa biološkog aspekta su pored ROS značajne i reaktivne vrste azota (*reactive nitrogen species*, RNS), od kojih je svakako najvažniji azot oksid ( $NO^{\cdot}$ ) [237].

U ćelijama postoji balans između stvaranja ROS i njihove eliminacije, jer sadrže antioksidativni sistem odbrane. Međutim, u uslovima nekontrolisanog stvaranja ROS, njihova

količina može prevazići antioksidativni kapacitet ćelije i tada se razvija stanje oksidativnog stresa, koje ima štetne efekte na funkcionisanje ćelije. ROS normalno nastaju u organizmu, ali brojni polutanti, lekovi i zračenje mogu da se transformišu u reaktivne metabolite ili da stimulišu endogenu proizvodnju ROS u ćelijama. ROS imaju dvojaku ulogu u biološkim sistemima. U niskim koncentracijama, oni obavljaju važne fiziološke funkcije - učestvuju u procesima ćelijske signalizacije i regulacije ćelijskog ciklusa, indukciji apoptoze, u odbrani od infektivnih agenasa itd. Nasuprot tome, u visokim koncentracijama, ROS i RNS uzrokuju oštećenje mnogih ćelijskih struktura, uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline, od čega je najznačajnije potencijalno mutageno dejstvo i učešće u procesu kancerogeneze [238].

Glavni izvor endogene produkcije ROS su mitohondrije. Uglavnom je to elektron-transportni lanac unutrašnje membrane mitohondrija, koji normalno učestvuje u procesu oksidativne fosforilacije, u kojem molekul kiseonika prima četiri protona i četiri elektrona i redukuje se do molekula vode. Međutim, od ukupne količine kiseonika u mitohondrijama, 1-2% se nepotpuno redukuje, manjim brojem elektrona, i tada nastaju ROS, a to se najčešće dešava na nivou kompleksa I i kompleksa III elektron-transportnog lanca. Do danas je identifikovano još nekoliko izvora ROS u mitohondrijama. To su, između ostalih, i enzimi Krevsovog ciklusa  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaza i piruvat dehidrogenaza, zatim enzim intermembranskog prostora p66<sup>Shc</sup>, kao i enzim spoljašnje membrane monoamino oksidaza. Osim mitohondrija, u važne intracelularne izvore ROS spadaju i NAD(P)H oksidaza (NOX) membranski kompleks, naročito u fagocitima i nekim tumorskim ćelijama gde obavljaju važnu funkciju u procesu ćelijske signalizacije, zatim monoooksigenaze endoplazmatskog retikuluma (citohromi P450),  $\beta$ -oksidacija u peroksizomima, aktivnost ksantin oksidaze (XO), kao i sinteza prostaglandina [239].

U ćelijama postoji antioksidativni sistem odbrane koji učestvuje u eliminaciji ROS i koji u fiziološkim uslovima uspeva da smanji koncentracije ROS na nivo u kom oni imaju korisne biološke uloge, a ne dovode do štetnih efekata. Antioksidansi mogu biti enzimski, koji čine prvu liniju odbrane i u koje spadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST). Pored toga, u ćelijama su prisutni i neenzimski antioksidansi, kao što su tiolna jedinjenja glutation, tioredoksin i lipoinska kiselina, zatim vitamin C, vitamin E, karotenoidi, i oni čine sekundarnu liniju antioksidativne odbrane ćelija. Antioksidansi mogu međusobno da se regenerišu i da obnove funkciju, pa se zato ovaj sistem zaštite često označava i kao "antioksidativna mreža" [240].

Rezultati našeg rada pokazuju da se indukovanjem intrahepatične holestaze kod eksperimentalnih životinja značajno povećava intenzitet lipidne peroksidacije u jetri. Peroksidacija lipida ćelijske membrane se razvija pod dejstvom generisanih ROS, a kao rezultat ovog procesa nastaje nekoliko relativno stabilnih produkata, među kojima je i malondialdehid (MDA), koji je najznačajniji biomarker lipidne peroksidacije. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima brojnih *in vivo* studija na životinjama. Značajno povećanje intenziteta lipidne peroksidacije u jetri je zabeleženo u životinjskim modelima intrahepatične holestaze indukovane i etinil-estradiolom [234] i  $\alpha$ -naftil-izotiocijanatom (ANIT) [241]. Primena UDH, HDH i MKH kod životinja sa holestazom u našoj studiji nije uspela značajno da promeni intenzitet lipidne peroksidacije u jetri u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. Na modelu intrahepatične holestaze indukovane kombinovanom primenom etinil-estradiola i hlorpromazina kod pacova, pokazano je međutim da UDH može značajno da smanji koncentraciju MDA u jetri, ali je ta vrednost i dalje bila značajno veća u odnosu na zdrave životinje [234].

Postoje brojni dokazi o povezanosti oksidativnog stresa i holestaze i kod eksperimentalnih životinja i kod ljudi. Pokazano je da kod pacijenata sa PBC i opstrukcijom bilijarnog trakta dolazi do povećanja nivoa 8-hidroksi deoksigvanozina (8-OH-dG), biomarkera oksidativnog stresa, u jetri [242]. Na modelu opstruktivne holestaze kod eksperimentalnih životinja, pokazano je da su produkti lipidne peroksidacije MDA i 4-hidroksinonenal (4-HNE) povišeni u jetri nakon 7 dana od indukovanja holestaze podvezivanjem žučnog kanala. Utvrđeno je, međutim, da je aktivnost ALT u serumu, kao markera oštećenja hepatocita, bila povišena već nakon 3 dana, u vreme kada lipidna peroksidacija nije mogla da bude detektovana. Ovi rezultati su ukazali da oksidativni stres verovatno nije glavni činiac u razvoju oštećenja jetre tokom holestaze u ranoj fazi [243]. Da je oksidativni stres uključen u patogenezu holestatskih bolesti ukazuju i rezultati brojnih studija u kojima su korišćena jedinjenja sa dokazanim antioksidativnim svojstvima, a koja su dovela do poboljšanja simptoma holestaze kod eksperimentalnih životinja. Peroralna primena prekursora glutationa, N-acetil cisteina (NAC), tokom 4 nedelje nakon indukovanja opstruktivne holestaze kod pacova, imala je za posledicu smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije u jetri, ali i ublažavanje hepatocelularnog oštećenja, odnosno smanjenje aktivnosti ALT u serumu u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. Pored toga, primena NAC je ispoljila i antifibrozo dejstvo kod hronične holestaze, značajnim smanjenjem nivoa hidroksprolina u jetri [244]. Utvrđeno je da različiti produkti lipidne

peroksidacije mogu da aktiviraju stelatne ćelije u jetri, koje imaju ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji fibroze, jer sekretuju fibrogene faktore koji stimulišu portalne fibroците, fibroblaste i miofibroblaste kostne srži da produkuju kolagen [92].

Molekularni mehanizmi oksidativnog oštećenja jetre tokom holestaze su intenzivno ispitivani. U brojnim *in vitro* studijama sa izolovanim hepatocitima je utvrđeno da hidrofobne žučne kiseline poput DH ili HDH mogu da dovedu do porasta intracelularne koncentracije ROS, koje dalje iniciraju proces apoptoze. Mitohondrije u hepatocitima su glavni izvor ROS tokom holestaze, s obzirom da inkubacijom izolovanih hepatičnih mitohondrija sa HDH dolazi do povećanog stvaranja hidroperoksida. Prooksidativni i proapoptotski efekti hidrofobnih žučnih kiselina u jetri su utvrđeni i u *in vivo* modelima holestaze kod životinja. Pokazano je, međutim, da je oštećenje hepatocita tokom holestaze kod eksperimentalnih životinja posledica prevashodno inflamacije. Takođe, utvrđeno je da su inflamatorne ćelije, poput Kupferovih ćelija jetre, ali i neutrofila koji se infiltriraju na mesto inflamacije u jetri, glavni izvor ROS, odnosno da u većoj meri doprinose oštećenju jetre u odnosu na same žučne kiseline. Dok u Kupferovim ćelijama nastaju pre svega superoksid anjon radikal i vodonik peroksid dejstvom NOX2 enzima, u neutrofilima dejstvom enzima mijeloperoksidaze nastaje hipohlorasta kiselina, koja ima veoma agresivno prooksidativno dejstvo i koja lako difunduje kroz ćelijske membrane i u značajnoj meri doprinosi oštećenju hepatocita [91].

Određivanje oksidativnih procesa u ćelijama se vrši i merenjem aktivnosti antioksidativnih enzima, koji čine prvu liniju odbrane u eliminaciji ROS. U našoj studiji, određena je ekspresija gena za antioksidativne enzime SOD, CAT, GPx i GR, a izmerena je i aktivnost enzima CAT, GPx, GR i GST u jetri eksperimentalnih životinja sa intrahepatičnom holestazom. Generalno, indukovanje holestaze kod pacova primenom etinil-estradiola imalo je za posledicu povećanje ekspresije i aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima. Primena UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg je, u najvećoj meri, smanjila ekspresiju gena za antioksidativne enzime, kao i odgovarajuće enzimske aktivnosti, ka vrednostima u grupi zdravih životinja. S druge strane, primena HDH nije uspela značajno da promeni aktivnost antioksidativnih enzima u odnosu na grupu životinja sa holestazom, a koje nisu bile tretirane žučnim kiselinama. Kod primene MKH u dozi od 20 mg/kg, razlikovao se uticaj na ekspresiju gena i aktivnost antioksidativnih enzima. Dok je primena MKH u dozi od 20 mg/kg imala za posledicu ili neznatnu promenu ili dodatno povećanje ekspresije gena za antioksidativne enzime u jetri pacova sa holestazom, njen uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima je bio sličan kao i u dozi od 4 mg/kg, odnosno dovela je do smanjenja aktivnosti ka vrednostima u



grupi kontrolnih životinja. Ovaj rezultat ukazuje da MKH u visokoj dozi od 20 mg/kg verovatno indukuje druge antioksidativne faktore, koji doprinose smanjenju oksidativnog stresa u jetri.

Varijabilni rezultati ispitivanja aktivnosti antioksidativnih enzima su dobijeni u različitim studijama. Iako je u najvećem broju studija pokazano da indukovanje holestaze ima za posledicu smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima, u pojedinim studijama su dobijeni drugačiji rezultati. Na modelu hronične intrahepatične holestaze indukovane kombinovanom primenom estrogena i progesterona kod ženki pacova, utvrđeno je da je u jetri životinja sa holestazom smanjena aktivnost SOD, CAT i GPx, što doprinosi oksidativnom oštećenju hepatocita [245]. Pored toga, na modelu ANIT-indukovane intrahepatične holestaze kod pacova je pokazano da 48 h nakon indukovanja holestaze nije došlo do značajne promene u aktivnosti SOD, CAT i GPx, u odnosu na zdrave životinje. Utvrđeno je i da primena UDH u dozi od 100 mg/kg, kao ni snažnog antioksidansa resveratrola u dozama od 15 mg/kg i 30 mg/kg, nije uspeła statistički značajno da promeni aktivnost ovih antioksidativnih enzima, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom [241]. S druge strane, utvrđeno je i povećanje aktivnosti enzima CAT u jetri kod pacova sa holestazom indukovanom podvezivanjem žučnog kanala, što je u skladu sa našim rezultatima [244]. Rezultati druge studije su takođe pokazali da kod pacova sa opstruktivnom holestazom dolazi do povećanja aktivnosti SOD i CAT u jetri, ali u ovom slučaju peroralna primena UDH u dozi od 25 mg/kg nije značajno promenila aktivnost SOD, a čak je dodatno povećala aktivnost CAT u odnosu na netretirane životinje sa holestazom [246]. Treba napomenuti da žučne kiseline mogu da ispolje različite efekte u zavisnosti od načina primene, što je posledica pre svega interakcije sa mikrobiomom u intestinumu. Iako se najčešće samo DH i LH, a ponekad i UDH, spominju kao sekundarne žučne kiseline, do danas je identifikovano preko 50 različitih sekundarnih žučnih kiselina u fecesu kod ljudi, koje nastaju metabolizmom u intestinalnim bakterijama, a koje mogu da dostignu biološki relevantne sistemske koncentracije [37].

Različiti rezultati merenja aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri u uslovima holestaze su posledica pre svega različitih korišćenih modela holestaze i dužine eksperimenta, ali i oksidativnog statusa hepatocita pre početka eksperimenta. Poznato je da prooksidativni agensi dovode do inaktivacije antioksidativnih enzima u ćelijama, ali ukoliko stanje oksidativnog stresa traje tokom dužeg perioda, kompenzatorno može da dođe do ushodne regulacije mRNA i reaktivacije antioksidativnih enzima. Pojačana ekspresija gena javlja se kao odgovor ćelije na oksidativni stres i može biti od značaja u adaptaciji i zaštiti ćelije od

oksidativnih oštećenja. Stoga, osim dužine trajanja izloženosti povišenim koncentracijama ROS, na aktivnost antioksidativnih enzima može da utiče i oksidativni status ćelija pre indukovanja holestaze, a koji je takođe uzrokovan brojnim egzogenim faktorima [247].

Imajući u vidu povezanost oboljenja jetre i gastrointestinalnog trakta, koja se u značajnoj meri objašnjava prisustvom istih nuklearnih receptora, uključujući i receptore za žučne kiseline, ispitali smo uticaj odabranih žučnih kiselina na oksidativni status intestinuma kod pacova sa indukovanom intrahepatičnom holestazom. U našoj studiji, indukovanje holestaze imalo je za posledicu blagi porast intenziteta lipidne peroksidacije u intestinumu, ali je koncentracija MDA bila dodatno značajno povećana nakon primene HDH i MKH u visokoj dozi od 20 mg/kg. S druge strane, pojava holestaze kod eksperimentalnih životinja je bila praćena povećanjem ekspresije gena za antioksidativne enzime, kao i povećanjem njihove aktivnosti, kako u jetri, tako i u intestinumu. Primena svih žučnih kiselina kod pacova sa holestazom dovela je do smanjenja ekspresije gena za SOD, CAT, GPx i GR u intestinumu, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. Ovo smanjenje genske ekspresije je bilo najizraženije kod UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg. Uticaj ispitivanih žučnih kiselina na aktivnost CAT, GPx, GR i GST je bio nešto drugačiji u odnosu na gensku ekspresiju. Sve žučne kiseline su dovele do smanjenja aktivnosti CAT u intestinumu ka vrednostima u grupi zdravih životinja, i to smanjenje je bilo najizraženije nakon primene UDH. Primena žučnih kiselina nije uspela značajno da promeni aktivnost GPx i GR u intestinumu u odnosu na netretirane životinje sa holestazom, odnosno aktivnost ovih antioksidativnih enzima je i dalje bila viša u odnosu na zdrave životinje. Jedino je u slučaju HDH došlo do dodatnog značajnog povećanja aktivnosti GPx u intestinumu. Primena UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg imala je za posledicu značajno smanjenje aktivnosti GST u intestinumu u odnosu na netretirane životinje sa holestazom.

Mali broj studija se bavio molekularnim patogenetskim mehanizmima u intestinumu kod intrahepatične holestaze. Rezultati skorašnje studije su pokazali da indukovanje holestaze kod pacova primenom etinil-estradiola ima za posledicu poremećaj intestinalne funkcije, koje je posledica, između ostalog, i oksidativnog stresa u enterocitima. Utvrđeno je da je kod eksperimentalnih životinja sa holestazom povišen intenzitet lipidne peroksidacije u ileumu i kolonu, što je bilo praćeno sniženjem koncentracije redukovano glutationa i aktivnosti antioksidativnog enzima SOD u ovim segmentima intestinalnog trakta [248]. Razvoj oksidativnog stresa u intestinumu tokom holestaze, koji je uočen i u našoj studiji, može biti objašnjen ili akumulacijom toksičnih žučnih kiselina u sistemskoj cirkulaciji i svim tkivima ili

generisanjem ROS od strane intestinalnih bakterija u lumenu creva, s obzirom na njihov prekomerni rast u uslovima smanjene intraluminalne koncentracije žučnih kiselina.

