



**ИЗВЈЕШТАЈ**  
*о оцјени урађене докторске дисертације*

**1. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

Орган који је именовао комисију: Научно-наставно вијеће Медицинског факултета

Датум именовања комисије: 10.09.2024.године

Број одлуке: 18/3.690/24

Чланови комисије:

1.	Др Нела Рашета Симовић	Редовни професор	Патолошка физиологија
	Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
	Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци		Предсједник
	Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
2.	Др Момир Миков	Редовни професор	Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија
	Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
	Медицински факултет Универзитета у Новом Саду		Члан
	Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
3.	Др Милош Стојиљковић	Редовни професор	Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија
	Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
	Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци		Члан
	Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
4.	Др Оливера Љубоја	Доцент	Педијатрија
	Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
	Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци		Резервни члан
	Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији

## 2. ПОДАЦИ О СТУДЕНТУ

Име, име једног родитеља, презиме: Татјана, Марко, Миливојац

Датум рођења: 28.05.1976. године

Мјесто и држава рођења: Дрвар, Босна и Херцеговина

### 2.1. Студије првог циклуса или основне студије или интегрисане студије

Година уписа:	1995. година	Година завршетка:	2003. година	Просјечна оцјена током студија:	8,67
---------------	-----------------	-------------------	--------------	------------------------------------	------

Универзитет: Универзитет у Бањој Луци

Факултет/и: Медицински факултет

Студијски програм: Медицина

Стечено звање: Доктор медицине

### 2.2. Студије другог циклуса или магистарске студије

Година уписа:	2004	Година завршетка:	2011	Просјечна оцјена током студија:	10
---------------	------	-------------------	------	------------------------------------	----

Универзитет: Универзитет у Бањој Луци

Факултет/и: Медицински факултет

Студијски програм: Биомедицинска истраживања

Назив завршног рада другог циклуса или магистарске тезе, датум одбране: "Утицај мањка витамина Д на промјене нивоа калција и паратиреоидног хормона у постменопаузалној остеопорози". Датум одбране 10.12.2011 године.

Ужа научна област завршног рада другог циклуса или магистарске тезе: Патолошка физиологија

Стечено звање: Магистар медицинских наука

### 2.3. Студије трећег циклуса

Година уписа:	2020. година	Број остварених сада:	ECTS до	Просјечна оцјена током студија:	9,23
---------------	-----------------	--------------------------	------------	------------------------------------	------

Факултет/и: Медицински факултет Бања Лука

Студијски програм: Биомедицинске науке

2.4. Приказ научних и стручних радова студента		
РБ	Подаци о референци	Категорија <sup>1</sup>
1.	Milivojac T, Grabež M, Krivokuća A, Maličević U, Gajić Bojić M, Đukanović Đ, et al. Ursodeoxycholic and chenodeoxycholic bile acids attenuate systemic and liver inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. Mol Cell Biochem. 2024. doi: 10.1007/s11010-024-04994-2.	WoS
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<u>ДА</u> <b>НЕ</b>
РБ	Подаци о референци	Категорија
2.	Mirjanić-Azarić B, Pejić I, Mijić S, Pejčić A, Đurđević-Svraka A, Svraka D, Knežević D, Milivojac T, Bogavac-Stanojević N. The predictive role of biochemical markers on outcomes of severe COVID-19 patients admitted to intensive care unit. J Med Biochem. 2023 Aug 25;42(3):513-523.	WoS
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<u>ДА</u> <b>НЕ</b>
РБ	Подаци о референци	Категорија
3.	Prtina A, Rašeta Simović N, Milivojac T, Vujnić M, Grabež M, Đurić D, Stojiljković MP, Soldat Stanković V, Čolić MJ, Škrbić R. The Effect of Three-Month Vitamin D Supplementation on the Levels of Homocysteine Metabolism Markers and Inflammatory Cytokines in Sera of Psoriatic Patients. Biomolecules.2021;11(12):1865.	WoS
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		ДА <u>НЕ</u>
РБ	Подаци о референци	Категорија
4.	Vujnić M, Rašeta Simović N, Prtina A, Milivojac T, Ristić S. Povezanost metaboličkog sindroma i homocisteinemije kod ihemijskog moždanog udara. Biomedicinska istraživanja. 2021;12(1):160-169	1
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		ДА <u>НЕ</u>

<sup>1</sup> Категорија се односи на оне часописе и научне скупове који су категорисани у складу са Правилником о публикавању научних публикација („Службени гласник РС”, бр. 77/10) и Правилником о мјерилима за остваривање и финансирање Програма одржавања научних скупова („Службени гласник РС”, бр. 102/14) односно припадност рада часописима индексираним у свјетским цитатним базама.

### 3. УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације: ”Утицај жучних киселина на параметре оксидативног стреса, инфламаторног одговора и ендотелне дисфункције изазване токсином *E.coli* код пацова“

Научно поље и ужа научна област: патолошка физиологија

Датум прихватања теме докторске дисертације и бројеви одлука одговарајућих органа чланица и Универзитета.

12.04.2022. године. Одлука Научно-наставног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци о именовању Комисије за оцјену подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације број 18/3.304/2022.

13.05.2022. године. Одлука о усвајању Извјештаја Комисије о оцјени подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације број 18/3.404/2022.

