



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



**Данка (Мирослав) Соколовић**

**ИСПИТИВАЊЕ ИМУНОМОДУЛАТОРНИХ,  
АНТИОКСИДАТИВНИХ И  
АНТИАПОПТОТИЧКИХ ЕФЕКТА  
МЕЛАТОНИНА ТОКОМ ЕНДОТОКСЕМИЈЕ  
ИЗАЗВАНЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ:  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

Ниш, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Danka (Miroslav) Sokolović**

**THE INVESTIGATION OF THE  
IMMUNOMODULATORY,  
ANTIOXIDANT AND ANTIAPOPTOTIC  
EFFECTS OF MELATONIN DURING  
LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED  
ENDOTOXEMIA: AN EXPERIMENTAL  
STUDY**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2023.

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Доц. др Милан Лазаревић, доцент за УНО Имунологија, Медицински факултет, Универзитет у Нишу
Наслов:	Испитивање имуномодулаторних, антиоксидативних и антиапоптоличких ефеката мелатонина током ендотоксемије изазване липополисахаридом: експериментална студија
Резиме:	<p>Сепса представља оштећење више органа, које је узроковано екстремним инфламаторним одговором домаћина на инфекцију. Најпознатији молекул микроорганизама који изазивају запаљенску реакцију током сепсе је липополисахарид (ЛПС), познат и као ендотоксин, који чини ћелијски зид грам-негативних бактерија. Он својим контактом са Toll-like рецептором 4 имуних ћелија узрокује активацију интрацелуларних каскада, транслокацију NF-κB у једру, чиме се повећава експресија гена који кодирају проинфламаторне цитокине. Мелатонин је хормон који се синтетише у пинеалној жлезди, регулатор је циркардијарног ритма и остварује значајне антиоксидативне и антиинфламаторне ефекте.</p> <p>Циљ истраживања у оквиру докторске дисертације је испитивање имуномодулаторних, антиоксидативних и антиапоптоличких ефеката мелатонина током ендотоксемије изазване липополисахаридом бактерије <i>Escherichie coli</i>.</p> <p>У току експерименталне ендотоксемије изазване ЛПС-ом дошло је до повећања броја неутрофила, смањења броја лимфоцита (због њихове масовне апоптозе), повећања неутрофилно-лимфоцитног односа и тромбоцитопеније (због повећане потрошње тромбоцита), што све указује на стање сепсе. Давање мелатонина током ендотоксемије, нормализује број лимфоцита, као и однос неутрофила и лимфоцита. Ендотоксемија у ткиву јетре довела до је повишења нивоа NF-κB и проинфламаторних цитокина (TNF-α и IL-6), интензивнијег оксидативног стреса (повећањем липидне пероксидације, смањењем нивоа редукованог глутатиона и снижењем ензима антиоксидативне одбране), повишења садржаја Nrf-2 протеина, као и интензивније апоптозе (повишењем активности ДН-аза и каспазе-3). Такође, током ендотоксемије у јетри је дошло и до повећање нивоа азот-мооксида (повећањем активности iNOS и смањењем активности аргиназе) и повећања катаболизма полиамина (повећањем активности полиамин оксидазе).</p>

Неурохормон мелатонин је у ткиву јетре испољио значајне имономодулаторне ефекате, смањивањем активности мијелопероксидазе (који је повезан са инхибицијом инфилтрације неутрофила), снижавањем нивоа проинфламаторних цитокина и азот-моноксида, чиме се значајно превенирало изазвано септичко стање. Мелатонин је у јетри смањио интензитет оксидативног оштећења, показао значајан антиапоптотички ефекат и преусмерио метаболизам Л-аргинина ка биосинтези полиамина.

Резултати овог истраживања су показали да мелатонин има велики хепатопротективни потенцијал током ендотоксемије, те се може препоручити као терапијско средство код болесника са сепсом.

Научна област:

Медицинске науке

Научна  
дисциплина:

Имунологија

Кључне речи:

мелатонин, липополисахарид, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , интерлеукин-6, оксидативни стрес, апоптоза, азот-моноксид, Nrf-2

УДК:

**612.017:577.17(043.3)**

CERIF  
класификација:

**B500, B740, P004**

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

**CC BY-NC-ND**

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: **Dr. Milan Lazarević**, assistant professor, scientific discipline Immunology, Faculty of Medicine, University of Niš

Title: The Investigation of the Immunomodulatory, Antioxidant and Antiapoptotic Effects of Melatonin during Lipopolysaccharide-Induced Endotoxemia: An Experimental Study

Abstract:

Sepsis is damage to multiple organs, which is caused by an extreme inflammatory response of the host to the infection. The most well-known molecule of microorganisms that cause an inflammatory reaction during sepsis is lipopolysaccharide (LPS), also known as endotoxin, which forms the cell wall of gram-negative bacteria. Through its contact with the Toll-like receptor 4 of immune cells, it causes the activation of intracellular cascades, the translocation of NF- $\kappa$ B into the nucleus, which increases the expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines. Melatonin is a hormone synthesized in the pineal gland, it is a regulator of the circadian rhythm and has significant antioxidant and anti-inflammatory effects.