Kao uzrok oštećenja jetre tokom holestaze najčešće se navodi apoptoza indukovana akumulacijom hidrofobnih žučnih kiselina i indukcijom oksidativnog stresa u hepatocitima. Apoptoza je najčešći oblik programirane ćelijske smrti koja se odvija normalno tokom procesa razvoja i starenja kao homeostatski mehanizam, putem kojeg organizam eliminiše nepotrebne ćelije, odnosno održava odgovarajuću populaciju ćelija u tkivima. Apoptoza se odvija i kao odbrambeni mehanizam, u okviru imunoloških reakcija ili u slučaju oštećenja ćelija, kao u slučaju holestaze. Postoje dva osnovna signalna puta u ćelijama koja dovode do serije proteolitičkih reakcija koje za krajnju posledicu imaju apoptozu ćelije. To su spoljašnji (receptorski) i unutrašnji (mitohondrijalni) signalni put apoptoze [249].

Žučne kiseline mogu da indukuju apoptozu i spoljašnjim i unutrašnjim putem. Češći je unutrašnji put indukcije apoptoze, jer hidrofobne žučne kiseline lako ulaze u unutrašnjost ćelije pasivnom difuzijom i dovode do generisanja ROS. Oksidativni stres ćelije indukuje stvaranje pora u mitohondrijalnoj membrani, oslobađanje citohroma c i dalje reakcije kaspaza koje dovode, konačno, do apoptoze ćelije. Alternativno, žučne kiseline mogu da indukuju apoptozu i preko CD95/Fas i TRAIL-R2 receptora [153]. Rezultati pojedinih studija, međutim, pokazuju da apoptoza ima mali značaj u odnosu na proces nekroze u oštećenju jetre tokom holestaze. Ovo se ipak objašnjava činjenicom da makrofagi i Kupferove ćelije brzo i efikasno uklanjaju apoptotska tela, odnosno fragmente ćelija koje podležu apoptozi, tako da je njihov broj u jetri uvek relativno nizak. Osim toga, ukoliko je prevelik broj apoptotskih ćelija u jetri, deo koji izbegne fagocitozu od strane makrofaga podleže sekundarnoj nekrozi, koja deli mnoge morfološke karakteristike sa primarnom nekrozom. Odsustvo pouzdanih markera za identifikaciju nekrotičnih ćelija *in vivo* i relativno niska specifičnost TUNEL testa, jednog od najčešće korišćenih testova za detekciju apoptotskih ćelija, takođe doprinose poteškoćama u analizi rezultata citotoksičnosti u *in vivo* modelima holestaze [250].

Unutrašnji put aktivacije apoptoze je precizno regulisan kako bi se eliminisale ćelije samo kada postoji realna potreba za tim. Najvažnija grupa intracelularnih regulatora apoptoze su BCL-2 proteini koji kontrolišu oslobađanje citohroma c iz mitohondrija u citosol. Postoje dve funkcionalne grupe porodice BCL-2 proteina - proapoptotski i antiapoptotski proteini, koji mogu međusobno da se vežu u različitim kombinacijama i formiraju heterodimere, menjajući pritom svoju aktivnost. Balans između pro- i antiapoptotskih proteina određuje da li će ćelija ući u proces programirane smrti. Najznačajniji antiapoptotski proteini su BCL-2 i

BCL-XL, dok su najznačajniji proapoptotski proteini BAX i BAK, koji spadaju u podgrupu BH123 proteina, kao i BID, BIM, PUMA i NOXA, koji spadaju u podgrupu BH3-*only* proteina. Kada određeni stimulus indukuje unutrašnji put apoptoze, proapoptotski proteini BAX i BAK se aktiviraju, formiraju oligomere na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani i dovode do oslobađanja citohroma c i drugih proteina iz intermembranskog prostora u citosol. Antiapoptotski proteini BCL-2 i BCL-XL se normalno nalaze na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, endoplazmatskom retikulumu (ER) i membrani jedra, gde čuvaju integritet membrana, sprečavajući oslobađanje citohroma c iz mitohondrija ili jona kalcijuma iz ER [251].

Rezultati naše studije su pokazali da indukovanje holestaze kod pacova ima za posledicu aktivaciju unutrašnjeg puta apoptoze u jetri, s obzirom da je došlo do povećanja ekspresije proapoptotskog *Bax* gena i smanjenja ekspresije antiapoptotskog *Bcl2* gena. Ovo je dovelo do povećanja *Bax/Bcl2* odnosa, kao najznačajnijeg pokazatelja apoptoze, od preko 4 puta u jetri, u odnosu na zdrave životinje. Primena odabranih žučnih kiselina kod eksperimentalnih životinja sa holestazom je smanjila odnos ova dva gena uključena u proces apoptoze u odnosu na netretirane životinje sa holestazom, pri čemu su najizraženije antiapoptotsko dejstvo u jetri ostvarile UDH i MKH u niskoj dozi od 4 mg/kg. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima brojnih *in vivo* studija na životinjama. Imunohistohemijskim bojenjem aktivirane kaspaze-3, kao selektivnom tehnikom za detekciju apoptoze, utvrđeno je da indukovanje holestaze kod pacova primenom etinil-estradiola i hlorpromazina ima za posledicu značajno povećanje apoptoze u jetri, u odnosu na zdrave životinje, kao i da primena UDH u dozi od 100 mg/kg tokom pet dana dovodi do značajne supresije apoptoze, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom [234]. Kaspaza-3 je jedan od najznačajnijih proteolitičkih enzima koji učestvuje u razgradnji ćelijskih struktura tokom procesa apoptoze i koji je indukovao i spoljašnjim i unutrašnjim putem aktivacije apoptoze. Citoprotektivno dejstvo UDH u dozi od 30 mg/kg je takođe potvrđeno u modelu opstruktivne holestaze kod pacova. Pokazano je da UDH može da deluje antiapoptotski zahvaljujući svom antioksidativnom dejstvu i smanjenju oksidativnog i nitrozativnog oštećenja hepatocita, uzrokovanog visokim koncentracijama hidrofobnih žučnih kiselina. Osim toga, utvrđeno je da UDH dovodi i do aktivacije endonukleaza DNaza I i DNaza II u jetri, koje se u procesu apoptoze aktiviraju od strane kaspaza i učestvuju u fragmentaciji DNA u završnoj fazi programirane ćelijske smrti [252]. Na modelu opstruktivne holestaze kod gravidnih ženki pacova, pokazano je da indukovanje holestaze dovodi do povećanja aktivnosti kaspaze-3 u

jetri i majke i naročito fetusa, kao i da primena UDH vraća aktivnost ovog enzima na nivo zdravih životinja. Takođe, merenjem ekspresije *Bax* i *Bcl2* gena, utvrđeno je da je *Bax/Bcl2* odnos povećan u jetri fetusa nakon indukovanja holestaze, kao i da je UDH značajno smanjila ovaj odnos i ostvarila antiapoptotsko dejstvo, prevashodno u jetri fetusa. S druge strane, aktivnost kaspaze-8, koja je karakteristična za spoljašnji put indukcije procesa apoptoze, nije bila značajno izmenjena u jetri majke i fetusa, ni indukovanjem opstruktivne holestaze, kao ni primenom UDH [232].

Ispitivanjem procesa apoptoze u intestinumu životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom, utvrdili smo da je primena etinil-estradiola imala za posledicu značajnu stimulaciju apoptoze, ne samo u jetri, nego i u intestinalnim ćelijama *in vivo*, u poređenju sa zdravim eksperimentalnim životinjama. Slično kao i u jetri, hidrofilna žučna kiselina UDH je smanjila *Bax/Bcl2* odnos, a hidrofobna HDH je dodatno povećala ovaj odnos, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. Primena MKH u dozi od 20 mg/kg je takođe suprimirala apoptozu u intestinumu indukovanu holestazom, ali je ona i dalje bila značajno izraženija nego u intestinumu zdravih životinja. Na modelu hroničnog holestatskog oštećenja jetre primenom 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidina (DDC) kod miševa, utvrđeno je da je holestaza praćena hipoplazijom intestinalne mukoze usled indukcije apoptoze i inhibicije proliferacije enterocita. Imunohistohemijski je dokazan smanjen nivo markera proliferacije Ki67 i povišen nivo markera apoptoze kaspaze-3 u intestinumu, u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Hipoplazija intestinalne mukoze je bila praćena značajnim promenama arhitekture kripti, pre svega povećanjem udela sekretornih Panetovih i peharastih ćelija. Ovo je najverovatnije posledica smanjenja ekspresije  $\beta$ -katenina u intestinumu, koje je utvrđeno kod miševa sa DDC-indukovanom holestazom, a s obzirom na dobro okarakterisanu ulogu Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta u regulaciji diferencijacije matičnih ćelija u kriptama intestinuma [86].

Uticao odabranih žučnih kiselina na ekspresiju gena za tumor supresor p53 u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja je takođe ispitan u našoj studiji. Poznato je da u slučajevima oštećenja DNA, p53 zaustavlja ćelijski ciklus i inicira apoptozu oštećene ćelije. Protein p53 je kompleks od nekoliko subjedinica, koji funkcioniše na kontrolnom mestu u G1 fazi ćelijskog ciklusa, pre prelaska u S fazu. Interagujući sa drugim faktorima, u koje spadaju ciklini i protein p21, p53 sprečava replikaciju oštećene DNA [253]. U našem radu, indukovanje holestaze kod pacova je imalo za posledicu značajno povećanje ekspresije gena za p53, što je doprinelo razvoju apoptoze u jetri i intestinumu. Primena UDH je dovela do smanjenja ekspresije ovog gena u jetri i intestinumu ka vrednostima u kontrolnoj grupi

životinja, dok primena MKH u obe ispitivane doze nije uspela značajno da promeni ekspresiju gena za p53 u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. HDH je ostvarila tkivno-specifični efekat, s obzirom da je u jetri smanjila ekspresiju gena za p53, a u intestinumu zadržala na nivou netretiranih životinja sa holestazom. Osim u regulaciji ćelijskog ciklusa, indukciji apoptoze i supresiji razvoja tumora, p53 ima direktnu ulogu i u održavanju homeostaze žučnih kiselina u organizmu. Pokazano je da aktivacija p53 kod miševa ima za posledicu smanjenje sinteze žučnih kiselina, što se ostvaruje direktnom aktivacijom ekspresije SHP receptora, kao i povećanjem stabilnosti ovog proteina. Utvrđeno je da p53 deluje kao intrinzički faktor regulacije homeostaze žučnih kiselina kod miševa, kako u uslovima normalne ćelijske fiziologije, tako i tokom stresnih uslova indukovanih primenom doksorubicina, kao snažnog aktivatora p53 [254]. Rezultati našeg rada pokazuju da se profil ekspresije gena za p53 u jetri i intestinumu po grupama eksperimentalnih životinja u značajnoj meri poklapa sa profilom ekspresije *Shp* gena, što takođe ukazuje da p53 ima značajnu ulogu u regulaciji metabolizma žučnih kiselina u organizmu.

Imajući u vidu da nedostatak FXR, glavnog regulatora homeostaze žučnih kiselina, pogoršava i hepatičnu i intestinalnu inflamaciju, kao i da promoviše kancerogenezu, ispitali smo uticaj žučnih kiselina na ekspresiju gena koji regulišu proces inflamacije u jetri i intestinumu životinja sa holestazom. FXR deluje kao negativni modulator inflamatornog procesa u jetri posredovanog transkripcionim faktorom NF- $\kappa$ B, odnosno sprečava povećanje nivoa inflamatornih citokina i enzima u hepatocitima [255]. Takođe, osnovni mehanizam antiinflamatornog dejstva u intestinumu indukovano aktivacijom FXR jeste inhibicija funkcije NF- $\kappa$ B [110]. Rezultati našeg rada pokazuju da holestaza indukovana primenom etinil-estradiola kod pacova doprinosi razvoju inflamacije u jetri i intestinumu značajnim povećanjem ekspresije gena za NF- $\kappa$ B, u odnosu na zdrave životinje. Primena UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg imala je za posledicu smanjenje ekspresije gena za ovaj proinflamatorni transkripcioni faktor u jetri i intestinumu na nivo u kontrolnoj grupi životinja, dok je primena HDH i MKH u visokoj dozi od 20 mg/kg dovela do daljeg povećanja ekspresije gena za NF- $\kappa$ B, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom.

Naši rezultati pokazuju da prostaglandini najverovatnije ne učestvuju u razvoju hepatične inflamacije tokom holestaze, s obzirom da je primena etinil-estradiola dovela do blagog povećanja ekspresije gena za ciklooksigenazu-2 (COX-2), koja učestvuje u sintezi ovih medijatora inflamacije, kao i do značajnog povećanja ekspresije gena za 15-hidroksi prostaglandin dehidrogenazu (PGDH), ključnog enzima u katabolizmu

prostaglandina. Osim toga, sve ispitivane žučne kiseline su dovele do smanjenja ekspresije gena za COX-2 i povećanja ekspresije za PGDH, što ukazuje da UDH, HDH i MKH smanjuju nivo prostaglandina u jetri. S druge strane, dok je primena UDH dovela do ekspresije gena za enzime uključene u metabolizam prostaglandina u intestinumu na nivo ekspresije kod zdravih životinja, HDH i MKH u dozi od 4 mg/kg su snažno indukovali ekspresiju gena za COX-2, i u značajno manjoj meri ekspresiju gena za PGDH, što ukazuje na proinflamatorni efekat HDH i MKH posredovan prostaglandinima u intestinumu eksperimentalnih životinja sa holestazom.

Indukovanje holestaze kod eksperimentalnih životinja u našoj studiji, neočekivano je imalo za posledicu smanjenje ekspresije gena za TNF- $\alpha$ , multifunkcionalni proinflamatorni citokin, u jetri, u odnosu na zdrave životinje. Ovo je, međutim, u skladu sa rezultatima studije u kojoj je na modelu opstruktivne holestaze kod pacova pokazano da je ekspresija gena za ovaj proinflamatorni citokin snižena kod životinja sa holestazom, kao i da primena UDH ne dovodi do značajne promene u ekspresiji ispitivanog gena [246]. U našem radu, primena UDH, ali i HDH, je međutim dodatno smanjila ekspresiju gena za TNF- $\alpha$ . Uočeni su takođe tkivno-specifični efekti žučnih kiselina prema ekspresiji gena za TNF- $\alpha$  u našoj studiji. Primena etinil-estradiola kod pacova je dovela do blagog povećanja ekspresije ovog gena u intestinumu, UDH je smanjila ekspresiju na nivo zdravih životinja, a HDH i MKH u obe primenjene doze su višestruko indukovale ekspresiju gena za TNF- $\alpha$ , u odnosu na netretirane životinje sa holestazom.

Literaturni podaci potvrđuju da dolazi do razvoja inflamacije u intestinumu kod eksperimentalnih životinja sa holestazom. Na modelu ekstrahepatične holestaze je pokazano da u ileumu dolazi do povećanja ekspresije gena za transkripcioni faktor NF- $\kappa$ B, kao i za proinflamatorne citokine TNF- $\alpha$  i IL-6 [255]. Na modelu intrahepatične holestaze indukovane etinil-estradiolom je utvrđen porast aktivnosti mijeloperoksidaze u ileumu i kolonu, koji ukazuje na infiltraciju intestinalnog trakta neutrofilima [248]. Naši rezultati koji pokazuju uticaj UDH na inflamaciju u intestinumu su u skladu sa rezultatima *in vivo* studije u kojoj je na modelu TNBS-indukovanog kolitisa kod pacova utvrđeno da UDH smanjuje aktivnost NF- $\kappa$ B, kao i nivo IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u kolonu, što je bilo praćeno smanjenjem intenziteta lipidne peroksidacije i smanjenjem aktivnosti enzima mijeloperoksidaze [139].