26.05.2022. године. Одлука Сената Универзитета у Бањој Луци о сагласности на Извјештај Комисије о оцјени подобности теме, кандидата и испуњености услова за менторство за израду докторске дисертације број 02/04-3.1034-33/22.

10.09.2024. године. Одлука Научно-наставног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци о именовању Комисије за оцјену урађене докторске дисертације и јавну одбрану број 18/3.690/24.

Дисертација кандидата мр сц.др мед. Татјане Миливојац је написана латиничним писмом, фонтом *Times New Roman* величине слова 12 pt са проредом 1,5 и то на 103 странице, формат А4. Почетни дио дисертације садржи 10 страна које нису нумерисане, а чини их насловна страна дисертације на српском и енглеском језику, резиме на српском и енглеском језику и садржај . Садржај је распоређен у 8 поглавља, и то:

1. Увод (стр. 1-35)
2. Хипотеза истраживања (стр.36)
3. Циљеви истраживања (стр 37)
4. Материјал и методе (стр. 38-45)
5. Резултати (стр. 46-70)
6. Дискусија (стр. 71-84)
7. Закључци (стр. 85)
8. Литература (стр. 86-103)

На крају дисертације налази се 13 нумерисаних страна које садрже

- Листу скраћеница
- Биографију кандидата
- Потписану Изјаву о ауторству
- Потписану Изјаву којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да се докторска дисертација учини јавно доступном
- Потписану Изјаву о аутентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације.

*Addendum* који се налази на крају дисертације садржи научни рад из ове области у којем је кандидат аутор.

Докторска дисертација садржи 26 слика и 4 табеле, а цитирана су 211 литерарна извора.

#### 4. УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У **Уводу** ове докторске дисертације детаљно је описана патогенеза ендотоксемије изазвана липополисахаридом (*Lipopolysaccharide, LPS*), механизми настанка системског инфламаторног одговора (*Systemic inflammatory response syndrome, SIRS*) и синдрома мултиорганске дисфункције (*Multiple organ dysfunction syndrome, MODS*). У бази са тим, детаљно су описани молекуларни механизми и сигнални путеви настанка апоптозе, ендотелне дисфункције и оксидативног стреса. Обзиром да су плућа један од највулнерабилнијих органа у сепси, детаљно су описани механизми настанка акутног оштећења плућа изазваног *LPS*-ом, са посебним освртом на улогу аквапорина у његовом настанку.

Жучне киселине, већ дуго познате по својој улози у варењу и апсорпцији липида и липосолубилних витамина, данас су предмет све већег интересовања због своје шире функционалне улоге у организму. Наиме, оне се све више посматрају као хормонски активне молекуле. Активирањем сигналних путева, путем својих рецептора, жучне киселине учествују у одржавању равнотеже триглицерида, холестерола, глукозе и укупног енергетског метаболизма. Ова улога чини их кључним метаболичким и имунолошким сигналним молекулама, чиме значајно проширују схватање њихове функције изван оквира пробаве. Са тим у вези детаљно је описана њихова структура, метаболизам и улога, са посебним освртом на улогу и ефекте урсодеокихолне (*Ursodeoxycholic acid, UDCA*) и хенодеокихолне киселине (*Chenodeoxycholic acid,*

*CDCA*) на параметре оксидативног стреса, инфламације и апоптозе у *LPS*-индукованој ендотоксемији и акутом оштећењу плућа.

У поглављу **Циљеви истраживања** је јасно наведено:

А) Испитати ефекте *LPS*-а као индуктора ендотоксемије и акутног оштећења пућа на:

1. Нивое проинфламаторних цитокина  $TNF\alpha$ , GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$  и  $IFN\gamma$  у плазми;
2. Биохемијске парамете и маркере оштећења јетре у серуму: глукоза, СК, AST, ALT, LDH, TnI, Hcy;
3. Концентрацију TC, LDL, HDL и TG у серуму;
4. Концентрацију маркера ендотелне дисфункције ICAM-1 у серуму;
5. Прооксидативне маркере  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  у плазми;
6. Маркере антиоксидативне заштите SOD, CAT и GSH у лизату еритроцита;
7. Тјелесну масу, масу јетре и однос масе јетре и тјелесне масе;
8. Патохистолошке промјене у јетри;
9. Експресију транскрипционог фактора NF- $\kappa$ B у јетри;
10. Прооксидативне маркере TBARS и  $NO_2$  у бронхоалвеоларној течности;
11. Маркере антиоксидативне заштите SOD, CAT и GSH у бронхоалвеоларној течности;
12. Патохистолошке промјене у плућима;
13. Експресију транскрипционог фактора NF- $\kappa$ B у плућима;
14. Експресију антиапоптотског маркера BCL-2 и проапоптотских маркера каспаза 3 и BAX у плућима;
15. Експресију аквапорина 1 и аквапорина 5 у плућима.

Б. Испитати ефекте примјене *UDCA* на наведене параметре у ендотоксемији и акутном оштећењу плућа изазваним примјеном *LPS*-а.

В. Испитати ефекте примјене *CDCA* на наведене параметре у ендотоксемији и акутном оштећењу плућа изазваним примјеном *LPS*-а.