The aim of the research within the doctoral dissertation is to examine the immunomodulatory, antioxidant and antiapoptotic effects of melatonin during endotoxemia caused by *Escherichia coli* lipopolysaccharide.

During experimental endotoxemia caused by LPS, there was an increase in the number of neutrophils, a decrease in the number of lymphocytes (due to their massive apoptosis), an increase in the neutrophil-lymphocyte ratio and thrombocytopenia (due to increased consumption of platelets), all of which indicate a state of sepsis. Administering melatonin during endotoxemia normalizes the number of lymphocytes, as well as the ratio of neutrophils and lymphocytes. Endotoxemia in the liver tissue led to an increase in the level of NF- $\kappa$ B and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6), more intense oxidative stress (by increasing lipid peroxidation, decreasing the level of reduced glutathione and decreasing antioxidant defense enzymes), increasing the content of Nrf-2 protein, as well as more intensive apoptosis (by increasing the activity of DNase and caspase-3). Also, during endotoxemia, there was an increase in the level of nitric oxide in the liver (by increasing the activity of iNOS and decreasing the activity of arginase) and increasing the catabolism of polyamines (by increasing the activity of polyamine oxidase).

The neurohormone melatonin exerted significant immunomodulatory effects in liver tissue, reducing the activity of myeloperoxidase (which is associated with the inhibition of neutrophil infiltration), lowering the level of proinflammatory cytokines and nitric oxide, which significantly prevented the induced septic condition.

In the liver, melatonin reduced the intensity of oxidative damage, showed a significant antiapoptotic effect and redirected L-arginine metabolism towards polyamine biosynthesis. The results of this research showed that melatonin has a great hepatoprotective potential during endotoxemia, and can be used as a therapeutic agent in patients with sepsis.

Scientific Field: Medical sciences

Scientific Discipline: Immunology

Key Words: melatonin, lipopolysaccharide, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , interleukin-6, oxidative stress, apoptosis, nitric oxide, Nrf-2

UDC: **612.017:577.17(043.3)**

CERIF Classification: **B500, B740, P004**

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

# Захвалност

Желела бих да изразим своју најискренију захвалност свима који су на било који начин учествовали и подржали израду моје докторске дисертације.

Доц. др Милану Лазаревићу, ментору, захваљујем се на подршци и поверењу, корисним професионалним саветима и сугестијама током дугогодишњег заједничког рада, без којих израда докторске дисертације не би била могућа.

Проф. др Милошу Костићу, проф. др Тањи Џопалић, проф. др Горану Марјановићу и проф. др Душану Вучетићу на свеобухватној помоћи и корисном саветима при изради моје докторске дисертације.

Сва истраживања у оквиру докторске дисертације су финансијски подржана и реализована захваљујући Заводу за трансфузију крви Ниш, пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије који се реализује на Медицинском факултету у Нишу (број: 451-03-68/2022-14/200113) и пројекту ИДЕЈЕ Фонда за науку Републике Србије (број: 7750154 - НРАТРЕТТМРСВ).

Највећу захвалност дугујем Михаилу и Душану, зато што су веровали у мене, подржавали ме и били мој ослонац.

Аутор

# Садржај

---

Увод.....	1
1. Преглед литературе.....	5
1.1. Сепса.....	5
1.1.1. Дефиниције сепсе.....	5
1.1.2. Епидемиологија, фактори ризика и етиологија сепсе.....	7
1.1.3. Патофизиологија сепсе.....	8
1.1.4. Дијагноза сепсе.....	16
1.1.4.1. Дисфункција органа у сепси.....	16
1.1.5. Микробиолошки узрочници инфекција и сепсе.....	21
1.1.5.1. Грам-позитивне бактерије.....	21
1.1.5.2. Грам-негативне бактерије.....	22
1.1.6. Биомаркери сепсе.....	24
1.1.6.1. Хематолошки маркери и индекси.....	25
1.1.6.2. Лактати.....	26
1.1.6.3. Реактанти акутне фазе.....	27
1.1.6.4. Цитокински маркери сепсе.....	29
1.1.6.5. Остали важни биомаркери сепсе.....	33
1.2. Ендотоксемија и инфламаторни одговор.....	36
1.2.1. Липополисахарид (ендотоксин) – структура.....	36
1.2.2. Ефекти ендотоксина на имуни одговор.....	38
1.3. Оксидативни стрес и ендотоксемија.....	42
1.4. Нуклеарни фактор еритроид 2 као одбрамбени механизам против оксидативног стреса и запаљења током ендотоксемије.....	44
1.5. Апоптоза и ендотоксемија.....	45
1.5.1. Фрагментација ДНК молекула у процесу апоптозе.....	47
1.5.1.1. Алкална ДН-аза (ДН-аза I).....	48
1.5.1.2. Кисела ДН-аза (ДН-аза II).....	48
1.5.2. Оксидативни стрес и апоптоза.....	49
1.6. Метаболизам L-аргинина и полиамина.....	50
1.6.1. Метаболизам L-аргинина.....	51
1.6.1.1. Аргиназа и катаболизам аргинина.....	51
1.6.1.2. Азот-моноксид и цитрулин.....	52
1.6.2. Полиамини.....	53
1.6.2.1. Метаболизам полиамина.....	54
1.6.2.2. Метаболизам полиамина и ендотоксемија.....	57
1.7. Мелатонин.....	57
1.7.1. Биосинтеза, разградња и регулација синтезе мелатонина.....	58