Intrahepatična holestaza kod eksperimentalnih životinja u našoj studiji je bila praćena povećanjem ekspresije gena za inducibilnu azot oksid sintetazu (iNOS) u jetri i intestinumu. Primena HDH i MKH je imala za posledicu dodatno povećanje ekspresije gena za ovaj proinflamatorni enzim u jetri i intestinumu životinja sa holestazom, dok je UDH dovela do

smanjenja ekspresije ovog gena na nivo zdravih životinja u jetri, kao i do blagog povećanja ekspresije u intestinumu, u poređenju sa netretiranim životinjama sa holestazom. Enzim iNOS katalizuje stvaranje azot oksida (NO) iz L-arginina pod uticajem proinflamatornih citokina. Dok u fiziološkim uslovima NO deluje kao signalni molekul u procesima regulacije krvnog pritiska, neurotransmisije, kao i u imunološkom odgovoru, u visokim koncentracijama NO deluje kao proinflamatorni medijator. Prevelika produkcija NO usled povećane ekspresije gena za iNOS dovodi do pojave nitrozativnog stresa, koji dalje može da dovede do nitrozilacije proteina i, samim tim, do poremećaja njihove funkcije u ćelijama [256].

S obzirom na uključenost FXR receptora u patogenetske mehanizme holestaze, IBC i karcinoma kolona, ispitali smo ekspresiju gena za FXR, kao i njegovog ciljnog gena za SHP, u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa holestazom. Rezultati naše studije pokazuju da indukovanje intrahepatične holestaze ima za posledicu značajno povećanje ekspresije gena za FXR i SHP u jetri pacova. Ovo je posledica adaptivnog mehanizma hepatocita da se izbore sa visokim koncentracijama žučnih kiselina. Literaturni podaci ukazuju da indukovanje holestaze najpre dovodi do povećanja ekspresije gena za FXR, a da kod uznapredovalog holestatskog oboljenja dolazi do smanjenja njegove ekspresije [257]. Na modelu ANIT-indukovane intrahepatične holestaze kod miševa je pokazano da se u jetri ne menja značajno ekspresija gena za FXR, dok je ekspresija gena za SHP značajno povećana u odnosu na zdrave životinje [258]. Primena UDH u našem *in vivo* eksperimentu je imala za posledicu smanjenje ekspresije gena za FXR i SHP u jetri, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom, što ukazuje da UDH ne deluje kao agonista FXR receptora. S druge strane, primena HDH i MKH je dovela generalno do povećanja ekspresije gena za FXR i SHP u jetri, pri čemu je do najvećeg porasta ekspresije gena za SHP u jetri došlo nakon primene MKH u dozi od 20 mg/kg. Ovaj rezultat sugerise da MKH, naročito u višim dozama, može *in vivo* da deluje kao agonista FXR, mada treba imati u vidu da na nivo ekspresije SHP u organizmu mogu da deluju različiti faktori, uključujući i p53 tumor-supresorni protein [254].

Povećanje ekspresije gena za FXR je bilo još izraženije u intestinumu nego u intestinumu pacova tretiranih sa HDH i MKH u obe doze, ali ekspresija gena za SHP nije pratila ekspresiju gena za FXR receptor, što potvrđuje činjenicu o uključenosti drugih faktora u regulaciji ekspresije SHP proteina. Povećanje ekspresije FXR receptora u intestinumu eksperimentalnih životinja sa holestazom može biti posledica adaptivnog mehanizma odbrane od inflamacije. Iako je u većini studija inflamacija intestinuma bila praćena značajnim padom ekspresije FXR receptora, pokazano je da indukcija kolitisa primenom TNBS kod miševa ima



za posledicu značajno povećanje ekspresije gena za FXR u mezenteričnom masnom tkivu, u kom je akumuliran veliki broj neutrofila [259].

Da bismo ispitali uključenost epigenetskih mehanizama u ispoljavanju efekata žučnih kiselina na procese apoptoze, antioksidativne zaštite i inflamacije u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa holestazom, izmerena je ekspresija gena za najznačajnije histon deacetilaze, HDAC1 i HDAC2. Naši rezultati su pokazali da indukcija intrahepatične holestaze ima za posledicu povećanje ekspresije HDAC1 i HDAC2 u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja. Žučne kiseline su pokazale različite i tkivno specifične efekte na ekspresiju ovih enzima, ali je jedino UDH smanjila ekspresiju HDAC1 i HDAC2, i u jetri i intestinumu, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom. Mali broj studija se bavio ispitivanjem uloge žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji ključnih ćelijskih procesa. Iako su definisani mehanizmi citoprotektivnog dejstva UDH, pokazano je takođe da UDH smanjuje acetilaciju histona, ali da nije inhibitor HDAC, već da naprotiv indukuje ekspresiju HDAC6 [207]. Utvrđena je uloga i konjugata UDH sa taurinom (TUDH) u povećanju ekspresije GLUT4 receptora u skeletnim mišićima i poboljšanju insulinske senzitivnosti i tolerancije na glukozu kod pacova. Pokazano je da su ovi efekti TUDH posledica modulacije ekspresije HDAC proteina klase I i II u nukleusu i citosolu skeletnih mišića, iako ova žučna kiselina nije uticala na ekspresiju gena za ispitivane HDAC enzime [260]. Osim toga, utvrđena je uloga HDAC u holestazi. Naime, pokazano je da prohibitin-1, protein sa plejotropnim funkcijama u organizmu, a koji doprinosi razvoju holestaze, IBC i malignih oboljenja, interaguje sa HDAC4 u prisustvu žučnih kiselina i deluje kao negativni regulator aktivnosti HDAC4 enzima, sprečavajući njegovu translokaciju u nukleus. Prohibitin-1 zapravo indukuje epigenetske promene koje dovode do senzitivizacije jetre na apoptotski odgovor na HDAC4-zavisan način [261].

U okviru ove doktorske disertacije, ispitivani su i efekti odabranih žučnih kiselina, prirodnih UDH i HDH, i polusintetske MKH, na procese apoptoze i oksidativnog stresa, kao i na epigenetske mehanizme ovih procesa, u HT-29 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona. U skladu sa ciljem rada, ispitali smo i da li postoji sinergizam između odabranih žučnih kiselina i HDAC inhibitora vorinostata, odobrenog leka u epigenetskoj terapiji malignih bolesti.

Na *in vitro* modelu HT-29 ćelija karcinoma kolona, utvrdili smo da hidrofobna žučna kiselina HDH ispoljava izraženo citotoksično dejstvo ( $IC_{50} = 19,58 \mu M$ ), dok hidrofilna UDH ima značajno slabiji citotoksični efekat ( $IC_{50} = 351,93 \mu M$ ). Polusintetski keto derivat MKH

je ispoljio značajno slabiji citotoksični efekat u odnosu na HDH, ali nešto izraženiji u odnosu na UDH ( $IC_{50} = 212,38 \mu M$ ). Rezultati naše studije citotoksičnosti prirodnih i sintetskih žučnih kiselina su, u značajnoj meri, u saglasnosti sa rezultatima iz literature. Na HT-29 ćelijskoj liniji karcinoma kolona je ispitivano citotoksično dejstvo HDH i UDH i njihovih derivata nakon tretmana od 24 h i utvrđeno je da UDH i njeni derivati imaju značajno manju citotoksičnu aktivnost, izraženu kroz više  $IC_{50}$  vrednosti, u odnosu na hidrofobnu HDH i njene derivate. Derivati HDH, HS-1199 i HS-1200, su ispoljili slične citotoksične efekte, nešto izraženije u odnosu na samu HDH, sa  $IC_{50}$  vrednostima oko  $50 \mu M$  [262]. Rezultati našeg rada ukazuju na 2,5 puta veću citotoksičnost HDH, ali se te razlike mogu objasniti razlikama u okviru eksperimentalne procedure, pre svega dužinom trajanja inkubacije ćelija. HS-1199 i HS-1200 derivati HDH su ispitivani i na četiri ćelijske linije tumora mozga i takođe su dobijene  $IC_{50}$  vrednosti citotoksičnosti oko  $50 \mu M$ , pri čemu se HS-1200 derivat pokazao kao nešto efikasniji. Stoga je on ispitivan i *in vivo* na modelu ksenografta glioblastoma kod miševa, i utvrđeno je da ovo jedinjenje smanjuje rast tumora i produžava preživljavanje miševa [263]. Citotoksično dejstvo HDH i UDH je ispitivano i na butiratsenzitivnim (BCS-TC2) i butiratrezistentnim (BCS-TC2.BR2) ćelijama karcinoma kolona. Buterna kiselina, kao kratkolančana masna kiselina, i njene soli su jedan od glavnih regulatora homeostaze endotela creva zahvaljujući sposobnosti indukcije apoptoze. U ovoj studiji je utvrđeno da rezistencija na butirat može da bude unakrsna sa rezistencijom na žučne kiseline, jer su  $IC_{50}$  vrednosti za HDH bile 2,4 puta veće kod butiratrezistentnih ćelija, u odnosu na BCS-TC2 senzitivne ćelije. UDH je ispoljila veoma slabo citotoksično dejstvo prema obe ćelijske linije [264]. Polusintetski derivati HDH, HS-1199 i HS-1200, i derivat UDH, HS-1183, dobijeni konjugacijom ovih prirodnih žučnih kiselina sa estrima amino kiselina, ispoljili su snažno antiproliferativno dejstvo prema različitim malignim ćelijskim linijama, uključujući i HT-29 i HCT-116 ćelije karcinoma kolona. Pokazano je da je antiproliferativno dejstvo bilo u vezi sa zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G1 fazi i indukcijom apoptoze [265].

Nedavno je sintetisana serija od 14 konjugata holne kiseline sa aril ili heteroaril amidima amino kiselina i pokazano je da određeni konjugati pokazuju selektivno i snažno citotoksično dejstvo, komparabilno sa doksorubicinom i cisplatinom, prema U87MG ćelijama glioblastoma ili MDA-MB-231 ćelijama karcinoma dojke, u zavisnosti od prirode amidnog konstituenta. Citotoksičnost ovih derivata, sa druge strane, je bila daleko manja prema HT-29 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona, kao i prema HEK293T normalnim humanim embrionalnim bubrežnim ćelijama [266]. Pokazano je, takođe, kod piperazinil derivata žučnih

kiselina, da cinamil grupa povećava citotoksičnost i sposobnost indukovanja apoptoze selektivno prema KMS-11 ćelijama multiplog mijeloma, dok supstitucija benzil grupom ima za posledicu poboljšanu antiproliferativnu aktivnost u HCT-116, DLD-1 i HT-29 ćelijskim linijama karcinoma kolona [267].

Prirodne žučne kiseline, holna kiselina, HDH, DH i UDH, ispitivane su i na A2780 ćelijama karcinoma ovarijuma u cilju određivanja citotoksičnog dejstva i sposobnosti indukcije apoptoze. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima navedene studije, s obzirom da je pokazano da holna kiselina i UDH ispoljavaju neznatan citotoksični efekat u širokom opsegu koncentracija, dok DH i HDH u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  imaju citotoksični efekat od preko 50% koji potiče uglavnom od indukcije procesa apoptoze [268]. Rađena je i komparativna studija citotoksičnosti 9 derivata žučnih kiselina na MCF-7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke i na endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene (HUVEC).  $\text{IC}_{50}$  vrednosti za HDH i UDH su bile iznad 300  $\mu\text{M}$ , ali je zato butil ester holne kiseline (CABE) ispoljio veoma izraženo citotoksično dejstvo prema MCF-7 ćelijama sa  $\text{IC}_{50}$  vrednošću od svega 13,7  $\mu\text{M}$ , što je preko dva puta niže od  $\text{IC}_{50}$  vrednosti taksola, kao široko korišćenog antitumorskog leka. Ovo jedinjenje je, sa druge strane, imalo značajno slabije izraženu citotoksičnost prema HUVEC ćelijama, što ga čini potencijalnim kandidatom za dalja istraživanja u pogledu razvoja antitumorskih lekova [269].

UDH kao hidrofilna prirodna žučna kiselina, u koncentracijama ispod 100  $\mu\text{M}$ , ispoljava neznatno citotoksično dejstvo prema većini ćelija, odnosno koristi se kao citoprotektivni agens. Pokazano je, međutim, da polusintetski derivat UDH označen kao BANB-6, koji se dobija konjugacijom UDH sa triazinskom bazom, ispoljava snažno citotoksično dejstvo prema različitim malignim ćelijama, a zadržava afinitet ka transporterima za žučne kiseline zbog čega podleže enterohepatičnoj recirkulaciji. BANB-6 je ispoljio značajnu citotoksičnost i prema Hepa 1-6/R ćelijama izolovanim iz hepatoma miševa, koje su umereno rezistentne na dejstvo cisplatine. Kod miševa sa hepatomom indukovanim implantacijom Hepa 1-6/R ćelija u jetru, primena ovog derivata UDH, za razliku od cisplatine, dovela je do smanjenja tumorskog rasta i produženog preživljavanja miševa [270]. Pored toga, estarski derivat UDH označen kao U12 ispoljio je snažan antiproliferativni efekat prema SMMC-7721, HepG2 i QSG-7701 ćelijskim linijama karcinoma jetre. Analizom povezanosti strukture i aktivnosti derivata UDH, utvrđeno je da je acetilacija hidroksilne grupe u položaju C7 od ključnog značaja za antikancersko delovanje, ali i za smanjenu toksičnost prema normalnim hepatocitima [271].

Keto derivati žučnih kiselina se intenzivno ispituju kao promotori transporta kroz membrane, ali i kao farmakološki aktivne supstance, s obzirom na njihovu smanjenu membranolitičku i citotoksičnu aktivnost u odnosu na odgovarajuće hidroksi analoge [272]. Strukturne modifikacije, međutim, mogu u velikoj meri da promene citotoksičnost keto derivata žučnih kiselina. U studiji u kojoj je ispitivana citotoksičnost 13 različitih derivata žučnih kiselina prema malignim ćelijama dojke, cerviksa i prostate, utvrđeno je da 12-monoketoholna kiselina (MKH) ima slabo izražene citotoksične efekte, sa  $IC_{50}$  vrednostima preko 100  $\mu$ M, što je u skladu sa rezultatima našeg rada. S druge strane, pokazano je da etil estar 12-monoketoholne kiseline ima veoma izraženu citotoksičnost sa  $IC_{50}$  vrednostima manjim od 10  $\mu$ M prema MCF-7 ćelijama karcinoma dojke i HeLa S3 ćelijama karcinoma cerviksa, kao i sa skoro 3 puta manjom  $IC_{50}$  vrednošću u odnosu na doksorubicin prema PC-3 ćelijama karcinoma prostate [273].

Citotoksična aktivnost prirodnih i polusintetskih žučnih kiselina je određena prevashodno njihovom hidrofobnošću. Pokazano je da konjugacija hidroksilnih grupa prirodnih žučnih kiselina sa trimetilamonijum grupom ima za posledicu promenu citotoksičnosti. Hidrofobni derivat LH je ispoljio najizraženije citotoksično dejstvo usled jakih interakcija sa ćelijskim membranama, koje su bile otežane u slučaju višestruko naelektrisanih derivata žučnih kiselina [274]. Priroda konjugovane grupe takođe ima uticaj na citotoksičnu aktivnost žučnih kiselina. Ispitivanjem citotoksičnosti konjugata LH sa različitim aminskim funkcionalnim grupama, utvrđeno je da piperidinski derivati LH imaju najsnažnije antiproliferativno dejstvo prema ćelijama karcinoma kolona [275]. Pored toga, utvrđeno je i da prisustvo dvostruke veze između atoma C9 i C11 doprinosi povećanju polarnosti prstena A kod derivata DH, ali i poboljšanju antiproliferativnog dejstva ovih jedinjenja prema humanim HuTu-80 ćelijama karcinoma duodenuma, HepG2 ćelijama hepatocelularnog karcinoma i MH-22a ćelijama hepatoma miševa [276].