У поглављу **Хипотеза истраживања** су јасно наведене хипотезе:

Предтретман са *UDCA* и *CDCA* може утицати на вриједности показатеља инфламације, ендотелне дисфункције, оксидативног стреса и апоптозе у ендотоксемији и акутном

оштећењу плућа изазваним примјеном *LPS*-а на начин да:

1. Смањују нивое проинфламаторних цитокина у плазми.
2. Смањују маркере оштећења јетре.
3. Поправљају липидни профил.
4. Ублажавају ендотелну дисфункцију.
5. Смањују концентрацију прооксиданаса и повећавају ниво антиоксиданаса у плазми и бронхоалвеоларној течности.
6. Смањују експресију транскрипционих фактора код акутног оштећења јетре и плућа.
7. Ублажавају настанак апоптозе ћелија код акутног оштећења плућа.
8. Регулишу експресију аквапорина код акутног оштећења плућа.

### **Сажет преглед литературе и резултата најновијих истраживања**

*LPS* је познат као стимулатор *MAPK* сигналних путева (*Mitogen-activated protein kinase*), који имају кључну улогу у регулацији инфламаторних одговора, а NF- $\kappa$ B служи као основни регулатор у проинфламаторним сигналним путевима, доводећи до производње цитокина који имају основну улогу у промовисању проинфламаторног стања (1). Континуирано праћење динамике лучења проинфламаторних цитокина пружа важне информације о временској регулацији инфламаторног одговора, што може бити од суштинског значаја за разумијевање патофизиологије акутних инфламаторних стања изазваних *LPS*-ом.

Током инфламаторног одговора долази до значајних биохемијских промјена. Присуство *LPS*-а покретањем инфламаторног одговора доводи до значајних промјена у метаболизму глукозе (2). Сепса је често повезана са рабдомиолизом, при чему долази до ослобађања унутарћелијских компоненти мишићног ткива у екстрацелуларни простор (3). У случајевима оштећења изазваног *LPS*-ом, некроза хепатоцита доводи до ослобађања AST, ALT и LDH у крвоток (4). Повећане концентрације TnI специфично су индикативне за оштећење миокарда, а у сепси често постоји повећан ниво срчаног TnI, чак и у одсуству коронарне артеријске болести (5). Повећани нивои Hсу у сепси су повезани са већом стопом морталитета због свог проинфламаторног и прокоагулантног дејства. Повећана концентрација Hсу има значајну улогу и у индукцији оксидативног стреса, с обзиром на то да висок ниво Hсу може стимулисати производњу реактивних врста кисеоника и азота. (6).

Експериментални докази указују да је TNF- $\alpha$  примарни посредник у патогенези SIRS-a, а апоптоза је укључена у крајњи MODS (7). Током сепсе, ендотелне ћелије се трансформишу у проапоптотски, проинфламаторни, проадхезивни и прокоагулантни фенотип. Поред тога, оштећење гликокаликса и поремећен васкуларни тонус ремете микроциркулацијски проток крви, што доводи до оштећења органа и потенцијала за развој MODS-a (8). Присуство оксидативног стреса у ендотоксемији изазваној LPS-ом је већ документовано (9, 10). Хепатомегалија, коју често карактерише повећање тежине јетре, је скоро увијек присутна у сепси, а однос тежине јетре према тјелесној тежини служи као индикатор хепатомегалије и функционише као маркер болести јетре (11). Патофизиологија оштећења јетре у ендотоксемији је повезана са неколико међусобно повезаних инфламаторних и оксидативних путева, укључујући активацију Купферових ћелија, ослобађање цитокина, производњу реактивних врста кисеоника, повећање нивоа адхезионих молекула и инфилтрацију неутрофила, што на крају доводи до оштећења хепатоцита (12).

Један од најчешће погођених органа у сепси су плућа. Резултати експеримената на пацовима у којима је проучавана улога аквапорина 1 и 5 у оштећењу плућа изазваном примјеном LPS-a су указали на смањену регулацију оба ова аквапорина, што доводи до повећања инфламаторних фактора и апоптотских ћелија (13). Смањена регулација аквапорина 5 након примарног оштећења ендотела капилара и алвеоларног епитела доводи до повећане васкуларне пермеабилности и ћелијске инфилтрације (14). У вези са тим, испитиван је ефекат и механизам дејства различитих супстанци на експресију аквапорина у оштећењу плућа, у различитим моделима сепсе (15).

Обзиром на високу стопу смртности, неопходно је дубље разумијевање основних патофизиолошких механизма и развој нових терапијских стратегија у третману сепсе и акутног оштећења органа насталих током сепсе. Нови терапијски приступ могао би бити заснован на улози жучних киселина.

Обимна литература о UDCA указује на њена цитопротективна, имуномодулаторна и антиинфламаторна дејства (16, 17). Сличан ефекат је објављен и за CDCA, али неке студије су сугерисале њену проинфламаторну улогу (18). Недавна истраживања су показала да UDCA има повољан ефекат на дислипидемију и ризик од атеросклерозе због антиоксидативних својстава (19). Показано је да UDCA и CDCA посједују својства слична хормонима у регулисању метаболизма глукозе путем FXR и TGR5 рецептора (2, 20). Доказана је ефикасност UDCA на биохемијске маркере оштећења јетре (21). Такође је