1.7.2. Ефекти мелатонина.....	59
1.7.2.1. Антиоксидативни ефекти мелатонина.....	60
1.7.2.2. Антиапоптотички ефекат мелатонина.....	63
1.7.2.3. Антиинфламаторно дејство мелатонина.....	63
2. Циљ истраживања.....	65
3. Материјал и методе.....	66
3.1. Експерименталне животиње.....	66
3.2. Етички принципи у раду са експерименталним животињама.....	66
3.3. Експериментални модел и експерименталне групе.....	66
3.4. Експериментални протокол.....	67
3.5. Припрема узорака.....	68
3.6. Имунолошке и биохемијске методе.....	68
3.6.1. Хематолошки параметри.....	68
3.6.2. Биохемијски параметри у крвном серуму.....	69
3.6.3. Параметари инфламације у хомогенату ткива јетре.....	69
3.6.3.1. Одређивање активности мијелопероксидазе (МПО) у хомогенату јетре.....	69
3.6.3.2. Одређивање концентрације нуклеарног фактора кара-В (NF-κB), фактора некрозе тумора-α (TNF-α) и интерлеукина-6 (IL-6) у ткиву јетре.....	69
3.6.4. Параметри интензитета оксидативног оштећења у ткиву јетре.....	69
3.6.4.1. Одређивање активности каталазе (CAT) у хомогенату јетре.....	69
3.6.4.2. Одређивање активности ксантин-оксидазе (ХО) у хомогенату јетре.....	70
3.6.4.3. Одређивање концентрације тиобарбитурат реагујућих супстанци (TBARS) у хомогенату јетре.....	70
3.6.4.4. Одређивање нивоа карбонилних група (PCC) у хомогенату јетре.....	70
3.6.4.5. Одређивање концентрације редукованог глутатина (GSH) у хомогенату јетре.....	71
3.6.4.6. Одређивање активности глутатион редуктазе (GR) у хомогенату јетре.....	71
3.6.4.7. Одређивање активности глутатион С-трансферазе (GST) у хомогенату јетре.....	71
3.6.5. Параметри интензитета апоптозе у ткиву јетре.....	71
3.6.5.1. Мерење активности алкалне и киселе ДН-азе у хомогенату јетре.....	71
3.6.5.2. Одређивање активности каспазе-3 у ткиву јетре.....	71
3.6.6. Садржај нуклеарног фактора еритроид 2 (NRF-2) у ткиву јетре.....	72
3.6.7. Параметри метаболизма L-аргинина и полиамина у ткиву јетре.....	72
3.6.7.1. Одређивање концентрације L-цитрулина у хомогенату јетре.....	72
3.6.7.2. Одређивање нивоа нитрата/нитрита (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) у хомогенату јетре.....	72
3.6.7.3. Одређивање активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе (iNOS) у хомогенату јетре.....	73
3.6.7.4. Одређивање активности аргиназе у хомогенату ткива јетре.....	73

3.6.7.5. Одређивање активности ензима полиамин оксидазе (ПАО) и диамин оксидазе (ДАО) у ткиву јетре.....	73
3.6.8. Одређивање концентрације протеина у хомогенату јетре.....	73
3.6.9. Патохистолошке анализе ткива јетре пацова.....	74
3.7. Хемикалије коришћене у истраживању.....	74
3.8. Статистичка обрада података.....	75
4. Резултати рада.....	76
4.1. Ефекти мелатонина, током ендотоксемије изазване ЛПС-ом, на хематолошке параметре и индексе.....	76
4.2. Ефекат мелатонина на биохемијске параметаре у серуму пацова, током ендотоксемије.....	78
4.3. Имуномодулаторни ефекти мелатонина током ендотоксемије.....	79
4.4. Испитивање антиоксидативних ефеката мелатонина током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	82
4.5. Испитивање антиапоптоличких ефеката мелатонина током ендотоксемије.....	84
4.6. Садржај нуклеарног фактора еритроид 2 (Nrf-2) у ткиву јетре током ендотоксемије.....	87
4.7. Метаболизам Л-аргинина и катаболизам полиамина у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	88
4.8. Хистопатолошке анализе ткива јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	89
5. Дискусија.....	93
5.1. Модулаторно дејство мелатонина на хематолошке и биохемијске параметре током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	94
5.2. Модулаторно дејство мелатонина на имунолошке параметре у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	103
5.3. Ефекти примене мелатонина на параметре оксидативног оштећења у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	109
5.4. Модулаторно дејство мелатонина на параметре апоптозе у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	115
5.5. Анализа ефеката ендотоксемије на садржај нуклеарног фактора еритроид 2 у ткиву јетре.....	118
5.6. Анализа ефеката примене мелатонина на метаболизма Л-аргинина и полиамина у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом.....	119
6. Закључак.....	124
7. Литература.....	125
Биографија.....	150