Dok visoke koncentracije žučnih kiselina mogu da dovedu do nekroze ćelija usled membranolitičkog dejstva, u nižim koncentracijama, hidrofobne žučne kiseline indukuju ćelijsku smrt i specifično, putem receptora, pri čemu je češći unutrašnji, mitohondrijalni put indukcije apoptoze [154]. Sposobnost indukovanja apoptoze, osim od hidrofobnosti, zavisi i od koncentracije žučnih kiselina. Dok su hidrofobne žučne kiseline, poput DH i HDH, dobro poznati induktori apoptoze i oštećenja ćelija, hidrofilna UDH ima citoprotektivno dejstvo, zbog čega se i koristi u terapiji holestatskih oboljenja jetre [7]. Ova činjenica ukazuje na značaj stereospecifičnosti u mehanizmu citotoksičnosti žučnih kiselina, imajući u vidu da je

jedina strukturna razlika između HDH i UDH konfiguracija hidroksilne grupe u položaju C7. UDH, koja čini manje od 3% ukupnog pula žučnih kiselina, nastaje epimerizacijom te hidroksilne grupe iz HDH [277].

U našoj studiji, UDH i HDH su ispoljile višestruko različit nivo citotoksičnosti prema HT-29 ćelijama karcinoma kolona, što ukazuje na izuzetno značajan uticaj stereochemije hidroksilnih grupa u strukturi žučnih kiselina na njihovu antiproliferativnu aktivnost. Primenom VolSurf+ programa iz optimizovanih 3D struktura HDH i UDH izračunato je 12 molekulskih deskriptora koji ukazuju na polarnost, rastvorljivost i transport kroz membrane. Molekulski deskriptori predstavljaju numeričke vrednosti koje opisuju određenu osobinu molekula, a dobijaju se kao rezultat logičko-matematičke procedure polazeći od hemijske informacije kodirane u simboličkom predstavljanju molekula. Molekulski deskriptori, mogu poslužiti u svrhu interpretacije i boljeg razumevanja neke karakteristike molekula ili sa ciljem formiranja matematičkog modela kojim se neka osobina može predvideti za druge molekule [278]. Molekulski deskriptor pomoću kog se mogu objasniti ovi različiti citotoksični efekti ispitivanih žučnih kiselina jeste amfifilni momenat, koji se definiše kao vektor koji se pruža od centra hidrofobnog do centra hidrofilnog domena. Prisustvo hidroksilne grupe u  $\beta$ -položaju na atomu C7 kod UDH ima za posledicu smanjenje amfifilnog momenta i samim tim slabiji prodor kroz biološke membrane. Softverske tehnike koje izračunavaju fizičko-hemijske osobine molekula mogu, dakle, biti u velikoj meri od pomoći u predikciji citotoksičnosti novih derivata žučnih kiselina.

U okviru našeg rada, ispitano je i citotoksično dejstvo epigenetskog leka vorinostata prema HT-29 ćelijskoj liniji. Izračunata  $IC_{50}$  vrednost, odnosno koncentracija ovog neselektivnog inhibitora HDAC koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% ćelija, iznosi 5,17  $\mu$ M, što ukazuje na umereno citotoksično dejstvo vorinostata u odnosu na većinu konvencionalnih citostatskih lekova. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature, iako postoji velika varijabilnost rezultata u različitim studijama, koja je posledica prevashodno različite dužine esperimentalnog tretmana. Utvrđeno je na ćelijskim linijama karcinoma kolona HT-29, HCT-116, SW480 i WiDr da primena vorinostata tokom 48 h dovodi do različitih citotoksičnih efekata prema ispitivanim tipovima ćelija, kao i da su  $IC_{50}$  vrednosti ovog HDAC inhibitora bile u opsegu 1-5  $\mu$ M [279]. U sličnoj studiji, u kojoj je ispitivana citotoksična aktivnost dva inhibitora HDAC, vorinostata i panobinostata, prema ćelijskim linijama karcinoma kolona HCT-116, HT-29, LoVo i RKO, utvrđeni su koncentracijski-zavisni antiproliferativni efekti oba epigenetska agensa, pri čemu je vorinostat

ispoljio značajno snažnije citotoksično dejstvo u odnosu na panobinostat nakon tretmana od 72 h, sa  $IC_{50}$  vrednostima u opsegu 1,2-2,8  $\mu\text{M}$  [280].

S obzirom da je hipoacetilacija histona karakteristika većine tumora, uključujući i karcinom kolona, i to najčešće kao posledica povećane ekspresije HDAC, primena inhibitora ovih enzima predstavlja značajnu farmakološku strategiju u epigenetskoj terapiji karcinoma. Kod karcinoma kolona, najčešće je povećana ekspresija HDAC2 enzima, i inhibicija njegove aktivnosti može inicirati smrt tumorskih ćelija različitim mehanizmima [185]. Inhibitori HDAC mogu biti efikasni kao monoterapija, uglavnom kod hematoloških maligniteta, ali sami pokazuju relativno skromnu antitumorsku aktivnost prema solidnim tumorima. Efikasnost kliničke primene ovih epigenetskih modulatora može biti značajno veća u kombinaciji sa drugim epigenetskim terapeutima, ali i sa konvencionalnim citostaticima. Ovo se objašnjava prevashodno time što HDAC inhibitori indukuju otvorenu hromatinsku formu u ćelijama, te je DNA dostupnija za dejstvo konvencionalnih antitumorskih lekova [281].

Citotoksičnost vorinostata u našoj studiji prema HT-29 ćelijama u koncentracijama između 1 i 2  $\mu\text{M}$ , koje se smatraju klinički relevantnim jer se postižu *in vivo* kod ljudi, bila je u opsegu 35-39%, što čini ovaj antineoplastični lek dobrim kandidatom za ispitivanje udruženog citotoksičnog dejstva sa različitim agensima. Kotretman HT-29 ćelija vorinostatom u našoj studiji, u koncentracijama od 1 i 2  $\mu\text{M}$ , i antitumorskim lekom doksorubicinom u koncentraciji od 0,1  $\mu\text{M}$ , imao je za posledicu snažan sinergistički citotoksični efekat, koji je bio izraženiji kod više koncentracije vorinostata. Ovo je u skladu sa rezultatima skorašnje studije u kojoj je utvrđeno da doksorubicin ostvaruje sinergističko dejstvo sa vorinostatom prema HT-29 i SW480 ćelijama karcinoma kolona sa mutiranim *TP53* tumor-supresornim genom, ali i prema HCT-116 ćelijama sa izvornim *TP53* genom i HCT-116 ćelijama sa genetski inaktiviranim p53 proteinom. Ovi rezultati ukazuju na mali značaj p53 tumor supresora u ćelijskom odgovoru na kombinovano dejstvo doksorubicina i vorinostata, iako je poznato da mutacije *TP53* gena doprinose rezistenciji na antitumorske lekove i da su u pozitivnoj korelaciji sa progresijom kolorektalnog karcinoma. Pokazano je, međutim, da smanjenje ekspresije HDAC2 ima ključnu ulogu u odgovoru ispitivanih ćelija karcinoma kolona na dejstvo citotoksičnih lekova koji oštećuju DNA, poput doksorubicina, 5-fluorouracila i oksaliplatine, odnosno da ekspresija HDAC2 može da služi kao epigenetski marker povezan sa rezistencijom na konvencionalne citostatike i inhibitore HDAC [282].

HDAC inhibitori se koriste u terapiji tumora jer imaju sposobnost da indukuju zaustavljanje ćelijskog ciklusa, ćelijsku diferencijaciju i apoptozu, kao i sposobnost da spreče metastaziranje u brojnim malignim ćelijskim linijama, uključujući i ćelije karcinoma kolona. Još uvek je, međutim, nejasno da li je većina efekata HDAC inhibitora posledica alteracija u acetilaciji histona ili promena u regulatornim ćelijskim putevima dejstvom na nehistsonske proteine [192]. Citotoksično dejstvo inhibitora HDAC je, u značajnoj meri, posledica uticaja ovih lekova na redoks stanje malignih ćelija i aktivaciju apoptoze posredovanu ROS. Smatra se da do akumulacije ROS dolazi selektivno u maligno transformisanim, ali ne i u normalnim ćelijama. Utvrđena je selektivna indukcija endogenog antioksidansa tioredoksina na nivou transkripcije u normalnim ćelijama, koja im pomaže da se izbore sa oksidativnim stresom izazvanim inhibitorima HDAC. S druge strane, u većini malignih ćelija tioredoksin je već maksimalno eksprimiran i ćelije nemaju kapacitet da dalje povećaju ekspresiju ovog redukcionog faktora u uslovima oksidativnog stresa, a osim toga tretman malignih ćelija vorinostatom dovodi i do indukcije transkripcije tioredoksin-vezujućeg proteina 2 (TBP-2), koji je negativni regulator tioredoksina [283].

Generalno je prihvaćeno da pretretman ćelija antioksidansima, kao na primer prekursorom glutationa NAC, štiti ćelije od apoptoze indukovane inhibitorima HDAC. Postoje, međutim, kontroverzni i međusobno kontradiktorni rezultati dobijeni eksperimentima u istoj ćelijskoj liniji kolorektalnog karcinoma HT-29, prema kojima oksidativni stres indukovani od strane vorinostata može da inicira ili inhibira proces apoptoze. Naime, najpre je utvrđeno da je primena vorinostata u koncentraciji od 5  $\mu$ M praćena značajnim povećanjem nivoa ROS u HT-29 ćelijama karcinoma kolona, smanjenjem mitohondrijalnog transmembranskog potencijala, ali i modulacijom ekspresije proteina uključenih u proces apoptoze. Pretretman sa NAC je značajno smanjio nivo oksidativnog stresa indukovanog vorinostatom i inhibirao proces apoptoze u HT-29 ćelijskoj liniji [284]. S druge strane, u ćelijskim linijama tumora prostate, karcinoma dojke i kolona, uključujući i HT-29 ćelije, koje se odlikuju visokim intrinzičnim nivoom oksidativnog stresa, kao i značajnom rezistencijom na dejstvo vorinostata, utvrđeno je da tretman antioksidansima kao što su NAC i vitamin E, dovodi do smanjenja intracelularnog nivoa ROS, što dalje indukuje senzitivizaciju ćelija na oksidativni stres koji izaziva vorinostat, i sledstvenu apoptozu malignih ćelija. Ovaj neočekivani efekat antioksidanasa na citotoksičnost vorinostata se objašnjava, pre svega, činjenicom da se vorinostat oksidativno degradira u ćelijskim linijama u kojima je visok intrinzični nivo oksidativnog stresa, kao što je HT-29 ćelijska linija humanog adenokarcinoma

kolona [285]. Na modelu A549 ćelijske linije humanog karcinoma pluća je takođe utvrđeno da kotretman trihostatina A, koji poput vorinostata spada u neselektivne HDAC inhibitore iz grupe derivata hidroksaminske kiseline, sa antioksidansima genisteinom i  $\beta$ -karotenom ima za posledicu pojačano citotoksično dejstvo [286]. Rezultati našeg rada su u skladu sa prethodno navedenim rezultatima, s obzirom da je kombinovana primena vorinostata i sa NAC i vitaminom E dovela do snažnog sinergističkog antiproliferativnog efekta.

Sinergistički efekat je utvrđen i kod kombinovane primene vorinostata sa sve tri ispitivane žučne kiseline u našoj studiji, pri čemu je UDH, kao hidrofilna žučna kiselina sa utvrđenim antioksidativnim i antiapoptotskim svojstvima, u najvećoj meri povećala citotoksično dejstvo vorinostata. Ovo može biti posledica senzitivizacije HT-29 ćelija na dejstvo vorinostata smanjenjem nivoa oksidativnog stresa u ovim ćelijama i povećanjem intracelularne koncentracije vorinostata usled inhibirane degradacije. S druge strane, HDH, hidrofobna žučna kiselina za koju je potvrđeno da deluje kao agonista FXR receptora, ali i MKH koja je potencijalni agonista ovog nuklearnog receptora s obzirom na brojna dejstva koja se poklapaju sa efektima aktivacije FXR, su takođe ispoljile sinergističko citotoksično dejstvo sa vorinostatom. Sinergističko dejstvo vorinostata i HDH je potvrđeno i na RT4 ćelijama humanog karcinoma mokraćne bešike i ovaj efekat je objašnjen indukovanjem otvorene hromatinske strukture primenom inhibitora HDAC, što dovodi do lakšeg prilaska aktiviranog FXR receptora u region promotera ciljnih gena [287].

Imajući u vidu modulaciju oksidativnog statusa ćelija kao mehanizam dejstva epigenetskog leka vorinostata, ali i uticaj strukturno različitih žučnih kiselina na sposobnost indukovanja oksidativnog stresa, ispitali smo ulogu kombinovane primene vorinostata sa žučnim kiselinama u regulaciji ekspresije gena antioksidativne zaštite, kao i aktivnosti antioksidativnih enzima u HT-29 ćelijskoj liniji karcinoma kolona. Utvrđeno je da primena vorinostata u koncentraciji od 1  $\mu$ M dovodi do blagog povećanja intenziteta lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijama, koji je bio značajno povećan nakon kotretmana sa žučnim kiselinama u  $IC_{20}$  koncentracijama, posebno u slučaju HDH. Određivanjem ekspresije gena uključenih u sistem ćelijske antioksidativne zaštite, utvrđeno je da primena vorinostata dovodi do značajnog smanjenja ekspresije *NRF2* gena, koji ima centralnu ulogu u odbrani ćelija od oksidativnog stresa tako što indukuje ekspresiju drugih antioksidativnih gena. Ovaj rezultat ukazuje da vorinostat smanjuje antioksidativnu zaštitu ćelija i povećava osetljivost prema apoptozi posredovanoj oksidativnim stresom. Slični rezultati su dobijeni na modelu humanih BEAS-2B bronhijalnih epitelnih ćelija nakon tretmana trihostatinom A. U ovoj studiji je



utvrđeno da je smanjenje ekspresije HDAC2 odgovorno za smanjenje aktivnosti i stabilnosti NRF2 proteina, kao i za sledstveno smanjenje ekspresije gena za antioksidativne enzime [288]. U našoj studiji je utvrđeno da je smanjenje ekspresije *NRF2* gena u HT-29 ćelijama tretiranim vorinostatom praćeno smanjenjem ekspresije gena za SOD, GR i GST, pri čemu je samo u slučaju GST ta promena bila statistički značajna. S druge strane, ekspresija gena za CAT, kao i aktivnost ovog enzima, su bili blago povećani u ćelijama tretiranim vorinostatom u odnosu na netretirane HT-29 ćelije. Na modelu doksorubicin-rezistentne ćelijske linije akutne mijeloidne leukemije AML-2/DX100, pokazano je da primena trihostatina A dovodi do povećanja ekspresije *CAT* gena, kao i aktivnosti ovog enzima na nivo AML-2 ćelija koje su osetljive na doksorubicin, što je posledica povećanja acetilacije histona H4 dejstvom ovog HDAC inhibitora [289].