примјeнено да третман са *CDCA* може довести до значајног побољшања липолизе и кориштења глукозе (22). Резултати експерименталне студије на пацовима су показали да предтретман са *UDCA* може значајно да ублажи експресију адхезионих молекула ICAM-1 и VCAM-1 у плућном микроваскуларном ендотелу (23). Резултати више студија су показали да *UDCA* спријечава стварање реактивних врста кисеоника (24). Истраживања су показала да и *CDCA* доводи до активације Nrf2 антиоксидативних путева (25). Показано је да жучне киселине имају и способност активације сигнала за преживљавање ћелије и инхибиције цитотоксичности (26). Утврђено је да је инхибиција апоптозе ћелија један од основних протективних механизма *UDCA* (27). *CDCA* је хидрофобнија жучна киселина од *UDCA*. Показано је да хидрофобне жучне киселине изазивају апоптозу, и већи број истраживања је сугерисао о проапоптотским ефектима *CDCA* (28). Међутим, постоје и истраживања која су указала на њено антиапоптотско дејство (29). Антиинфламаторна и антиоксидативна својства *UDCA* имају улогу у очувању функције јетре, смањењу хепатомегалије и побољшању укупне прогнозе сепсе (21).

Извјештаји о широком спектру заштитних ефеката *UDCA*, која је препозната као најсигурнија међу жучним киселинама, су показани и у акутном оштећењу плућа. Истраживања су показала да *UDCA* код акутног оштећења плућа ублажава патолошке и биохемијске промјене (23), модулира имуни одговор и транспорт епителних јона (30), стимулише клиренс алвеоларне течности у случају плућног едема (31), ефикасно инхибише инфилтрацију инфламаторних ћелија, производњу проинфламаторних цитокина и оксидативни стрес (32). Истраживањем ефикасности *CDCA* у упали дисајних путева је показано да њена примјена у комбинацији са FXR у плућном ткиву смањује озбиљност упалне болести (33). Веза између жучних киселина и аквапорина није потпуно разјашњена, али постоје резултати студија који сугеришу да одређене жучне киселине могу утицати на експресију аквапорина, будући да су они због своје основне улоге у промету воде кључни за формирање жучи, јер вода чини 95% жучи. У том контексту, испитивани су ефекти жучних киселина на аквапорине у холестази, али функција и регулација аквапорина у холестази нису потпуно јасне (34). Показано је и да одређене жучне киселине могу утицати на експресију аквапорина у дебелом цријеву, али утицај жучних киселина на њихову регулацију у цријевима такође није потпуно разјашњен (35).

## Литература:

1. De Jong HK, Van Der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun.* 2010;2(5):422-430.
2. Guo C, Chen WD, Wang YD. TGR5, not only a metabolic regulator. *Front Physiol.* 2016;7:646.
3. Kumar AA, Bhaskar E, Shantha GPS, Swaminathan P, Abraham G. Rhabdomyolysis in community acquired bacterial sepsis - A retrospective cohort study. *PLoS One.* 2009;4(9):e7182.
4. Wu L, Chen Q, Dong B, Geng H, Wang Y, Han D, et al. Resveratrol alleviates lipopolysaccharide-induced liver injury by inducing SIRT1/P62-mediated mitophagy in gibel carp (*Carassius gibelio*). *Front Immunol.* 2023;14:1177140.
5. Tiruvoipati R, Sultana N, Lewis D. Cardiac troponin I does not independently predict mortality in critically ill patients with severe sepsis. *Emerg Med Australas.* 2012;24(2):151-158.
6. Ji J, Feng M, Niu X, Zhang X, Wang Y. Liraglutide blocks the proliferation, migration and phenotypic switching of Homocysteine (Hcy)-induced vascular smooth muscle cells (VSMCs) by suppressing proprotein convertase subtilisin kexin9 (PCSK9)/ low-density lipoprotein receptor (LDLR). *Bioengineered.* 2021;12(1):8057-8066.
7. Xaus J, Nica Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Ló Pez-Soriano F, Argilé JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood.* 2000;95(12):3823-3831.
8. Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial responses in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(3):361-370.
9. Sul OJ, Ra SW. Quercetin Prevents LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating NOX2/ROS/NF-kB in Lung Epithelial Cells. *Molecules.* 2021;26(22):6949.
10. Bao M, Liang M, Sun X, Mohyuddin SG, Chen S, Wen J, et al. Baicalin Alleviates LPS-Induced Oxidative Stress via NF-κB and Nrf2-HO1 Signaling Pathways in IPEC-J2 Cells. *Front Vet Sci.* 2022;8:808233.
11. Padiadpu J, Spooner MH, Li Z, Newman N, Löhr CV, Apperson KD, et al. Early transcriptome changes associated with western diet induced NASH in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice points to activation of hepatic macrophages and an acute phase response. *Front Nutr.* 2023;10:1147602.