# Листа скраћеница

---

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - супероксидни анјон радикал

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** - синглетни кисеоник

**ABI** - акутна бубрежна инсуфицијенција

**ACAD** (енгл. activated cell autonomous death) - активирана аутономна смрт ћелије

**ACCP** - Амерички колеџ грудних лекара

**ACID** (енгл. activation induced cell death) - ћелијска смрт изазвана активацијом

**AFMK** - N-ацетил-N-формил-5-метокси кинурамин

**ALT** - аланин-аминотрансфераза

**ANOVA** - анализа варијансе

**APR** (енгл. Acute phase reactants) - реагенти акутне фазе

**ARDS** (енгл. Acute Respiratory Distress Syndrome) - акутни респираторни дистрес синдром

**ARE** (енгл. antioxidant response element) - елемент антиоксидативног одговора

**AST** - аспартат-аминотрансфераза

**ATS** - Америчко торакално удружење

**α3OHM** - 3-хидроксимелатонин

**CAD** - каспазом стимулирана ДН-аза

**CAT** - каталаза

**CI** (енгл. cardiac index) - срчани индекс

**COX-2** - циклооксигеназа 2

**CPK** - креатин фосфокиназа

**CRP** - Ц-реактивни протеин

**DAMPs** (енгл. damage associated molecular patterns) - молекулски обрасци оштећења

**DFF** - ДНК фрагментациони фактор

**DISC** (енгл. dead inducing signaling complex) - индукујући сигнални комплекс смрти

**DPNH** - 2,4-динитрофенилхидразин

**E. coli** - *Escherichia coli*

**ELISA** (енг. enzyme-linked immunosorbent assay) - ензимски имуноесеј

**ESICM** - Европско удружење интензивне медицине

**ET-1** - ендотелин-1

**FADD** (енгл. Fas associated death domain) - Fas повезан домен смрти

**FDC** - фоликулска дендритска ћелија

**GABA** - γ-аминобутерна киселина

**GBD** (енгл. The Global Burden of Diseases Study) - студија о глобалном оптерећењу болестима

**GGT** - гама глутамил трансфераза

**GPx** - глутатион пероксидаза

**GR** - глутатион редуктаза

**GSH** - редуковани глутатион

**GSSG** - оксидовани глутатин  
**GST** - глутатион С-трансфераза  
**H&E** - хематоксилин и еозин техника  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - водоник-пероксид  
**Hb** - хемоглобин  
**Hct** - хематокрит  
**HLA-DR** (енгл. human leukocyte antigen) - хумани леукоцитни антиген  
**HSC** - звездасте ћелије јетре  
**ICAD** - инхибитор ДН-азе  
**ICAM-1** - молекул интерцелуларне адхезије 1  
**IDC** - интердигитална дендритска ћелија  
**IFN 1** - интерферон типа 1  
**IFN-β** - интерферон β  
**IL-1** - интерлеукин 1  
**IL-10** - интерлеукин 10  
**IL-4** - интерлеукин 4  
**IL-6** - интерлеукин 6  
**IL-8 (CXCL 8)** - интерлеукин 8  
**INR** (енгл. international normalized ratio) - међународни нормализован однос  
**Keap1** - Kelch ECH асоцирани протеин 1  
**LBP** (енгл. Lipopolysaccharide binding protein) - липополисахаридни везујући протеин  
**LDH** - лактат дехидрогеназа  
**LSEC** - синусоидне ендотелне ћелије јетре  
**MAP** (енгл. mean arterial pressure) - средњи артеријски притисак  
**MDA** - малондиалдехид  
**MODS** (енгл. Multiple Organ Dysfunction Syndrome) - синдром мултиорганске дисфункције  
**MPV** - средња запремина тромбоцита  
**NF-κB** (енгл. nuclear factor - kappa-B) - нуклеарни фактор кара-В  
**NIH** (national Institute of Health) - национални институт за здравље  
**NK** (енгл. natural killer) - урођеноубилачке ћелије  
**NLR** - однос неутрофила и лимфоцита  
**NO<sub>2</sub>** - азот-диоксид  
**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - нитрати/нитрити  
**NOS** - азот-моноксид-синтаза  
**Nrf-2** (енгл. nuclear erythroid 2-related factor 2) - нуклеарни фактор еритроид 2  
**NO** - азот-моноксид  
**ODC** - орнитин декарбоксилаза  
**OH<sup>•</sup>** - хидроксилни радикал  
**ONOO<sup>-</sup>** - пероксинитрит