Ispitivane žučne kiseline u našem radu su imale različit uticaj na ekspresiju gena za antioksidativne enzime i njihovu aktivnost. Tretman HT-29 ćelija hidrofobnom HDH u kombinaciji sa vorinostatom je imao za posledicu značajno manju ekspresiju *NRF* gena u odnosu na ćelije tretirane samo vorinostatom. Kotretman sa HDH je doveo do značajnog smanjenja aktivnosti CAT i GR u odnosu na grupu ćelija tretiranu samo vorinostatom. S druge strane, pretretman HT-29 ćelija sa MKH je doveo do povećanja ekspresije *NRF2* gena prema vrednostima ekspresije u netretiranim ćelijama, što je dalje imalo za posledicu povećanje ekspresije gena za GR i GST, kao i njihovih aktivnosti. Efekti istovremene primene UDH sa vorinostatom su se najviše razlikovali u pogledu genske ekspresije za antioksidativne enzime i njihove enzimske aktivnosti. Razlike u nivou mRNA i odgovarajućih proteina u ćelijama nakon tretmana sa UDH su utvrđene i u drugim studijama [290].

Dokazani su brojni mehanizmi citotoksičnosti inhibitora HDAC, ali se najčešće ispituje uloga ovih jedinjenja u procesima apoptoze i autofagije [291]. Tretman HT-29 ćelija vorinostatom u našoj studiji je doveo do povećanja *BAX/BCL2* odnosa, što ukazuje da vorinostat može da inicira unutrašnji put aktivacije apoptoze u malignim ćelijama. Slični rezultati su dobijeni u studiji u kojoj je pokazano da trihostatin A dovodi do povećanja ekspresije proapoptotskog BAX proteina i smanjenja ekspresije antiapoptotskog BCL-2 proteina, i u HT-29 ćelijama karcinoma kolona sa mutiranim *TP53* genom i u HCT-116 ćelijama sa izvornim *TP53* genom [292]. Pokazano je, takođe, u malignim ćelijama da povećana ekspresija HDAC1 ima za posledicu smanjenje ekspresije BAX proteina, kao i inhibitora ciklin-zavisne kinaze p21<sup>Waf1</sup>, koja učestvuje u zaustavljanju ćelijskog ciklusa kod oksidativnog oštećenja DNA i iniciranju apoptoze [293]. Stoga, farmakološki inhibitori

HDAC1, u koje spada i vorinostat, mogu da indukuju proces apoptoze u malignim ćelijama ovim mehanizmom. U HCT-116 ćelijskoj liniji karcinoma kolona je utvrđeno da primena trihostatina A modifikuje hromatinsku strukturu i olakšava vezivanje transkripcionog faktora p53 za promoterski region p21<sup>Waf1</sup> i sledstvenu indukciju procesa apoptoze [294]. Naši rezultati pokazuju da kotretman vorinostatata sa MKH značajno povećava *BAX/BCL2* odnos u HT-29 ćelijama u odnosu na grupu tretiranu samo vorinostatom. S druge strane, UDH i HDH su vratile odnos ovog proapoptotskog i antiapoptotskog gena na nivo netretiranih ćelija.

Ćelije kolorektalnog karcinoma se odlikuju i visokom ekspresijom ciklina D1, koji je značajan regulator ćelijskog ciklusa u aktivno proliferišućim ćelijama. U našem radu, vorinostat je doveo smanjenja ekspresije gena za ovaj proliferativni marker u HT-29 ćelijama u odnosu na netretirane ćelije, a ovo smanjenje je bilo još izraženije u grupama ko-tretiranim sa HDH i MKH. U ćelijskim linijama karcinoma kolona HCT-116 i SW-480 je pokazano da je povećana ekspresija ciklina D1 direktna posledica visoke ekspresije HDAC2, kao i da smanjenjem ekspresije ili inhibicijom aktivnosti HDAC2, ali ne i HDAC1, dolazi do supresije ciklina D1, inhibicije ćelijskog rasta i indukovanja procesa apoptoze [295]. Na *in vivo* modelu ksenografta karcinoma kolona kod miševa je takođe utvrđeno da vorinostat smanjuje ekspresiju različitih podtipova HDAC, što je bilo praćeno smanjenjem ekspresije antiapoptotskih proteina ciklina D1 i survivina [296].

NF-κB je uključen u aktivaciju signalnih puteva za preživljavanje, i njegova perzistentna aktivacija u ćelijama kolona, pored toga što dovodi do kolitisa, učestvuje i u razvoju karcinoma kolona [147]. Na modelu HT-29 ćelijske linije humanog adenokarcinoma kolona, kao i korišćenjem uzoraka ileuma izolovanih iz miševa, utvrđeno je da FXR i proinflamatorni citokini stupaju u kompleksnu interakciju. FXR inhibira inflamaciju smanjenjem ekspresije proinflamatornih citokina, što je posredovano NF-κB transkripcionim faktorom, s obzirom da je utvrđeno da obe subjedinice NF-κB, p50 i p65, stupaju u direktnu fizičku interakciju sa FXR [136]. Inhibitorno dejstvo prema NF-κB transkripcionom faktoru i sledstveno antiinflamatorno dejstvo je utvrđeno i nakon primene vorinostatata, kao inhibitora HDAC, na hemijskom eksperimentalnom modelu karcinoma kolona kod miševa, indukovanog primenom dekstran natrijum sulfata i azoksimetana, kao i na genetskom modelu hronične inflamacije i kancerogeneze kolona kod miševa sa inaktiviranim genom za IL-10 [204]. Naši rezultati su u saglasnosti sa ovim literaturnim podacima, s obzirom da je tretman HT-29 ćelija vorinostatom, samim i u kombinaciji sa sve tri ispitivane žučne kiseline, imao za

posledicu snažno, višestruko smanjenje ekspresije gena za ovaj proinflamatorni i antiapoptotski transkripcioni faktor.

Brojne studije su dokazale povišen nivo prostaglandina, posebno prostaglandina E2 (PgE2), u kolorektalnim adenomima i karcinomima, što je prevashodno posledica smanjene ekspresije gena za PGDH, ključni enzim u katabolizmu prostaglandina. Utvrđeno je da PgE2 ne deluje samo kao medijator inflamacije u ćelijama, nego da ima značajnu ulogu u stimulaciji proliferacije i angiogeneze, kao i u inhibiciji apoptoze i imunološke funkcije [297]. U našoj studiji, primena vorinostata nije značajno promenila ekspresiju *PGDH* gena u HT-29 ćelijama, ali je u kombinaciji sa HDH došlo do značajnog smanjenja ekspresije ovog gena, u odnosu i na netretirane ćelije i ćelije tretirane samo vorinostatom. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, s obzirom da je za nekonjugovanu HDH takođe *in vitro*, na ćelijskoj liniji humanog kolorektalnog karcinoma HT-29, pokazano da dovodi do snažne supresije transkripcije gena za PGDH, što ima za posledicu smanjenu aktivnost enzima PGDH i povećanje nivoa PgE2 u ćelijama karcinoma kolona [158]. Pokazano je da žučne kiseline mogu da utiču na metabolizam prostaglandina uticajem i na njihovu sintezu modulacijom ekspresije COX-2 u ćelijama. Dok hidrofobne žučne kiseline DH i HDH mogu da indukuju ekspresiju gena za COX-2, stimulišući sintezu prostaglandina [157], hidrofilna UDH, sa druge strane, ublažava inflamatorne procese supresijom ekspresije COX-2, što je dokazano *in vitro* na HT-29 ćelijama [159].

U skladu sa ciljem ove doktorske disertacije, ispitivali smo da li su efekti kombinovane primene vorinostata sa žučnim kiselinama prema HT-29 ćelijama karcinoma kolona posledica dejstva na FXR/SHP regulatorni signalni put, kao i da li postoji uključenost HDAC u ispoljavanju efekata od strane žučnih kiselina. U našoj studiji, primena vorinostata je dovela do povećanja ekspresije *FXR* i *SHP* gena u HT-29 ćelijama, koja je bila smanjena nakon kotretmana sa UDH, a značajno povećana nakon kombinovane primene vorinostata sa HDH i, posebno, sa MKH. Povećanje ekspresije gena za FXR i SHP nakon primene vorinostata može biti posledica indukovanja otvorene hromatinske strukture, što olakšava pristup aktiviranog FXR receptora u promoterski region svojih ciljnih gena [287]. Naši rezultati ukazuju da proapoptotsko dejstvo HDH, a potencijalno i MKH, može da bude direktna posledica aktivacije FXR receptora u ćelijama karcinoma kolona. Dok sniženje nivoa FXR u ćelijama doprinosi razvoju tumora, pokazano je da aktivacija ovog receptora primenom snažnog i selektivnog agoniste GW4064 dovodi do supresije proliferacije i indukcije apoptoze u ćelijama karcinoma kolona. Utvrđeno je, takođe, da aktivacija FXR na modelu ksenografta

karcinoma kolona kod miševa ima za posledicu značajno smanjeni tumorski rast [165]. Gubitak funkcije FXR kod miševa ima za posledicu povećanu podložnost hemijski-indukovanoj kancerogenezi u kolonu, dok je kod transgenih miševa sa konstitutivnom aktivnošću FXR u intestinumu smanjen rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma, kao i sam tumorski rast [166].

Rezultati našeg rada pokazuju da tretman HT-29 ćelija vorinostatom ima za posledicu povećanje ekspresije gena za HDAC1 i HDAC2, dok kotretman sa žučnim kiselinama vraća vrednosti ekspresije na nivo netretiranih ćelija. Na ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona Colo 320HSR je takođe pokazano da tretman vorinostatom dovodi do povećanja ekspresije HDAC1 i HDAC2 proteina u ćelijama nakon 24 h i 48 h, dok je ekspresija ovih enzima bila smanjena tek nakon 72 h. Ovi rezultati se objašnjavaju adaptivnim mehanizmom povećanja ekspresije gena koji treba da nadoknade aktivnost inhibiranih HDAC enzima pod dejstvom vorinostata, ali nakon određenog vremena dolazi do iscrpljenja ovog adaptivnog mehanizma i u ćelijama je snižena ekspresija i aktivnost HDAC proteina [296].

S obzirom da mnogi nuklearni receptori imaju plejotropne efekte i često interaguju sa drugim transkripcionim faktorima ili molekulima koji regulišu različite ćelijske funkcije, pažljivo razmatranje ovih komplikovanih interakcija između nuklearnih receptora na koje deluju žučne kiseline je neophodno kako bi se u potpunosti razumela njihova uloga u procesima razvoja metaboličkih poremećaja i kancerogeneze. Savremene studije su usmerene na ispitivanje uloge žučnih kiselina i njihovih nuklearnih receptora, na epigenetsku regulaciju ćelijskih procesa u normalnim i malignim ćelijama, ali i uloge epigenetskih agenasa na ekspresiju i dejstvo nuklearnih receptora.

Rezultati naše studije potvrđuju postojanje sinergističkog dejstva između HDAC inhibitora vorinostata i ispitivanih žučnih kiselina, koje je posledica složenih interakcija na nivou signalnih puteva uključenih u procese apoptoze, proliferacije i antioksidativne zaštite. Dok je uzrok sinergizma UDH sa vorinostatom najverovatnije smanjenje nivoa oksidativnog stresa u ćelijama i njihova senzitivizacija na citotoksično dejstvo vorinostata, u slučaju HDH i MKH, sinergizam može biti posledica efekata na nivou interakcije FXR i HDAC enzima. *In vitro* studijama je utvrđeno da ćelijske linije karcinoma mokraćne bešike kod kojih ligandi nuklearnih receptora FXR i VDR ispoljavaju najslabije antiproliferativno dejstvo imaju visoku ekspresiju ko-represornog NCoR1 proteina [287]. Ovaj ko-represor stupa u interakciju sa različitim HDAC enzimima i formira inhibicioni kompleks koji negativno reguliše transkripcionu aktivnost nuklearnih receptora [298]. Inhibicijom aktivnosti HDAC enzima,

dolazi do prelaska hormatina u otvorenu formu i lakšeg pristupa FXR receptora u promoterski region svojih ciljnih gena i ispoljavanja efekata agonista ovog receptora. Interakcije žučnih kiselina i inhibitora HDAC bi mogle biti iskorišćene u terapijske svrhe kod karcinoma kolona, ali je neophodno sprovesti opsežna istraživanja u *in vivo* modelima karcinoma kolona, kao i u naknadnim kliničkim studijama. Pored toga, uloga metilacije DNA i drugih epigenetskih mehanizama na fiziološke i farmakološke efekte žučnih kiselina treba takođe da bude ispitana.

## 6. Zaključak

Nakon sprovedenih ispitivanja i analize dobijenih rezultata, mogu se doneti sledeći zaključci:

- Hidrofilna žučna kiselina UDH ispoljava antiapoptotski efekat u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom, koji ostvaruje smanjenjem odnosa ekspresije *Bax* i *Bcl2* gena, kao i smanjenjem ekspresije gena za tumor supresor p53.
- Polusintetska žučna kiselina MKH u dozi od 4 mg/kg ispoljava antiapoptotski efekat u jetri eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom, odnosno sprečava mitohondrijalni put aktivacije apoptoze u jetri smanjenjem odnosa ekspresije *Bax* i *Bcl2* gena.
- UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg značajno moduliraju ekspresiju gena uključenih u antioksidativnu zaštitu u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom ka nivou ekspresije kod zdravih, netretiranih životinja.
- UDH i MKH u obe primenjene doze značajno moduliraju aktivnost antioksidativnih enzima u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom ka nivou aktivnosti kod zdravih, netretiranih životinja.
- UDH i MKH u dozi od 4 mg/kg ispoljavaju antiinflamatorno dejstvo u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom smanjenjem ekspresije gena za proinflamatorni transkripcioni faktor NF- $\kappa$ B, dok HDH i MKH u dozi od 20 mg/kg ispoljavaju suprotan efekat dodatnim povećanjem ekspresije gena za NF- $\kappa$ B, u odnosu na netretirane životinje sa holestazom.
- UDH ispoljava antiinflamatorno dejstvo i smanjenjem ekspresije gena za inducibilnu azot oksid sintetazu (iNOS) u jetri eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom.
- HDH i MKH u dozi od 20 mg/kg značajno povećavaju ekspresiju gena za nuklearne receptore FXR i SHP u jetri i intestinumu eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnom holestazom, što ukazuje da ove žučne kiseline mogu da aktiviraju FXR.

- Žučne kiseline ispoljavaju različite efekte prema ekspresiji gena za histon deacetilaze HDAC1 i HDAC2, a utvrđena je i tkivna specifičnost kod eksperimentalnih životinja sa indukovanom intrahepatičnomolestazom. Jedino UDH značajno smanjuje ekspresiju gena za oba ispitivana enzima i u jetri i intestinumu.
- Polusintetski keto derivat žučnih kiselina MKH ispoljava značajno manju citotoksičnost u odnosu na HDH i nešto veću citotoksičnost u odnosu na UDH prema HT-29 ćelijskoj liniji adenokarcinoma kolona.
- Epigenetski agens vorinostat ispoljava sinergističko citotoksično dejstvo sa sve tri ispitivane žučne kiseline, kao i sa citotoksičnim lekom doksorubicinom, ali i sa netoksičnim antioksidansima N-acetil cisteinom i  $\alpha$ -tokoferolom.
- Vorinostat značajno smanjuje antioksidativni kapacitet HT-29 ćelija adenokarcinoma kolona smanjenjem ekspresije *NRF2* gena i sledstvenim smanjenjem ekspresije gena za antioksidativne enzime. HDH dodatno smanjuje ekspresiju *NRF2* gena, dok MKH poboljšava antioksidativni kapacitet HT-29 ćelija povećanjem ekspresije *NRF2* gena ka vrednostima ekspresije u netretiranim ćelijama.
- Žučne kiseline u kombinaciji sa epigenetskim lekom vorinostatom ne ispoljavaju značajan uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima u HT-29 ćelijskoj liniji adenokarcinoma kolona.
- Vorinostat ispoljava proapoptotski i antiproliferativni efekat u HT-29 ćelijama karcinoma kolona, koji su još izraženiji u kombinaciji sa MKH, s obzirom da dolazi do značajnog povećanja odnosa ekspresije *BAX* i *BCL2* gena i smanjenja ekspresije gena za marker proliferacije ciklin D1.
- Sve tri ispitivane žučne kiseline negativno regulišu ekspresiju gena za proinflamatorni i antiapoptotski faktor NF- $\kappa$ B u HT-29 ćelijama adenokarcinoma kolona.
- MKH značajno povećava ekspresiju gena za FXR i SHP u HT-29 ćelijskoj liniji adenokarcinoma kolona, što ukazuje da MKH može da aktivira FXR receptor u ovim malignim ćelijama.
- Sve tri ispitivane žučne kiseline značajno smanjuju ekspresiju gena za histon deacetilaze HDAC1 i HDAC2 u HT-29 ćelijama karcinoma kolona, što ukazuje da žučne kiseline deo svojih efekata ostvaruju epigenetskim mehanizmima.