12. Dent P, Fang Y, Gupta S, Studer E, Mitchell G, Spiegel S, et al. Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. *Hepatology*. 2005;42(6):1291-1299.
13. Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2002;115(7):963-967.
14. Vassiliou AG, Manitsopoulos N, Kardara M, Maniatis NA, Orfanos SE, Kotanidou A. Differential expression of aquaporins in experimental models of acute lung injury. *In Vivo*. 2017;31(5):885-894.
15. Ba F, Zhou X, Zhang Y, Wu C, Xu S, Wu L, et al. Lipoxin A4 ameliorates alveolar fluid clearance disturbance in lipopolysaccharide-induced lung injury via aquaporin 5 and MAPK signaling pathway. *J Thorac Dis*. 2019;11(8):3599-3608.
16. Ainosah RH, Hagraas MM, Alharthi SE, Saadah OI. The effects of ursodeoxycholic acid on sepsis-induced cholestasis management in an animal model. *J Taibah Univ Med Sci*. 2020;15(4):312-320.
17. Meng F, Kennedy L, Hargrove L, Demieville J, Jones H, Madeka T, et al. Ursodeoxycholate inhibits mast cell activation and reverses biliary injury and fibrosis in *Mdr2*<sup>-/-</sup> mice and human primary sclerosing cholangitis. *Lab Invest*. 2018;98(11):1465-1477.
18. Gong Z, Zhou J, Zhao S, Tian C, Wang P, Xu C, et al. Chenodeoxycholic acid activates NLRP3 inflammasome and contributes to cholestatic liver fibrosis. *Oncotarget*. 2016;7(51):83951-83963.
19. Nadinskaia M, Maevskaya M, Ivashkin V, Kodzoeva K, Pirogova I, Chesnokov E, et al. Ursodeoxycholic acid as a means of preventing atherosclerosis, steatosis and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2021;27(10):959-975.
20. Yu H, Nie R, Shen C. The role of bile acids in regulating glucose and lipid metabolism. *Endocr J*. 2023;70(4):359-374.
21. Festi D, Montagnani M, Azzaroli F, Lodato F, Mazzella G, Roda A, Di Biase AR, Roda E, Simoni P, Colecchia A. Clinical efficacy and effectiveness of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver diseases. *Curr Clin Pharmacol*. 2007;2(2):155-77.
22. Chen M, Zhao Y, Ji H, Li L, Liu H, Wang S, et al. Chenodeoxycholic Acid Improves Embryo Implantation and Metabolic Health through Modulating Gut Microbiota-Host Metabolites Interaction during Early Pregnancy. *Antioxidants (Basel)*. 2023;13(1):8

23. Niu F, Li H, Xu X, Sun L, Gan N, Wang A. Ursodeoxycholic acid protects against lung injury induced by fat embolism syndrome. *J Cell Mol Med.* 2020;24(24):14626-14632.
24. Wang X, Liang G, Zhou Y, Ni B, Zhou X. Ameliorative effect and mechanism of ursodeoxycholic acid on hydrogen peroxide-induced hepatocyte injury. *Sci Rep.* 2024;14(1):4446.
25. Mooranian A, Jones M, Walker D, Ionescu CM, Wagle SR, Kovacevic B et al., Pharmacological Dose-Effect Profiles of Various Concentrations of Humanised Primary Bile Acid in Encapsulated Cells. *Nanomaterials (Basel).* 2022;12(4):647.
26. Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, et al. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology.* 2002;35(4):779-789.
27. Joo SS, Kang HC, Won TJ, Lee DI. Ursodeoxycholic acid inhibits pro-inflammatory repertoires, IL-1 beta and nitric oxide in rat microglia. *Arch Pharm Res.* 2003;26(12):1067-1073.
28. Shen D, Zeng Y, Zhang W, Li Y, Zhu J, Liu Z, et al. Chenodeoxycholic acid inhibits lung adenocarcinoma progression via the integrin  $\alpha 5\beta 1$ /FAK/p53 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2022;923:174925.
29. Hirano F, Haneda M, Makino I. Chenodeoxycholic acid and taurochenodexycolic acid induce anti-apoptotic cIAP-1 expression in human hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(12):1807-1813.
30. Mroz MS, Harvey BJ. Ursodeoxycholic acid inhibits ENaC and Na/K pump activity to restore airway surface liquid height in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Steroids.* 2019;151:108461.
31. Niu F, Xu X, Zhang R, Sun L, Gan N, Wang A. Ursodeoxycholic acid stimulates alveolar fluid clearance in LPS-induced pulmonary edema via ALX/cAMP/PI3K pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20057-20065.
32. He YQ, Deng JL, Zhou CC, Jiang SG, Zhang F, Tao X, et al. Ursodeoxycholic acid alleviates sepsis-induced lung injury by blocking PANoptosis via STING pathway. *Int Immunopharmacol.* 2023;125(Pt B):111161.
33. Shaik FB, Panati K, Narasimha VR, Narala VR. Chenodeoxycholic acid attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in murine model of asthma by inhibiting the TH2 cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463(4):600-605.
34. Liao M, Yu W, Xie Q, Zhang L, Pan Q, Zhao N, et al. Hepatic Aquaporin 10 Expression

Is Downregulated by Activated NFκB Signaling in Human Obstructive Cholestasis. *Gastro Hep Advances*. 2023;2(3):412-423.

35. Yde J, Keely S, Wu Q, Borg JF, Lajczak N, O'Dwyer A, et al. Characterization of AQPs in Mouse, Rat, and Human Colon and Their Selective Regulation by Bile Acids. *Front Nutr*. 2016;3:46.

## 5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА РАДА

У поглављу **Материјал и методе** јасно је представљена методологија истраживања. Модел ендотоксемије пацова је заснован на апликацији липополисахарида *Escherichiae coli* интраперитонеално у дози од 5,5 мг/кг ТМ; моделом који је показао најјаче инфламаторне ефекте на различитим животињским моделима за сепсу. *Wistar* пацови су подијељени у шест експерименталних група, од којих је свака група имала по шест јединки.