**OPD** - o-phenylene diamine

**PAMPs** (енгл. pathogen associated molecular patterns) - молекулски обрасци патогена

**PBMC** (енгл. Peripheral Blood Mononuclear Cells) - мононуклеалне ћелије периферне крви

**PCC** - карбонилне групе

**PCT** - прокалцитонин

**PD-1** (енгл. Programmed cell death protein 1) - протеин програмиране ћелијске смрти 1

**PG** - простагландин

**PIRO** (енгл. Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction) - предиспозиција, инфекција, одговор, дисфункција органа

**PLR** - однос тромбоцита и лимфоцита

**PLT** - тромбоцит

**PRRs** (енгл. pattern-recognition receptors) - рецептори за препознавање

**RBC** - еритроцит

**RLR** (енгл. RIG-like receptors) - рецептори слични RIG-y

**SAM** - С-аденозилметионин

**SCCM** - Америчко удружења интензивне медицине

**sCD (14-ST)** - пресеписин

**SCN** (енгл. suprachiasmatic nucleus) - супрахиазматско једро хипоталамуса

**SIRS** (енгл. Systemic Inflammatory Response Syndrome) - системски инфламаторни одговор

**SIS** - Удружења за хируршке инфекције

**SOD** - супероксид-дисмутаза

**SSAT** - N<sup>1</sup>-ацетил трансфераза

**SvO<sub>2</sub>** - сатурација кисеоником мешане венске крви

**SMO** - спермин-оксидаза

**TBA** - тиобарбитурна киселина

**TBARS** - тиобарбитурат реагујуће супстанце

**TCA** - трихлорсирћетна киселина

**TF** - ткивни фактор

**TIR** - Toll/IL-1 рецептор

**TLR** (енгл. Toll like receptors) - рецептори слични Toll-u

**TNF- $\alpha$**  (енгл. tumor necrosis factor  $\alpha$ ) - фактор некрозе тумора- $\alpha$

**TRADD** (енгл. TNF receptor-associated death domain) - домен смрти повезан са TNF рецептором

**WBC** - леукоцит

**XO** - ксантин оксидаза

**AMK** - N-ацетил-5-метокси кинурамин

**АТП** - аденозин трифосфат

**ДАО** - диамин оксидаза

**ДИК** - дисеминована интраваскуларна коагулација

**ДНК** - дезоксирибонуклеинска киселина

**КС** - Kupffer-ове ћелије

**ЛПС** - липополисахарид

**МАО** - моноамино оксидаза

**МПО** - мијелопероксидаза

**МПТ** - пропустљивости митохондријалне мембране

**MT1** (или MTNR1A) - мелатонински рецептор 1

**MT2** (или MTNR1B) - мелатонински рецептор 2

**MT3** - мелатонински рецептор 3

**ПАО** - полиамин оксидаза

**РВА** - реактивне врсте азота

**РВК** - реактивне врсте кисеоника

**РНК** - рибонуклеинска киселина

**СЕ** - седиментација еритроцита

**СЗО** - Светска здравствена организација

**ТРЕМ-1** (енгл. triggering receptor expressed on myeloid cells-1) - активирајући рецептор експримиран на мијелоидним ћелијама-1

**ХО-1** - хем оксигеназа-1

# Индекс слика

---

Слика 1. Рани ћелијски и молекуларни догађаји током инфекције (Seeley i sar, 2012).....	9
Слика 2. Активација имунског одговора у сепси (Schulte i sar, 2013).....	10
Слика 3. Активација сигналне каскаде TLR-а (Botos i sar, 2011).....	11
Слика 4. Патогенеза дисеминиране интраваскуларне коагулације у сепси (Hunt, 2014).....	15
Слика 5. Патогенеза септичког шока (Damjanov i sar, 2000).....	20
Слика 6. Вишеструки сигнални путеви цитокина TNF- $\alpha$ .....	32
Слика 7. Физиолошки инфламаторни одговор и улога укључених молекула који се користе као биомаркери сепсе (Niehues, 2018).....	35
Слика 8. Ћелијски зид грам-негативних бактерија са молекулима липополисахарида на спољашњој мембрани.....	36
Слика 9. Структура липополисахарида.....	37
Слика 10. Активација имуног одговора ЛПС-ом преко CD14/TLR-4/MD-2 рецепторског комплекса.....	38
Слика 11. Механизам стварања реактивних врста кисеоника/азота и механизми антиоксидативне заштите.....	42
Слика 12. Нуклеарни фактор еритроид 2 (Nrf-2) током ендотоксемије (Dai i sar, 2021).....	44
Слика 13. Спољашњи и унутрашњи пут активације процеса апоптозе.....	46
Слика 14. Структура хумане ДН-азе II (MacLea i sar, 2003).....	49
Слика 15. Утицај интрацелуларних РВК на покретање апоптозе (Chandra i sar, 2000).....	50
Слика 16. Метаболизам Л-аргинина и полиамина.....	51
Слика 17. Метаболички путеви Л-аргинина и агматина (Reis i sar, 2000).....	53
Слика 18. Метаболизам аргинина, орнитина, путресцина, спермидина и спермина (Janne i sar, 2004).....	54
Слика 19. Биосинтеза мелатонина.....	58
Слика 20. Рецептори мелатонина (MT1, MT2 и MT3) (Tarocco i sar, 2019).....	60
Слика 21. Процес трансформације мелатонина и његових метаболита у уклањању слободних радикала и хелатизацији метала са промењивом валенцом (Reiter i sar, 2016).....	61
Слика 22. Антиоксидативни ефекти мелатонина (Tiwari i sar, 2022).....	62
Слика 23. Nrf-2/ARE сигнални пут (Zhang i sar, 2014).....	63
Слика 24. Хистоморфолошке промене у ткиву јетре контролних животиња (H&E, 200X)....	90
Слика 25. Хистоморфолошке промене у ткиву јетре контролних животиња третираних мелатонином (H&E, 200X).....	91
Слика 26. Хистоморфолошке промене у ткиву јетре животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (H&E, 200X).....	91
Слика 27. Хистоморфолошке промене у ткиву јетре животиње код којих је изазвана ендотоксемија ЛПС-ом и којима је даван мелатонин (H&E, 200X).....	92