Rezultati našeg rada ukazuju da bi se, pored hidrofilne prirodne žučne kiseline UDH, polusintetski keto derivat MKH mogao koristiti u hemoprevenciji karcinoma kolona u niskim dozama, s obzirom na utvrđene efekte u modulaciji ekspresije gena uključenih u procese apoptoze, oksidativnog stresa i inflamacije. Takođe, dokazan je sinergistički efekat žučnih kiselina sa epigenetskim antitumorskim agensom vorinostatom, što otvara mogućnost kombinovane farmakološke strategije u terapiji solidnih tumora, koji u najvećem procentu pokazuju rezistenciju prema samom vorinostatu. Naša studija je utvrdila uticaj žučnih kiselina na ekspresiju gena za HDAC, a savremena saznanja o ulozi žučnih kiselina u epigenetskoj regulaciji ćelijskih procesa su na niskom nivou. Stoga, rezultati naše studije pružaju i dobru osnovu za dalja ispitivanja u pogledu uticaja žučnih kiselina na druge hromatinske modifikacije ili na metilaciju DNA, čime bi spektar farmakoloških dejstava žučnih kiselina bio proširen u budućnosti.



## Literatura

1. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(3): 177-93.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Dostupno na: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal)
3. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Copped F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: Article ID 792362.
4. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27(9): 1423-31.
5. Le Marchand L, Kolonel LN. Cancer among Japanese migrants to Hawaii: gene-environment interactions. *Rev Epidemiol Santé Publique.* 1992; 40(6): 425-30.
6. Magalhães B, Peleteiro B, Lunet N. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev.* 2012; 21(1): 15-23.
7. Barrasa JI, Olmo N, Antonia Lizarbe M, Turnay J. Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol In Vitro.* 2013; 27(2): 964-77.
8. Renga B, Mencarelli A, Cipriani S, Distrutti E. Molecular determinants of gastrointestinal and liver cancers: Role of bile acid activated nuclear receptors. *Curr Top Med Chem.* 2012; 12(6): 625-36.
9. Gioiello A, Cerra B, Mostarda S, Guercini C, Pellicciari R, Macchiarulo A. Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor: molecular determinants for bile acid binding and receptor modulation. *Curr Top Med Chem.* 2014; 14(19): 2159-74.
10. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, Bäckhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab.* 2016; 24(1): 41-50.
11. Pavlović N, Stanimirov B, Mikov M. Bile acids as novel pharmacological agents: the interplay between gene polymorphisms, epigenetic factors and drug response. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(1): 187-215.
12. Mullard A. 2015 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov.* 2016; 15(2): 73-6.
13. Deeks ED. Deoxycholic acid: a review in submental fat contouring. *Am J Clin Dermatol.* 2016; 17(6): 701-7.
14. Markham A, Keam SJ. Obeticholic acid: first global approval. *Drugs.* 2016; 76(12): 1221-6.

15. Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap - bile acids in metabolic control. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10(8): 488-98.
16. Schaap FG, Trauner M, Jansen PL. Bile acid receptors as targets for drug development. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014; 11(1): 55-67.
17. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(7): 804-16.
18. Faustino C, Serafim C, Rijo P, Reis CP. Bile acids and bile acid derivatives: use in drug delivery systems and as therapeutic agents. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016; 13(8): 1133-48.
19. Madenci D, Egelhaaf SU. Self-assembly in aqueous bile salt solutions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2010; 15(1-2): 109-15.
20. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(16): 2461-83.
21. Galantini L, di Gregorio MC, Gubitosi M, Travaglini L, Vazquez Tato J, Jover A, et al. Bile salts and derivatives: Rigid unconventional amphiphiles as dispersants, carriers and superstructure building blocks. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2015; 20(3): 170-82.
22. Natalini B, Sardella R, Camaioni E, Gioiello A, Pellicciari R. Correlation between CMC and chromatographic index: simple and effective evaluation of the hydrophobic/hydrophilic balance of bile acids. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 388(8): 1681-8.
23. Barrasa JI, Olmo N, Pérez-Ramos P, Santiago-Gómez A, Lecona E, Turnay J, et al. Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis.* 2011; 16(10): 1054-67.
24. Garidel P, Hildebrand A, Knauf K, Blume A. Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition. *Molecules.* 2007; 12(10): 2292-326.
25. Moghimipour E, Ameri A, Handali S. Absorption-enhancing effects of bile salts. *Molecules.* 2015; 20(8): 14451-73.
26. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life Sci.* 2013; 7(3-4): 112-22.
27. Chiang JYL. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009; 50(10): 1955-66.
28. Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol.* 2013; 3(3): 1191-212.
29. Ishibashi S, Schwarz M, Frykman PK, Herz J, Russell DW. Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J Biol Chem.* 1996; 271(30): 18017-23.

30. Erickson SK, Lear SR, Deane S, Dubrac S, Huling SL, Nguyen L, et al. Hypercholesterolemia and changes in lipid and bile acid metabolism in male and female cyp7A1-deficient mice. *J Lipid Res.* 2003; 44(5): 1001-9.
31. Miyake JH, Duong-Polk XT, Taylor JM, Du EZ, Castellani LW, Lusic AJ, et al. Transgenic expression of cholesterol-7- $\alpha$ -hydroxylase prevents atherosclerosis in C57BL/6J mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(1): 121-6.
32. Hofman MK, Princen HMG, Zwinderman AH, Jukema JW. Genetic variation in the rate-limiting enzyme in cholesterol catabolism (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase) influences the progression of atherosclerosis and risk of new clinical events. *Clin Sci.* 2005; 108: 539-45.
33. De Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 2013; 17(5): 657-69.
34. Martinot E, Sedes L, Baptissart M, Lobaccaro JM, Caira F, Beaudoin C, et al. Bile acids and their receptors. *Mol Aspects Med.* 2017; 56: 2-9.
35. Pavlović N, Stankov K, Mikov M. Probiotics - interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; 168(7): 1880-95.
36. Li T, Apte U. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation, and cancer. *Adv Pharmacol.* 2015; 74: 263-302.
37. Devlin AS, Fischbach MA. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat Chem Biol.* 2015; 11(9): 685-90.
38. Copple BL, Li T. Pharmacology of bile acid receptors: evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. *Pharmacol Res.* 2016; 104: 9-21.
39. Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P. Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72(9): 1631-50.
40. Baptissart M, Martinot E, Vega A, Sedes L, Rouaisnel B, de Haze A, et al. Bile acid-FXR $\alpha$  pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget.* 2016; 7(15): 19468-82.
41. Chiang JYL, Pathak P, Liu H, Donepudi A, Ferrell J, Boehme S. Intestinal farnesoid X receptor and Takeda G protein couple receptor 5 signaling in metabolic regulation. *Dig Dis.* 2017; 35(3): 241-5.
42. Zhu Y, Liu H, Zhang M, Guo GL. Fatty liver diseases, bile acids, and FXR. *Acta Pharm Sin B.* 2016; 6(5): 409-12.
43. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Pleiotropic functions of bile acids mediated by the farnesoid X receptor. *Acta Gastroenterol Belg.* 2012; 75(4): 389-98.

44. Jiao Y, Lu Y, Li XY. Farnesoid X receptor: a master regulator of hepatic triglyceride and glucose homeostasis. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(1): 44-50.
45. Liu X, Liu J, Dong B, Roth J, Young M. Activation of FXR by steroidal or non-steroidal agonists causes an increase in LDL-cholesterol in mice with humanized chimeric liver. *J Hepatol.* 2017; 66(1): S611.
46. 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.
47. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin GV, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, et al. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes.* 2004; 53(4): 890-8.
48. Zhu Y, Li F, Guo GL. Tissue-specific function of farnesoid X receptor in liver and intestine. *Pharmacol Res.* 2011; 63(4): 259-65.
49. Huang XF, Zhao WY, Huang WD. FXR and liver carcinogenesis. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(1): 37-43.
50. Campbell MJ, Adorini L. The vitamin D receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2006; 10(5): 735-48.
51. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25(9): 2850-65.
52. Adachi R, Honma Y, Masuno H, Kawana K, Shimomura I, Yamada S, et al. Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative. *J Lipid Res.* 2005; 46(1): 46-57.
53. Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JY. A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol.* 2010; 24(6): 1151-64.
54. Reich KM, Fedorak RN, Madsen K, Kroeker KI. Vitamin D improves inflammatory bowel disease outcomes: basic science and clinical review. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(17): 4934-47.
55. Lu R, Wu S, Xia Y, Sun J. The vitamin D receptor, inflammatory bowel diseases, and colon cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2012; 8(1): 57-65.
56. Zhang B, Xie W, Krasowski MD. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(11): 1695-709.
57. Molnár F, Küblbeck J, Jyrkkärinne J, Prantner V, Honkakoski P. An update on the constitutive androstane receptor (CAR). *Drug Metabol Drug Interact.* 2013; 28(2): 79-93.

58. Hernandez JP, Mota LC, Baldwin WS. Activation of CAR and PXR by dietary, environmental and occupational chemicals alters drug metabolism, intermediary metabolism, and cell proliferation. *Curr Pharmacogenomics Person Med.* 2009; 7(2): 81-105.
59. Jonker JW, Liddle C, Downes M. FXR and PXR: potential therapeutic targets in cholestasis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 130(3-5): 147-58.
60. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(6): 3369-74.
61. Stedman CAM, Liddle C, Coulter SA, Sonoda J, Alvarez JGA, Moore DD, et al. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(6): 2063-8.
62. Claudel T, Zollner G, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2011; 1812(8): 867-78.
63. Gao J, Xie W. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(10): 552-8.
64. Hukkanen J, Hakkola J, Rysä J. Pregnane X receptor (PXR) - a contributor to the diabetes epidemic? *Drug Metabol Drug Interact.* 2014; 29(1): 3-15.
65. Wada T, Gao J, Xie W. PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(6): 273-9.
66. Roth A, Looser R, Kaufmann M, Blättler SM, Rencurel F, Huang W, et al. Regulatory cross-talk between drug metabolism and lipid homeostasis: constitutive androstane receptor and pregnane X receptor increase Insig-1 expression. *Mol Pharmacol.* 2008; 73(4): 1282-9.
67. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, et al. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest.* 2005; 115(1): 177-86.
68. Tien ES, Matsui K, Moore R, Negishi M. The nuclear receptor constitutively active/androstane receptor regulates type 1 deiodinase and thyroid hormone activity in the regenerating mouse liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 320(1): 307-13.
69. Martínez A, Márquez A, Mendoza J, Taxonera C, Fernández-Arquero M, Díaz-Rubio M, et al. Role of the PXR gene locus in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13(12): 1484-7.

70. Stepanov V, Stankov K, Mikov M. The bile acid membrane receptor TGR5: a novel pharmacological target in metabolic, inflammatory and neoplastic disorders. *J Recept Signal Transduct Res.* 2013; 33(4): 213-23.
71. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem.* 2003; 278(11): 9435-40.
72. Duboc H, Taché Y, Hofmann AF. The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. *Dig Liver Dis.* 2014; 46(4): 302-12.
73. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.* 2009; 10(3): 167-77.
74. Kumar DP, Rajagopal S, Mahavadi S, Mirshahi F, Grider JR, Murthy KS, et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 427(3): 600-5.
75. Watanabe M, Houten SM, Matakci 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.
76. Guo C, Qi H, Yu Y, Zhang Q, Su J, Yu D, et al. The G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) inhibits gastric inflammation through antagonizing NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 287.
77. Keitel V, Cupisti K, Ullmer C, Knoefel WT, Kubitz R, Häussinger D. The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology.* 2009; 50(3): 861-70.
78. Li T, Holmstrom SR, Kir S, Umetani M, Schmidt DR, Kliewer SA, et al. The G Protein-Coupled Bile Acid Receptor, TGR5, Stimulates Gallbladder Filling. *Mol Endocrinol.* 2011; 25(6): 1066-71.
79. Reich M, Deutschmann K, Sommerfeld A, Klindt C, Kluge S, Kubitz R, et al. TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro. *Gut.* 2016; 65(3): 487-501.
80. Alemi F, Poole DP, Chiu J, Schoonjans K, Cattaruzza F, Grider JR, et al. The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice. *Gastroenterology.* 2013; 144(1): 145-54.
81. Lieu T, Jayaweera G, Zhao P, Poole DP, Jensen D, Grace M, et al. The bile acid receptor TGR5 activates the trpa1 channel to induce itch in mice. *Gastroenterology.* 2014; 147(6): 1417-28.

82. Gohlke H, Schmitz B, Sommerfeld A, Reinehr R, Häussinger D.  $\alpha 5\beta 1$ -integrins are sensors for tauroursodeoxycholic acid in hepatocytes. *Hepatology*. 2013; 57(3): 1117-29.
83. Studer E, Zhou X, Zhao R, Wang Y, Takabe K, Nagahashi M, et al. Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes. *Hepatology*. 2012; 55(1): 267-76.
84. Zeuzem S. Gut-liver axis. *Int J Colorectal Dis*. 2000; 15(2): 59-82.
85. Wieser V, Gerner R, Moschen AR, Tilg H. Liver complications in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis*. 2013; 31(2): 233-8.
86. Sukhotnik I, Kuscuoglu U, Altindag B, Tao GZ, Lehwald N, Sylvester KG. Intestinal involvement during 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-induced chronic liver injury in a mouse model. *J Pediatr Surg*. 2011; 46(8): 1495-502.
87. Kullak-Ublick GA. Drug-induced cholestatic liver disease. In: Trauner M, Jansen PLM, editors. Molecular pathogenesis of cholestasis. Georgetown, USA: Landes Bioscience. 2004; pp. 256-65.
88. Sakisaka S, Kawaguchi T, Taniguchi E, Hanada S, Sasatomi K, Koga H, et al. Alterations in tight junctions differ between primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2001; 33(6): 1460-8.
89. Chazouillères O, Housset C. Intrahepatic cholestasis. In: Rodes J, Benhamou JP, Blei A, Reichen J, Rizzetto M, editors. Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd edition. Malden, USA: Blackwell Publishing. 2007; pp. 1479-500.
90. Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology*. 2010; 139(5): 1481-96.
91. Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD. Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. *Semin Liver Dis*. 2010; 30(2): 195-204.
92. Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(48): 10512-22.
93. Jüngst C, Berg T, Cheng J, Green RM, Jia J, Mason AL, et al. Intrahepatic cholestasis in common chronic liver diseases. *Eur J Clin Invest*. 2013; 43(10): 1069-83.
94. Talley NJ, Abreu MT, Achkar JP, Bernstein CN, Dubinsky MC, Hanauer SB, et al. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106(Suppl. 1): S2-S25.

95. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(1): 362-81.
96. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011; 474(7351): 307-17.
97. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med*. 2000; 51: 289-98.
98. Shapiro JM, Cho JH, Sands BE, LeLeiko NS. Bridging the gap between host immune response and intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease: does immunoglobulin a mark the spot? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015; 13(5): 842-6.
99. Chan HC, Kim DH, Lung PF, Cheon JH, Ng SC. Complications of inflammatory bowel disease. In: Kim WH, Cheon JH, editors. Atlas of inflammatory bowel diseases. Berlin: Springer. 2015; pp. 175-86.
100. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. 2008; 659(1-2): 15-30.
101. Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2011; 378(9809): 2081-7.
102. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015; 12(10): 584-96.
103. Shaked H, Hofseth LJ, Chumanevich A, Chumanevich AA, Wang J, Wang Y, et al. Chronic epithelial NF- $\kappa$ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(35): 14007-12.
104. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016; 17(3): 230-40.
105. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013; 152(1-2): 25-38.
106. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, et al. NF- $\kappa$ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest*. 2012; 122(7): 2601-12.
107. Cooks T, Pateras I, Tarcic O, Solomon H, Schetter A, Wilder S, et al. Mutant p53 prolongs NF- $\kappa$ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell*. 2013; 23(5): 634-46.



108. Torres J, De Chambrun GP, Itzkowitz S, Sachar DB, Colombel JF. Review article: colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 34(5): 497-508.
109. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2015; 14(1): 18-33.
110. Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B, Willemsen ECL, Renooij W, Murzilli S, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2011; 60(4): 463-72.
111. Watanabe M, Fukiya S, Yokota A. Comprehensive evaluation of the bactericidal activities of free bile acids in the large intestine of humans and rodents. *J Lipid Res.* 2017; 58(6): 1143-52.
112. Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, Peng L, Zhao G, Downes M, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(10): 3920-5.
113. Verbeke L, Farre R, Verbinnen B, Covens K, Vanuytsel T, Verhaegen J, et al. The FXR agonist obeticholic acid prevents gut barrier dysfunction and bacterial translocation in cholestatic rats. *Am J Pathol.* 2015; 185(2): 409-19.
114. Alaish SM, Smith AD, Timmons J, Greenspon J, Eyvazzadeh D, Murphy E, et al. Gut microbiota, tight junction protein expression, intestinal resistance, bacterial translocation and mortality following cholestasis depend on the genetic background of the host. *Gut Microbes.* 2013; 4(4): 292-305.
115. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014; 30(3): 332-8.
116. Lioudaki E, S Ganotakis E, P Mikhailidis D. Lipid lowering drugs and gallstones: a therapeutic option? *Curr Pharm Des.* 2011; 17(33): 3622-31.
117. Moschetta A, Bookout AL, Mangelsdorf DJ. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nat Med.* 2004; 10(12): 1352-8.
118. 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; 112(11): 1678-87.

119. Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid x receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 313(2): 604-12.
120. Imam MH, Weeding E, Lindor KD. Recent developments in the management of idiopathic cholestatic liver disease. *Ann Gastroenterol.* 2012; 25(4): 317-326.
121. Wagner M, Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Silbert D, Tsybrovskyy O, et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology.* 2003; 125(3): 825-38.
122. Modica S, Petruzzelli M, Bellafante E, Murzilli S, Salvatore L, Celli N, et al. Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis. *Gastroenterology.* 2012; 142(2): 355-65.
123. Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Fickert P, Diczfalusy U, Gumhold J, et al. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans. *Gastroenterology.* 2005; 129(2): 476-85.
124. Beilke LD, Aleksunes LM, Holland RD, Besselsen DG, Beger RD, Klaassen CD, et al. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37(5): 1035-45.
125. Ogura M, Nishida S, Ishizawa M, Sakurai K, Shimizu M, Matsuo S, et al. Vitamin D3 modulates the expression of bile acid regulatory genes and represses inflammation in bile duct-ligated mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328(2): 564-70.
126. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005; 26(5): 662-87.
127. Beuers U, Maroni L, Elferink RO. The biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella: experimental evidence revisited. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012; 28(3): 253-7.
128. Keitel V, Häussinger D. TGR5 in cholangiocytes. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013; 29(3): 299-304.
129. Chen WY, Lin SY, Pan HC, Liao SL, Chuang YH, Yen YJ, et al. Beneficial effect of docosahexaenoic acid on cholestatic liver injury in rats. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(3): 252-64.
130. Cai SY, Boyer JL. The role of inflammation in the mechanisms of bile acid-induced liver damage. *Dig Dis.* 2017; 35(3): 232-4.

131. Li M, Cai SY, Boyer JL. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver. *Mol Aspects Med.* 2017; 56: 45-53.
132. Wang YD, Chen WD, Moore DD, Huang W. FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res.* 2008; 18(11): 1087-95.
133. Ikegami T, Matsuzaki Y. Ursodeoxycholic acid: mechanism of action and novel clinical applications. *Hepatol Res.* 2008; 38(2): 123-31.
134. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol.* 2009; 183(10): 6251-61.
135. Hunter CJ, De Plaen IG. Inflammatory signaling in NEC: role of NFκB and cytokines. *Pathophysiology.* 2014; 21(1): 55-65.
136. Gadaleta RM, Oldenburg B, Willemsen EC, Spit M, Murzilli S, Salvatore L, et al. Activation of bile salt nuclear receptor FXR is repressed by pro-inflammatory cytokines activating NF-κB signaling in the intestine. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2011; 1812(8): 851-8.
137. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev.* 2005; 208: 126-40.
138. Fiorucci S, Cipriani S, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Baldelli F. Counter-regulatory role of bile acid activated receptors in immunity and inflammation. *Curr Mol Med.* 2010; 10(6): 579-95.
139. Esmaily H, Vaziri-Bami A, Miroliaee AE, Baeri M, Abdollahi M. The correlation between NF-κB inhibition and disease activity by coadministration of silibinin and ursodeoxycholic acid in experimental colitis. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011; 25(6): 723-33.
140. Bernardes-Silva CF, Damião AO, Sipahi AM, Laurindo FR, Iriya K, Lopasso FP, et al. Ursodeoxycholic acid ameliorates experimental ileitis counteracting intestinal barrier dysfunction and oxidative stress. *Dig Dis Sci.* 2004; 49(10): 1569-74.
141. He J, Liang J, Zhu S, Zhao W, Zhang Y, Sun W. Protective effect of taurohyodeoxycholic acid from Pulvis Fellis Suis on trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis in mice. *Eur J Pharmacol.* 2011; 670(1): 229-35.
142. Sato H, Macchiarulo A, Thomas C, Gioiello A, Une M, Hofmann AF, et al. Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem.* 2008; 51(6): 1831-41.
143. Chen S, Zhu J, Chen G, Zuo S, Zhang J, Chen Z, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 preserves intestinal epithelial barrier function from TNF-α induced injury via suppression of NF-κB

- p65 mediated MLCK-P-MLC signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 460(3): 873-8.
144. Ding L, Yang L, Wang Z, Huang W. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharm Sin B.* 2015; 5(2): 135-44.
  145. Lorenzo-Zúñiga V, Bartoli R, Planas R, Hofmann AF, Vinado B, Hagey LR, et al. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2003; 37(3): 551-7.
  146. Stojančević M, Stankov K, Mikov M. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol.* 2012; 26(9): 631-7.
  147. Perez MJ, Britz O. Bile acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(14): 1677-89.
  148. Lagergren J, Ye WM, Ekblom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology.* 2001; 121(3): 542-7.
  149. Degirolamo C, Modica S, Palasciano G, Moschetta A. Bile acids and colon cancer: solving the puzzle with nuclear receptors. *Trends Mol Med.* 2011; 17(10): 564-72.
  150. D'Errico I, Moschetta A. Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(10): 1523-43.
  151. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007; 449(7165): 1003-7.
  152. Gadaleta RM, Garcia-Irigoyen O, Moschetta A. Bile acids and colon cancer: is FXR the solution of the conundrum? *Mol Aspects Med.* 2017; 56: 66-74.
  153. Solimando R, Bazzoli F, Ricciardiello L. Chemoprevention of colorectal cancer: a role for ursodeoxycholic acid, folate and hormone replacement treatment? *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011; 25(4): 555-68.
  154. Amaral JD, Viana RJS, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CMP. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 2009; 50(9): 1721-34.
  155. Bernstein C, Bernstein H, Garewal H, Dinning P, Jabi R, Sampliner RE, et al. A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies. *Cancer Res.* 1999; 59(10): 2353-7.

156. Moschetta A, Portincasa P, Van Erpecum KJ, Debellis L, Vanberge-Henegouwen GP, Palasciano G. Sphingomyelin protects against apoptosis and hyperproliferation induced by deoxycholate - potential implications for colon cancer. *Dig Dis Sci.* 2003; 48(6): 1094-101.
157. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Fahey III TJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic cancer cell lines. *Carcinogenesis.* 2004; 25(3): 419-23.
158. Miyaki A, Yang P, Tai H-H, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Bile acids inhibit NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase transcription in colonocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 297(3): G559-66.
159. Van Heumen BW, Roelofs HM, Te Morsche RH, Marian B, Nagengast FM, Peters WH. Celecoxib and tauro-ursodeoxycholic acid co-treatment inhibits cell growth in familial adenomatous polyposis derived LT97 colon adenoma cells. *Exp Cell Res.* 2012; 318(7): 819-27.
160. Khare S, Mustafi R, Cerda S, Yuan W, Jagadeeswaran S, Dougherty U, et al. Ursodeoxycholic acid suppresses Cox-2 expression in colon cancer: roles of Ras, p38, and CCAAT/enhancer-binding protein. *Nutr Cancer.* 2008; 60(3): 389-400.
161. Payne CM, Crowley-Skillicorn C, Bernstein C, Holubec H, Moyer MP, Bernstein H. Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutr Cancer.* 2010; 62(6): 825-40.
162. Modica S, Cariello M, Morgano A, Gross I, Vegliante MC, Murzilli S, et al. Transcriptional regulation of the intestinal nuclear bile acid farnesoid X receptor (FXR) by the caudal-related homeobox 2 (CDX2). *J Biol Chem.* 2014; 289(41): 28421-32.
163. Bailey AM, Zhan L, Maru D, Shureiqi I, Pickering CR, Izzo J, et al. FXR silencing in human colon cancer by DNA methylation and KRAS signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014; 306(1): G48-58.
164. Lian F, Xing X, Yuan G, Schäfer C, Rauser S, Walch A, et al. Farnesoid X receptor protects human and murine gastric epithelial cells against inflammation-induced damage. *Biochem J.* 2011; 438(2): 315-23.
165. Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, Moschetta A. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2008; 68(23): 9589-94.
166. Maran RRM, Thomas A, Roth M, Sheng Z, Esterly N, Pinson D, et al. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328(2): 469-77.

167. Selmin OI, Fang C, Lyon AM, Doetschman TC, Thompson PA, Martinez JD, et al. Inactivation of adenomatous polyposis coli reduces bile acid/farnesoid X receptor expression through Fxr gene CpG methylation in mouse colon tumors and human colon cancer cells. *J Nutr.* 2016; 146(2): 236-42.
168. Pan L, Matloob AF, Du J, Pan H, Dong Z, Zhao J, et al. Vitamin D stimulates apoptosis in gastric cancer cells in synergy with trichostatin A/sodium butyrate-induced and 5-aza-2'-deoxycytidine-induced PTEN upregulation. *FEBS J.* 2010; 277(4): 989-99.
169. Zhou J, Liu M, Zhai Y, Xie W. The antiapoptotic role of pregnane X receptor in human colon cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(4): 868-80.
170. Ouyang N, Ke S, Eagleton N, Xie Y, Chen G, Laffins B, et al. Pregnane X receptor suppresses proliferation and tumorigenicity of colon cancer cells. *Br J Cancer.* 2010; 102(12): 1753-61.
171. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol.* 2013; 14(7): 676-84.
172. Sun J, Kato I. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Genes Dis.* 2016; 3(2): 130-43.
173. O'Keefe SJD. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016; 13(12): 691-706.
174. Taira T, Yamaguchi S, Takahashi A, Okazaki Y, Yamaguchi A, Sakaguchi H, et al. Dietary polyphenols increase fecal mucin and immunoglobulin A and ameliorate the disturbance in gut microbiota caused by a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2015; 57(3): 212-6.
175. Stankov K, Pavlović N, Mikov M. Epigenetic therapy of cancer. *HOPH.* 2014; 1(2): 83-92.
176. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009; 23(7): 781-3.
177. Seidel C, Florean C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. *Biochimie.* 2012; 94(11): 2264-79.
178. Korzus E. Manipulating the brain with epigenetics. *Nat Neurosci.* 2010; 13(4): 405-6.
179. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010; 28(10): 1057-68.
180. Lappalainen T, Grealley JM. Associating cellular epigenetic models with human phenotypes. *Nat Rev Genet.* 2017; 18(7): 441-51.

181. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008; 266(1): 6-11.
182. Atadja PW. HDAC inhibitors and cancer therapy. In: Gasser SM, Li E, editors. *Epigenetics and disease: pharmaceutical opportunities.* Basel: Springer. 2011; pp. 175-95.
183. Walkinshaw DR, Yang XJ. Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. *Curr Oncol.* 2008; 15(5): 237-243.
184. Vaiopoulos AG, Athanasoula KC, Papavassiliou AG. Epigenetic modifications in colorectal cancer: molecular insights and therapeutic challenges. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014; 1842(7): 971-80.
185. Stypula-Cyrus Y, Damania D, Kunte DP, Cruz MD, Subramanian H, Roy HK, et al. HDAC up-regulation in early colon field carcinogenesis is involved in cell tumorigenicity through regulation of chromatin structure. *PLoS One.* 2013; 8(5): e64600.
186. Jin L, Hanigan CL, Wu Y, Wang W, Park BH, Woster PM, et al. Loss of LSD1 (lysine-specific demethylase 1) suppresses growth and alters gene expression of human colon cancer cells in a p53- and DNMT1 (DNA methyltransferase 1)-independent manner. *Biochem J.* 2013; 449(2): 459-68.
187. Roche J, Bertrand P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2016; 121: 451-83.
188. Lübbert M, Kuendgen A. Combining DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition to treat acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome: achievements and challenges. *Cancer.* 2015; 121(4): 498-501.
189. Zhang Y, Fang H, Jiao J, Xu W. The structure and function of histone deacetylases: the target for anti-cancer therapy. *Curr Med Chem.* 2008; 15(27): 2840-9.
190. Peng L, Yuan Z, Ling H, Fukasawa K, Robertson K, Olashaw N, et al. SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Mol Cell Biol.* 2011; 31(23): 4720-34.
191. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest.* 2014; 124(1): 30-9.
192. Wanczyk M, Roszczenko K, Marcinkiewicz K, Bojarczuk K, Kowara M, Winiarska M. HDACi - going through the mechanisms. *Front Biosci.* 2011; 16: 340-59.
193. Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, et al. Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-

- induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res.* 2004; 64(7): 2580-9.
194. Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med.* 2005; 11(1): 71-6.
  195. Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(19): 10833-8.
  196. Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, Xu Y. Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(13): 5389-95.
  197. Blagosklonny MV, Trostel S, Kayastha G, Demidenko ZN, Vassilev LT, Romanova LY, et al. Depletion of mutant p53 and cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* 2005; 65(16): 7386-92.
  198. Pediconi N, Ianari A, Costanzo A, Belloni L, Gallo R, Cimino L, et al. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(6): 552-8.
  199. Fuino L, Bali P, Wittmann S, Donapaty S, Guo F, Yamaguchi H, et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2(10): 971-84.
  200. Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S. Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF- $\kappa$ B activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(13): 5429-44.
  201. Ungerstedt J, Sowa Y, Xu W-S, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, et al. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(3): 673-8.
  202. Butler LM, Zhou X, Xu W-S, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(18): 11700-5.
  203. Glauben R, Sonnenberg E, Zeitz M, Siegmund B. HDAC inhibitors in models of inflammation-related tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2009; 280(2): 154-9.