**Контролна група:** Пропилен гликол, као vehiculum, 0,5 мЛ/кг ТМ *per os* гастричном сондом током узастопних 10 дана. Десетог дана апликован је физиолошки раствор 1 мЛ/кг ТМ интраперитонеално.

**LPS група:** Пропилен гликол 0,5 мЛ/кг ТМ *per os* гастричном сондом током узастопних 10 дана. Десетог дана апликован је ендотоксин 5,5 мг/кг ТМ интраперитонеално.

**UDCA група:** UDCA 25 мг/кг ТМ *per os* гастричном сондом током узастопних 10 дана. Десетог дана апликован је физиолошки раствор 1 мЛ/кг ТМ интраперитонеално.

**UDCA+LPS група:** UDCA 25 мг/кг ТМ *per os* гастричном сондом током узастопних 10 дана. Десетог дана апликован је ендотоксин 5,5 мг/кг ТМ интраперитонеално.

**CDCA група:** CDCA 25 мг/кг ТМ *per os* гастричном сондом током узастопних 10 дана. Десетог дана апликован је физиолошки раствор 1 мЛ/кг ТМ интраперитонеално.

**CDCA+LPS група:** CDCA 25 мг/кг ТМ *per os* гастричном сондом током узастопних 10 дана. Десетог дана апликован је ендотоксин 5,5 мг/кг ТМ интраперитонеално.

Експерименталне животиње, протоколе и процедуре одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити експерименталних животиња Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци (број 18/1.190-1/22 од 09.03.2022. године). При експериментима су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципа етичности. У оквиру истраживања исти експеримент је спроведен два пута. По завршетку експеримента (10 дана), животиње су жртвоване- 2 сата након примјене LPS-а на крају првог, а 48 сати

након примјене *LPS*-а на крају други пут спроведеног експеримента.

У узорцима серума су одређивани биохемијски параметри: глукоза, креатин киназа (*Creatine kinase, CK*), аспартат аминотрансфераза (*Aspartate transaminase, AST*), аланин аминотрансфераза (*Alanine transaminase, ALT*), лактат дехидрогеназа (*Lactate dehydrogenase, LDH*), тропонин И (*Troponine I, TnI*), хомоцистеин (*Homocysteine, Hcy*), укупни холестерол (*total cholesterol, TC*), холестерол велике густине (*high density lipoprotein, HDL*), холестерол мале густине (*low density lipoprotein, LDL*), триглицериди (*triglycerides, TG*) и растворљиви интрацелуларни адхезиони молекул-1 (*intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1*).

Узорци плазме су се користили за одређивање маркера оксидативног стреса -  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  и нивоа  $TNF-\alpha$ ,  $GM-CSF$ ,  $IL-2$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL-6$  и  $IL-1\beta$ . У узорцима лизата еритроцита су мјерени маркери антиоксидативне заштите:  $SOD$ ,  $CAT$  и  $GSH$ .

У узорцима бронхоалвеоларне течности су одређивани прооксидативни маркери  $TBARS$  и  $NO$  мјерен у форми нитрита ( $NO_2^-$ ) и маркери антиоксидативне заштите:  $SOD$ ,  $CAT$  и  $GSH$ .

Патохистолошка и имунохистохемијска анализа

Након жртвовања животиња изолована су јетра и плућа, стављена у мале пластичне посуде са 10% формалином за хистолошку анализу. Ткиво је фиксирано имерзионим поступком у 4% неутрално пуферисаном формалдехиду у току најмање 24 часа. Исјечци јетре и плућа су обојени хематоксилин-еозин методом.

У имунохистохемијској анализи јетре, квантификација имунопозитивних хепатоцита на  $NF-\kappa B$  је израчуната кориштењем формуле: % позитивно обојених ћелија = (Број позитивно обојених ћелија  $\times$  100) / Укупан број ћелија.

Фотометријска анализа резултата имунохистохемијске анализе ткива плућа обављена је у софтверу за анализу биолошких слика Фиџи (*National Institute of Health Bethesda, USA*). Софтверском фотометријом су одређене површине дијелова ткивне фракције, имунохистохемијски обиљежене ДАБ-ом, као и средње вриједности оптичке густине ДАБ-а, за свих шест анализираних антигена ( $NF-\kappa B$ ,  $BCL-2$ , Каспаза 3,  $BAX$ ,  $AQP1$  и  $AQP5$ ) у позитивном алвеоларном паренхиму. Подаци су представљени као средња

оптичка густина  $\pm$  стандардна девијација за 10 видних поља по пацову.

Пријавом докторске дисертације није планирана анализа бронхоалвеоларне течности и имунохистохемијска анализа плућа, али су додатно урађени у експерименталном протоколу, како би се испитао утицај *UDCA* и *CDCA* на акутно оштећење плућа код пацова третираних *LPS*-ом.

Статистичка анализа података

Статистичка анализа је обављена помоћу софтвера *IBM-SPSS Statistic* верзија 20.0 (*SPSS, Inc., Chicago IL, SAD*). За статистичку обраду резултата кориштене су методе дескриптивне статистике (средња вриједност, стандардна грешка, стандардна девијација и варијанса). Након испитивања расподјеле варијабли *Shapiro-Wilk's* тестом нормалности, коришћени су одговарајући параметријски или непараметријски тестови. За тестирање разлика између група кориштен је ANOVA тест за упоређивање средњих параметријских вриједности, а *Kruskall-Wallis* и *Mann-Witney U* тестови за поређење непараметријских карактеристика између група. *Tukey* и *Bonferonni* тестови су кориштени за *post hoc* анализу. За табеларно и графичко представљање резултата истраживања коришћени су сљедећи софтвери. *MS Office Word 2016, MS Office Excel*.