## Индекс табела

<b>Табела 1.</b> Хематолошки параметри и индекси у крви експерименталних животиња.....	76
<b>Табела 2.</b> Тромбоцито-лимфоцитни (PLR) и неутрофилно-лимфоцитни (NLR) однос у крви пацова.....	77
<b>Табела 3.</b> Активности ензима ALT, AST, GGT, амилазе, СРК и LDH у серуму пацова.....	78
<b>Табела 4.</b> Концентрације биохемијских параметара у серуму експерименталних животиња.....	79
<b>Табела 5.</b> Параметри оксидативног оштећења у јетри експерименталних животиња.....	83
<b>Табела 6.</b> Концентрација редукованог глутатина (GSH), као и активност глутатион редуктазе (GR) и глутатион С-трансферазе (GST) у јетри пацова.....	84
<b>Табела 7.</b> Параметри метаболизма Л-аргинина у јетри експерименталних животиња.....	88
<b>Табела 8.</b> Хистоморфолошке промене у ткиву јетре пацова.....	90

## Индекс графикона

<b>Графикон 1.</b> Активност мијелопероксидазе у јетри пацова (OD/ $\mu$ g протеина).....	80
<b>Графикон 2.</b> Ниво нуклеарног фактора кара-В у ткиву јетре лабораторијских животиња (pg/mg протеина).....	80
<b>Графикон 3.</b> Концентрација фактора некрозе тумора- $\alpha$ у ткиву јетре експерименталних животиња (pg/mg протеина).....	81
<b>Графикон 4.</b> Концентрација интерлеукина-6 у ткиву јетре експерименталних животиња (pg/mg протеина).....	82
<b>Графикон 5.</b> Активност алкалне ДН-азе у ткиву јетре експерименталних животиња (U/ $\mu$ g протеина).....	85
<b>Графикон 6.</b> Активност киселе ДН-азе у ткиву јетре експерименталних животиња (U/ $\mu$ g протеина).....	86
<b>Графикон 7.</b> Активност каспазе-3 у ткиву јетре пацова (ng/mg протеина).....	86
<b>Графикон 8.</b> Ниво нуклеарног фактора еритроид 2 у ткиву јетре експерименталних животиња (pg/mg протеина).....	87
<b>Графикон 9 (А и Б).</b> Активност ензима полиамин оксидазе (ПАО) и диамин оксидазе (ДАО) у ткиву јетре експерименталних животиња (U/ $\mu$ g протеина).....	89



## Увод

Сепса је клинички синдром у којој је присутна инфекција и неадекватни системски инфламаторни одговор организма. Она може довести до изузетно тешких стања, септичног шока и мултиорганске дисфункције (Levy i sar, 2003). Пацијенти са сепсом који су примљени у јединицу интензивне неге имају веома висок ризик од смртог исхода (Howell i Davis, 2017; Kaukonen i sar, 2014).

Реч сепса потиче од грчке речи "σηψις" која означава распадање животињских или биљних органских материја. Ова реч се први пут појавила у Хомеровим поемама где је изведена из грчке речи "σηπω" која значи "трулим". У медицинској литератури, ову реч је први употребио Хипократ (460-370 године пре н. е.), и за њега је сепса представљала смрдљиво и биолошко труљење које може да се појави у телу и изазива опасну системску реакцију. Хипократ је покушавао да нађе лек за ово обољење изучавајући антисептична својства алкохола из вина и сирћета (Мајно, 1991).

Следеће значајно употребљавање речи сепса у медицини било је дело Галена (Κλαύδιος Γαληνός, 129 - 216) римског филозофа и лекара и Хипократовог следбеника. Римљани су веровали да је тај синдром последица невидљивих бића која испуштају смрдљиви дим који су звали "miasma" или "miasmata". Захваљујући овим "створењима" заснован је читав систем јавног здравља тог времена који наглашава спровођење хигијене (Funk i sar, 2009).