204. Glauben R, Batra A, Stroh T, Erben U, Fedke I, Lehr HA, et al. Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut*. 2008; 57(5): 613-22.
205. Fakih M, Groman A, McMahon J, Wilding G, Muindi J. A randomized phase II study of two doses of vorinostat in combination with 5-FU/LV in patients with refractory colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012; 69(3): 743-51.
206. Deming DA, Ninan J, Bailey HH, Kolesar JM, Eickhoff J, Reid JM, et al. A Phase I study of intermittently dosed vorinostat in combination with bortezomib in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2014; 32(2): 323-9.
207. Huang J, Plass C, Gerhauser C. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. *Curr Drug Targets*. 2011; 12(13): 1925-56.
208. Miljković D, Kuhajda K, Hranisavljević J. Selective C-12 oxidation of cholic acid. *J Chem Res*. 1996; 2: 106-7.
209. Bajin-Katić K, Stankov K, Đolai M, Kovačević Z. Intestinal alkaline phosphatase activity as a molecular marker of enterotoxicity induced by single dose of 5-fluorouracil and protective role of orally administered glutamine. *Arch Oncol*. 2006; 14(3-4): 101-5.
210. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férard G, Ferrero CA, Franck PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40: 725-33.
211. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férard G, Ferrero CA, Franck PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40: 718-24.
212. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férard G, Ferrero CA, Franck PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of  $\gamma$ -glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40: 734-8.
213. Larson D, editor. *Clinical chemistry: fundamentals and laboratory techniques*. Amsterdam: Elsevier. 2015.
214. Bogdanović G, Raletić-Savić J, Marković N. In vitro assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay. *Arch Oncol*. 1994; 2: 181-4.

215. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
216. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010; 70(2): 440-6.
217. Cruciani G, Pastor M, Guba W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur J Pharm Sci*. 2000; 11(2): S29-39.
218. Spartan 14, Wavefunction Inc. Irvine, CA 92612, USA, 2014.
219. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010; 44(10): 1098-124.
220. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244(22): 6049-55.
221. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press; 1974.
222. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967; 70(1): 158-69.
223. Glatzle D, Vuilleumier J, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Cell Mol Life Sci*. 1974; 30(6): 665-7.
224. Beutler E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.
225. GenElute mammalian total RNA miniprep kit user guide [Internet]. Sigma-Aldrich; c.2014 [citirano 2017 Jun 22]. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/rtn70bul.pdf>
226. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006; 7: 3.
227. Universal SYBR Green Quantitative PCR Protocol [Internet]. Sigma-Aldrich; c.2017 [citirano 2017 Jun 22]. Dostupno na: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html>
228. Zhao Y, Zhai D, He H, Liu J, Li T, Chen X, et al. Matrine improves 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol-induced acute cholestasis in rats. *Hepatol Res*. 2009;39(11):1144-9.

229. Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Melatonin exerts a therapeutic effect on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. *J Pineal Res.* 2003; 34(2): 119-26.
230. Eshraghi T, Eidi A, Mortazavi P, Asghari A, Tavangar SM. Magnesium protects against bile duct ligation-induced liver injury in male Wistar rats. *Magnes Res.* 2015; 28(1): 32-45.
231. Jain AK, Wen JX, Arora S, Blomenkamp KS, Rodrigues J, Blaufuss TA, et al. Validating hyperbilirubinemia and gut mucosal atrophy with a novel ultramobile ambulatory total parenteral nutrition piglet model. *Nutr Res.* 2015; 35(2): 169-74.
232. Perez MJ, Macias RI, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol.* 2005; 43(2): 324-32.
233. Sotil EU, Jensen DM. Serum enzymes associated with cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2004; 8(1): 41-54.
234. El-Sisi A, Hegazy S, El-Khateeb E. Effects of three different fibrates on intrahepatic cholestasis experimentally induced in rats. *PPAR Res.* 2013; 2013: Article ID 781348.
235. Said SA, El-Agamy DS. Effects of curcumin, resveratrol and ursodeoxycholic acid on ethinylestradiol and chlorpromazine- induced intrahepatic cholestasis in rats. *Pharmacologyonline.* 2009; 3: 91-100.
236. Pozzi EJS, Crocenzi FA, Pellegrino JM, Catania VA, Luquita MG, Roma MG, et al. Ursodeoxycholate reduces ethinylestradiol glucuronidation in the rat: role in prevention of estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306(1): 279-86.
237. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1): 9-19.
238. Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K, Yang GM, et al. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7): e1544.
239. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(7): 579-91.
240. Bułdak RJ, Bułdak Ł, Kukla M, Gabriel A, Żwirska-Korczała K. Significance of selected antioxidant enzymes in cancer cell progression. *Pol J Pathol.* 2014; 65(3): 167-75.
241. Wang T, Zhou ZX, Sun LX, Li X, Xu ZM, Chen M, et al. Resveratrol effectively attenuates  $\alpha$ -naphthyl-isothiocyanate-induced acute cholestasis and liver injury through choleric and anti-inflammatory mechanisms. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35(12): 1527-36.

242. Kitada T, Seki S, Iwai S, Yamada T, Sakaguchi H, Wakasa K. In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J Hepatol.* 2001; 35(5): 613-8.
243. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(3): 351-9.
244. Galicia-Moreno M, Favari L, Muriel P. Antifibrotic and antioxidant effects of N-acetylcysteine in an experimental cholestatic model. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 24(2): 179-85.
245. Dhibi S, Ettaya A, Elfeki A, Hfaiedh N. Protective effects of *Artemisia arborescens* essential oil on oestrogenic treatment induced hepatotoxicity. *Nutr Res Pract.* 2015; 9(5): 466-71.
246. Han JM, Kim HG, Choi MK, Lee JS, Park HJ, Wang JH, et al. Aqueous extract of *Artemisia iwayomogi* Kitamura attenuates cholestatic liver fibrosis in a rat model of bile duct ligation. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(10): 3505-13.
247. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, et al. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem.* 2003; 384(4): 567-74.
248. Chang MJ, Xu YJ, He WX, Zhang CL, Li XP, Liu D. Intestinal injury in the rat model of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol-induced intrahepatic cholestasis. *J Dig Dis.* 2016; 17(11): 756-63.
249. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
250. Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. *Compr Physiol.* 2013; 3(2): 977-1010.
251. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. *Molecular biology of the cell.* 6th ed. New York: Garland Science; 2015.
252. 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.
253. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003; 22(56): 9030-40.
254. Kim DH, Lee JW. Tumor suppressor p53 regulates bile acid homeostasis via small heterodimer partner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(30): 12266-70.

255. Wang P, Gong G, Wei Z, Li Y. Ethyl pyruvate prevents intestinal inflammatory response and oxidative stress in a rat model of extrahepatic cholestasis. *J Surg Res.* 2010; 160(2): 228-35.
256. Sharma J, Al-Omran A, Parvathy S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 2007; 15(6): 252-9.
257. Meng Z, Wang Y, Wang L, Jin W, Liu N, Pan H, et al. FXR regulates liver repair after CCl<sub>4</sub>-induced toxic injury. *Mol Endocrinol.* 2010; 24(5): 886-97.
258. Tanaka Y, Aleksunes LM, Cui YJ, Klaassen CD. ANIT-induced intrahepatic cholestasis alters hepatobiliary transporter expression via Nrf2-dependent and independent signaling. *Toxicol Sci.* 2009; 108(2): 247-57.
259. Mencarelli A, Distrutti E, Renga B, D'Amore C, Cipriani S, Palladino G, et al. Probiotics modulate intestinal expression of nuclear receptor and provide counter-regulatory signals to inflammation-driven adipose tissue activation. *PLoS One.* 2011; 6(7): e22978.
260. Yao XH, Nguyen KH, Grégoire Nyomba BL. Reversal of glucose intolerance in rat offspring exposed to ethanol before birth through reduction of nuclear skeletal muscle HDAC expression by the bile acid TUDCA. *Physiol Rep.* 2014; 2(12): e12195.
261. Barbier-Torres L, Beraza N, Fernández-Tussy P, Lopitz-Otsoa F, Fernández-Ramos D, Zubiete-Franco I, et al. Histone deacetylase 4 promotes cholestatic liver injury in the absence of prohibitin-1. *Hepatology.* 2015; 62(4): 1237-48.
262. Park SE, Choi HJ, Yee SB, Chung HY, Suh H, Choi YH, et al. Synthetic bile acid derivatives inhibit cell proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2004; 25(1): 231-6.
263. Yee S-B, Yeo WJ, Park BS, Kim JY, Baek SJ, Kim YC, et al. Synthetic chenodeoxycholic acid derivatives inhibit glioblastoma multiform tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2005; 27(3): 653-9.
264. Perez-Ramos P, Olmo N, Turnay J, Lecona E, de Buitrago GG, Portoles MT, et al. Effect of bile acids on butyrate-sensitive and-resistant human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer.* 2005; 53(2): 208-19.
265. 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; 6(8): 681-9.
266. Agarwal DS, Anantaraju HS, Sriram D, Yogeewari P, Nanjegowda SH, Mallu P, et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of bile acid-aromatic/heteroaromatic amides linked via amino acids as anti-cancer agents. *Steroids.* 2016; 107: 87-97.

267. Brossard D, Lechevrel M, El Kihel L, Quesnelle C, Khalid M, Moslemi S, et al. Synthesis and biological evaluation of bile carboxamide derivatives with pro-apoptotic effect on human colon adenocarcinoma cell lines. *Eur J Med Chem.* 2014; 86: 279-90.
268. Horowitz NS, Hua J, Powell MA, Gibb RK, Mutch DG, Herzog TJ. Novel cytotoxic agents from an unexpected source: bile acids and ovarian tumor apoptosis. *Gynecol Oncol.* 2007; 107(2): 344-9.
269. Luo X, Wang J, Gu X, Zhang C, Hu X, Zhang TC. The analysis of the inhibition effect of cholic acid derivatives on the proliferation of breast cancer cells. In: Zhang TC, Ouyang P, Kaplan S, Skarnes B, editors. *Lecture notes in electrical engineering - Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012), Volume 2.* Heidelberg: Springer. 2014; pp. 827-834.
270. Vallejo M, Castro MA, Medarde M, Macias RIR, Romero MR, El-Mir MY, et al. Novel bile acid derivatives (BANBs) with cytostatic activity obtained by conjugation of their side chain with nitrogenated bases. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(9): 1394-404.
271. Xu Y, Luo Q, Lin T, Zeng Z, Wang G, Zeng D, et al. U12, a UDCA derivative, acts as an anti-hepatoma drug lead and inhibits the mTOR/S6K1 and cyclin/CDK complex pathways. *PLoS One.* 2014; 9(12): e113479.
272. Mikov M, Boni N, Al-Salami H, Kuhajda K, Kevrešan S, Goločorbin-Kon S, et al. Bioavailability and hypoglycemic activity of the semisynthetic bile acid salt, sodium 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-12-oxo-5 $\beta$ -cholanate, in healthy and diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2007; 32(1): 7-12.
273. Kuhajda KN, Cvjetičanin SM, Đurendić EA, Sakač MN, Penov-Gaši KM, Kojić VV, et al. Synthesis and cytotoxic activity of a series of bile acid derivatives. *Hem Ind.* 2009; 63(4): 313-8.
274. Singh M, Singh A, Kundu S, Bansal S, Bajaj A. Deciphering the role of charge, hydration, and hydrophobicity for cytotoxic activities and membrane interactions of bile acid based facial amphiphiles. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes.* 2013; 1828(8): 1926-37.
275. Singh M, Bansal S, Kundu S, Bhargava P, Singh A, Motiani RK, et al. Synthesis, structure-activity relationship, and mechanistic investigation of lithocholic acid amphiphiles for colon cancer therapy. *Medchemcomm.* 2015; 6(1): 192-201.
276. Popadyuk II, Markov AV, Salomatina OV, Logashenko EB, Shernyukov AV, Zenkova MA, et al. Synthesis and biological activity of novel deoxycholic acid derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2015; 23(15): 5022-34.

277. Martínez-Augustin O, Sanchez de Medina F. Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(37): 5630-40.
278. Raies AB, Bajic VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. 2016; 6(2): 147-72.
279. Chou CW, Wu MS, Huang WC, Chen CC. HDAC inhibition decreases the expression of EGFR in colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2011; 6(3): e18087.
280. Wilson PM, LaBonte MJ, Martin SC, Kuwahara ST, El-Khoueiry A, Lenz H-J, et al. Sustained inhibition of deacetylases is required for the antitumor activity of the histone deacetylase inhibitors panobinostat and vorinostat in models of colorectal cancer. *Invest New Drugs*. 2013; 31(4): 845-57.
281. Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*. 2003; 63(21): 7291-300.
282. Alzoubi S, Brody L, Rahman S, Mahul-Mellier AL, Mercado N, Ito K, et al. Synergy between histone deacetylase inhibitors and DNAdamaging agents is mediated by histone deacetylase 2 in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(28): 44505-21.
283. Ungerstedt J, Du Y, Zhang H, Nair D, Holmgren A. In vivo redox state of human thioredoxin and redox shift by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(11): 2002-7.
284. Portanova P, Russo T, Pellerito O, Calvaruso G, Giuliano M, Vento R, et al. The role of oxidative stress in apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Int J Oncol*. 2008; 33(2): 325-31.
285. Basu HS, Mahlum A, Mehraein-Ghomi F, Kegel SJ, Guo S, Peters NR, et al. Pretreatment with anti-oxidants sensitizes oxidatively stressed human cancer cells to growth inhibitory effect of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67(3): 705-15.
286. Shiau RJ, Chen KY, Wen YD, Chuang CH, Yeh SL. Genistein and  $\beta$ -carotene enhance the growth-inhibitory effect of trichostatin A in A549 cells. *Eur J Nutr*. 2010; 49(1): 19-25.
287. Abedin SA, Thorne JL, Battaglia S, Maguire O, Hornung LB, Doherty AP, et al. Elevated NCOR1 disrupts a network of dietary-sensing nuclear receptors in bladder cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009; 30(3): 449-56.

288. Mercado N, Thimmulappa R, Thomas CM, Fenwick PS, Chana KK, Donnelly LE, et al. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 406(2): 292-8.
289. Lee TB, Moon YS, Choi CH. Histone H4 deacetylation down-regulates catalase gene expression in doxorubicin-resistant AML subline. *Cell Biol Toxicol.* 2012; 28(1): 11-8.
290. Ko WK, Lee SH, Kim SJ, Jo MJ, Kumar H, Han IB, et al. Anti-inflammatory effects of ursodeoxycholic acid by lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0180673.
291. Oh M, Choi IK, Kwon HJ. Inhibition of histone deacetylase 1 induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(4): 1179-83.
292. Meng J, Zhang HH, Zhou CX, Li C, Zhang F, Mei QB. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via p53-dependent and-independent pathways. *Oncol Rep.* 2012; 28(1): 384-8.
293. Kato T, Shimono Y, Hasegawa M, Jijiwa M, Enomoto A, Asai N, et al. Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress. *Cancer Res.* 2009; 69(8): 3597-604.
294. Habold C, Poehlmann A, Bajbouj K, Hartig R, Korkmaz K, Roessner A, et al. Trichostatin A causes p53 to switch oxidative-damaged colorectal cancer cells from cell cycle arrest into apoptosis. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(2): 607-21.
295. Jeong JB, Lee SH. Protocatechualdehyde possesses anti-cancer activity through downregulating cyclin D1 and HDAC2 in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430(1): 381-6.
296. Jin JS, Tsao TY, Sun PC, Yu CP, Tzao C. SAHA inhibits the growth of colon tumors by decreasing histone deacetylase and the expression of cyclin D1 and survivin. *Pathol Oncol Res.* 2012; 18(3): 713-20.
297. Trau HA, Brännström M, Curry Jr TE, Duffy DM. Prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor A mediate angiogenesis of human ovarian follicular endothelial cells. *Hum Reprod.* 2016; 31(2): 436-44.
298. Jones PL, Shi YB. N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003; 274: 237-68.