## 6. РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу резултати јасно су приказани, правилно и прецизно тумачени резултати истраживања.

Резултати примјене *UDCA* и *CDCA* у ендотоксемији изазваној *LPS*-ом

Концентрације TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-2, IFN $\gamma$ , IL-6 и IL-1 $\beta$  су биле значајно повећане 2 сата након апликације нелеталне дозе *LPS*-а ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). *UDCA* и *CDCA*, дате као предтретман орално током 10 дана, показале су антиинфламаторне ефекте који се манифестују значајним смањењем нивоа TNF- $\alpha$ , GM-CSF и IL-1 $\beta$  у ендотоксемији изазваној *LPS*-ом ( $p < 0,05$ ). Само предтретман са *UDCA* је довео до значајног смањења нивоа IL-6 ( $p < 0,05$ ), док је само предтретман са *CDCA* довео до значајног смањења нивоа IFN $\gamma$  ( $p < 0,01$ ).

Повећана активност AST и LDH у групи третираној *LPS*-ом ( $p < 0,01$ ) указује на то да је *LPS* изазвао оштећење јетре. Активност LDH је смањена у *UDCA+LPS* групи у поређењу



са *LPS* групом, указујући да *UDCA* ублажава ефекте *LPS*-а.

Значајно повећање нивоа глукозе у крви, СК, ТnI и Нсу је примјећено код свих пацова третираних *LPS*-ом. *UDCA* и *CDCA* нису утицале на нивое глукозе код пацова третираних *LPS*-ом. *UDCA* је показала значајно смањење нивоа ТnI и СК ( $p < 0,01$ ). И *UDCA* и *CDCA* су показале значајно смањење Нсу ( $p < 0,001$ ).

Уочено је повећање ТС, LDL-С и TG у *LPS* групи ( $p < 0,01$ ) у поређењу са контролном групом. Предтретман са *UDCA* довео је до значајног смањења нивоа TG ( $p < 0,05$ ), а предтретман са *CDCA* је резултирао значајним смањењем нивоа TG и LDL ( $p < 0,05$ ). Ниво ICAM-1 у *LPS* групи је значајно повећан у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ). *UDCA* и *CDCA* су довеле до значајног ублажавања ендотелне дисфункције у ендотоксемији кроз значајно смањење нивоа ICAM-1 ( $p < 0,001$ ).

*UDCA* и *CDCA* су показале антиоксидативне ефекте у ендотоксемији изазваној *LPS*-ом. Нивои  $H_2O_2$  и  $O_2^-$  су значајно повећани у *LPS* групи у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ), а примјена *UDCA* и *CDCA* је значајно смањила ниво  $H_2O_2$  ( $p < 0,001$ ). Само је *UDCA* смањила ниво  $O_2^-$  ( $p < 0,05$ ), док *CDCA* није испољила ефекат на ниво  $O_2^-$ . CAT, GSH и SOD су показали смањење у групи третираној *LPS*-ом ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ ). *UDCA* и *CDCA* су показале своје позитивно дејство на ниво GSH ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ), док је само *UDCA* показала дејство на активност CAT ( $p < 0,01$ ). Ниједна жучна киселина није испољила ефекат на активност SOD.

*LPS* није изазвао значајан губитак тјелесне тежине, али је значајно повећао тежину јетре ( $p < 0,01$ ), а предтретман са *CDCA* је спијечио овај *LPS*-ом индуковани ефекат ( $p < 0,05$ ). *UDCA* и *CDCA* су умањиле промјене у односу TJ/TT у ендотоксемији изазваној *LPS*-ом.

Хистолошка анализа је показала да примјена *UDCA* и *CDCA* ублажава оштећење јетре у ендотоксемији изазваној *LPS*-ом.

Имунохистохемијска анализа јетре пацова је показала значајно повећање имунореактивности NF- $\kappa$ B у хепатоцитима након примјене *LPS*-а у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ). Насупрот томе, пацови претходно третирани са *UDCA* и *CDCA* су показали значајно смањење прекомјерне експресије NF- $\kappa$ B изазване *LPS*-ом у хепатоцитима ( $p < 0,001$ ).

#### Резултати примјене *UDCA* и *CDCA* код акутног оштећења плућа изазваног *LPS*-ом

*LPS* је у BALF-у изазвао смањење нивоа  $NO_2^-$  ( $p < 0,001$ ) у поређењу са контролом, али



примјена *UDCA* и *CDCA* је значајно ублажила овај ефекат ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). *TBARS*, као маркер липидне пероксидације, показао је значајно повећање у *LPS* групи у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ). Примјена *UDCA* и *CDCA* је значајно смањила вриједност *TBARS* ( $p < 0,001$ ). *GSH* и *CAT* су показали смањење у групи третираној *LPS*-ом ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ), а предтретман са *UDCA* и *CDCA* је показао њихов антиоксидативни ефекат повећањем нивоа *GSH* ( $p < 0,01$ ) и активности *CAT* ( $p < 0,05$ ). Ниједна од жучних киселина није утицала на активност *SOD*.