Било је потребно неколико векова да прође до настанка теорије клица у XIX веку. Претеча ове теорије, једне од најзначајнијих у читавој медицинској науци, била је идеја феничанског лекара, песника, астронома и геолога, Girolama Fracastora (Girolamo Fracastoro, 1478-1553). Он је 1546. године писао о "contagiumvirum" и описао је и три врсте преноса заразе: директним контактом, индиректно преко заражених предмета или из даљине - ваздухом. Претпоставио је и да се инфекција преноси "малим телима" која могу сама да се умножавају.

Antonie van Leeuwenhoek (1632 - 1723) је клице први видео својим очима, преко микроскопа, посматрајући различите узорке, од крви до воде из бунара, цртао је и описивао мале организме које је назвао "animacules". Цртеже које је направио 1674. године, на којима је нацртао те организме као сфере, штапиће и спирале, представљају прве слике кока, бацила и спирохета (Gest, 2004).

Деветнаести век је представљао прекретницу у сазнањима о сепси, о њеном пореклу и преношењу. Доктор Ignaz Semmelweiss (1818 - 1865) мађарски лекар, који је радио је општој болници у Бечу, доказао је да доктори и студенти својим прстима преносе смртоносне отрове са леша на труднице, те је и на својој клиници увео праксу прања руку калцијум хлоридом, пре контакта са пацијентом. Овим поступком је смањио стопу смртности на испод 3%. Чињеница да су "прљаве" руке лекара узрок смрти није наишла на прихватање, тако да је доктор Semmelweiss добио отказ, а на крају је преминуо у психијатријској установи (Funk i sar, 2009).

Велики корак ка развоју асепсе и антисепсе направио је Луј Пастер (Louis Paster 1822 - 1895) који је 1865. године доказао настајање микроорганизама и њихову улогу у ферментацији. Он је такође доказао да у ваздуху постоје микроорганизми и да се путридне течности могу стерилисати загревањем. Касније је утврдио и објавио да су стрептококе изазивачи пуерпералне грознице. Пастеров савременик, енглески хирург Џозеф Листер (Joseph Lister, 1827 - 1912) је применио Пастерове закључке у сопственим истраживањима о инфекцији ране. Ова истраживања су довела до настанка теорије и принципа антисепсе, а први рад на ту тему у коме је описао антисептично лечење отворених прелома карболном киселином (фенол) је Листер објавио у часопису Lancet 1867. године. Прави одјек својих открића доживео је 1877. године кад је увео праксу антисепсе на одељењу хирургије и тиме смањио инциденцу инфекције ране. Robert Koch (1843 - 1910) немачки лекар и микробиолог, се сматра оцем микробиологије и његово најпознатије откриће је бацил туберкулозе, а поље његовог истраживања је толико широко од прављења вештачке културе до дезинфекције и стерилизације.

Како је теорија клица била потпуно прихваћена у медицинској заједници, пажња се затим усмерила ка искорењивању бактерија. Развој антибиотика се најчешће приписује енглеском лекару Александру Флемингу (Alexander Fleming, 1881 - 1955) који је 1929. године свету открио пеницилин. Пре њега, Пол Ерлих (Paul Erlich, 1845 - 1915) је званично први дошао на идеју да постоје материје које могу да убију новооткривене микроорганизме који могу да проузрокују инфекцију. После многобројних покушаја да направи супстанцу која би убијала бактерије, "магични метак" како ју је звао, успео је да направи "salvarsan" који је садржао арсеник, а ускоро је постао стандардна терапија сифилиса.

Појавом антибиотика теорија клица није, међутим, потпуно објаснила патогенезу сепсе, с обзиром да су многи пацијенти са сепсом умрли упркос успешној елиминацији патогена.

Доказано је да главни фактор у патогенези сепсе није клица, него домаћин, тако да је 1991. године настала прва модерна дефиниције сепсе, од кад се овај синдром дефинише као одговор организма на инфекцију. Напретком науке и бољим познавањем патогенезе, микробиологије, имунологије, промене у циркулацији и органској функцији, сама дефиниција сепсе је претрпела још две ревизије.

Иако је данас прецизну учесталост сепсе тешко квантификовати, несумњиво је да је то водећи узрок смрти и онеспособљености у свету. Светска здравствена организација (СЗО) је 2017. године усвојила резолуцију о превенцији, препознавању и лечењу сепсе (Reinhart i sar, 2017).

Научна истраживања у коме су дефинисана дејства циркулишућих медијатора сепсе датирају од краја 19. века. Ипак био је потребан цео век да се докаже да је узрок смрти у стањима акутне бактеријемие неконтролисано стварање медијатора, које започиње у ћелијама домаћина.

Инфламација је стање којим се одржава здравље, али је и потенцијални узрочник иреверзибилних ткивних оштећења. Као и остали физиолошки механизми и инфламација је строго контролисан процес. Контролисање инфламације се постиже протеинима акутне фазе, антиоксидантном заштитом, програмираном ћелијском смрћу (апоптозом), инхибиторним цитокинима и хормонском контролом. Када се хомеостаза у организму наруши, развија се сепса. Настанку сепсе погодује поремећај одбране организма што је случај код траума, неоплазми, опекотина или код пацијената на терапији имуносупресивима и цитостатицима.