Хистолошка анализа је показала да примјена *UDCA* и *CDCA* ублажава оштећење плућа изазвано *LPS*-ом.

Имунохистохемијска процјена *NF-кВ* у алвеоларном паренхиму пацова показала је значајан пораст експресије и вриједности оптичке густине *NF-кВ* након примјене *LPS*-а, у поређењу са контролном групом ( $p < 0,001$ ). Насупрот томе, пацови који су претходно третиран са *UDCA* и *CDCA* показали су значајно смањење *LPS*-ом индуковане прекомјерне експресије и вриједности оптичке густине *NF-кВ* у алвеоларном паренхиму (обе  $p < 0,001$ ).

Имунохистохемијска анализа је открила значајно смањење *BCL-2* имунореактивности у алвеоларном паренхиму пацова третираних *LPS*-ом, док је повећање имунореактивности примјећено у групама које су третиране са *UDCA* и *CDCA*. Најнижа вриједност оптичке густине *BCL-2* пронађена је у групи третираној *LPS*-ом ( $p < 0,001$ ), док су *UDCA* и *CDCA* значајно повећале оптичку густину *BCL-2*, показујући заштитне ефекте ( $p < 0,001$ ).

Имунохистохемијска анализа проапоптотских маркера каспаза 3 и *BAX* у ткиву плућа пацова показала је значајно повећање имунореактивности и вриједности оптичке густине оба маркера у *LPS* групи ( $p < 0,001$ ). Насупрот томе, *UDCA* и *CDCA* су показале заштитни ефекат значајним смањењем експресије и оптичке густине каспазе 3 и *BAX* (обе  $p < 0,001$ ).

Имунохистохемијска анализа је показала значајно смањење имунореактивности *AQP1* и *AQP5* у алвеоларном паренхиму пацова у *LPS* групи и повећање исте на оба аквапорина у групама које су претходно третиране са *UDCA* и *CDCA*. Додатно, најнижа вриједност оптичке густине *AQP1* и *AQP5* забиљежена је у групи третираној *LPS*-ом ( $p < 0,001$ ), док су *UDCA* и *CDCA* довеле до значајног повећања оптичке густине *AQP1* и *AQP5* у плућном ткиву пацова (обе  $p < 0,001$ ).

Резултати докторске дисертације показују да *UDCA* и *CDCA* имају антиинфламаторни, антиоксидативни, антиапоптотски и заштитни ефекат на јетру и плућа у

експерименталном моделу ендотоксемије и акутног оштећења плућа, изазваних примјеном *LPS*-а. Обе жучне киселине су смањиле ниво проинфламаторних цитокина и ензима јетре, нормализовале липидни статус и смањиле ниво растворљивог ICAM-1 у серуму; смањиле прооксидативне, а повећале антиоксидативне маркере у плазми, ублажиле оштећење јетре и смањиле експресију NF-κB у јетри. Такође, обе киселине су показале антиоксидативни ефекат у BALF-у, ублажиле оштећење плућа, смањиле експресију NF-κB и проапоптотских фактора BAX и каспазе 3, а повећале експресију антиапоптотског BCL-2 и AQP1 и AQP5 у плућима.

## 7. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација мр сц. др мед. Татјане Миливојац под називом ” Утицај жучних киселина на параметре оксидативног стреса, инфламаторног одговора и ендотелне дисфункције изазване токсином *E.coli* код пацова“ је урађена према одобреној пријави, принципима израде научно-истраживачког рада, те представља оригинално и самостално дјело докторанда. Описане методе истраживања су адекватне, задовољавајуће и поуздане, те је њиховом примјеном могуће добити довољно поуздане и валидне резултате.

Докторска дисертација по својој свеобухватности, добијеним резултатима и изнијетим закључцима представља оригинални научни допринос у сагледавању значаја примјене *UDCA* и *CDCA* у ендотоксемији и акутном оштећењу плућа насталом током ендотоксемије.

Експериментални дио истраживања указао је на потенцијално обећавајући нови терапијски приступ, заснован на улози *UDCA* и *CDCA*, у клиничкој пракси у третману пацијената обољелих од сепсе, као и оних са ризиком од оштећења, или већ присутним оштећењем јетре и плућа у сепси, што би могао да буде изузетан практични допринос дисертације. Овај приступ је заснован на улози ових жучних киселина у модулацији оксидативног стреса, инфламаторног одговора и апоптозе. Осим тога, овим истраживањем је први пут показан ефекат наведених жучних киселина на експресију аквапорина код *LPS*-ом изазваног оштећења плућа, која до сада није документована.

Комисија је на основу укупне оцјене докторске дисертације једногласно дала позитивну оцјену о завршеној докторској дисертацији под називом ”Утицај жучних киселина на параметре оксидативног стреса, инфламаторног одговора и ендотелне дисфункције изазване токсином *E.coli* код пацова” др Татјане Миливојац и предлаже Научно-наставном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци да прихвати овај извјештај и омогући кандидату јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

Мјесто и датум:  
Бања Лука , октобар 2024.

---

Др Нела Рашета Симовић, с.р. редовни професор, ужа научна област Патолошка физиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци; Предсједник

---

Др Момир Миков, с.р. редовни професор, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду; Члан

---

Др Милош Стојиљковић, с.р. редовни професор, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци; Члан

---

Др Оливера Љубоја, с.р. доцент, ужа научна област Педијатрија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци; Резервни члан