Сепса се најчешће јавља када дође до оштећења слузнице дигестивног тракта јер бактерије или њихови производи (токсини) доспевају у циркулацију. Бактерије и њихови производи стимулишу стварање бројних цитокина и других инфламаторних медијатора са проинфламаторним и антиинфламаторним функцијама. Када њихова продукција постане неконтролисана настаје стање септичног шока. Ћелије које се највише оштете у току сепсе и септичног шока су ендотелне ћелије крвних судова.

Сепса представља оштећење више органа, које је узроковано екстремним инфламаторним одговором домаћина на инфекцију, са бројним компликацијама. Клинички је доказано да доводи до око 50% морталитета у јединицама интензивне неге (Rudd i sar, 2020). Најчешћи узрочници сепсе су патогени микроорганизми (60-65%), од тога највише грам-негативне бактерије (*E. coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*), затим грам-позитивне бактерије (*Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Streptococcus pneumoniae*), гљивични узрочници (*Candida albicans*) и вируси (Vincent i sar, 2006).

Након припајања патогена за кожу или мукозу домаћина, он мора прећи епителну баријеру и настанити се у подложном ткиву где ће имуни систем потенцирати његово препознавање и започети последичну запаљенску реакцију.

Најпознатији молекул микроорганизама који изазива запаљенску реакцију током сепсе је липополисахарид (ЛПС), познат и као ендотоксин, који чини 70% ћелијског зида грам-негативних бактерија. Он својим контактом са Toll-like рецептором 4 (TLR-4) имуних ћелија узрокује активацију интрацелуларних каскада, транслокацију нуклеарног фактора кара-В (NF-κB) у једро, чиме се повећава експресија гена који кодирају проинфламаторне цитокине, те се њиховим отпуштањем иницира активација природног имунитета, леукоцита, система комплемената и прокоагулантних механизма који заједничким деловањем доводе до некрозе ћелија. Фактор некрозе тумора-α (TNF-α) појачава експримирање адхезивних молекула на ендотелним ћелијама и активира адхериране неутрофиле, доводећи до интензивног оксидативног стреса, који директно оштећује ендотелне ћелије доводећи до изливања у околно ткиво. Због тога се каже да се системски инфламаторни процес одиграва са обе стране ендотела, и у крвним судовима и у околном ткиву (Van der Poll i Lowry, 1995).

Мелатонин је неурохормон који се синтетише из аминокиселине триптофана, и углавном се ствара у епифизи (његово лучење се дешава у мраку), али и у другим органима (ретина, гастроинтестинални тракт, кожа, тромбоцити, лимфоцити). Он испољава имуномодулаторни и антиоксидативни ефекат, преко својих рецептора (Rosenthal, 1991).

# 1. Преглед литературе

## 1.1. Сепса

Сепса представља оштећење више органа, које је узроковано екстремним инфламаторним одговором домаћина на инфекцију, са бројним компликацијама. Клинички је доказано да доводи до око 50% морталитета у јединицама интензивне неге, а процена је да годишњи број случајева у свету премашује 48 милиона, док је број смртних исхода 11 милиона (Rudd i sar, 2020).

### 1.1.1. Дефиниције сепсе

Пошто сепса није једна болест, него синдром, њена дефиниција представља израз за скуп симптома који прате инфекцију. Хетерогеност сепсе представља велики проблем у њеном препознавању и лечењу. Због тога је прецизна дефиниција сепсе неопходна за постављање дијагнозе, спровођење адекватне терапије и квантификовање резултата терапијских интервенција (Matzinger, 1994). Иако постоји много биомаркера, не постоји стандардни дијагностички тест за сепсу, а не постоји златни стандард или патохистолошки супстрат који би дао сигурну дијагнозу. Стога, дефиниција као и дијагноза поставља се кад се испуне одређени критеријуми карактеристични за овај синдром.

Сепса је углавном била израз за бактеријемiju и шок, док је прва дефиниција настала у Чикагу 1991. године на састанку Америчког колеџа грудних лекара (АССР) и америчког Удружења интензивне медицине (SCCM). Тада је донешена одлука да се дијагноза сепсе поставља кад постоји сумња на инфекцију (или верификовану инфекцију) и системски одговор организма на исту. Постојање системског инфламаторног одговора организма се утврђује ако су позитивна два или више SIRS критеријума (SIRS, енгл. systemic inflammatory response syndrome), а то су: температура  $< 36^{\circ}\text{C}$  или  $> 38^{\circ}\text{C}$ ; срчана фреквенца  $> 90/\text{мин}$ ; фреквенца дисања  $> 20/\text{мин}$  или  $\text{PaCO}_2 < 32\text{ mmHg}$  (4,2 kPa); број леукоцита  $> 12000/\mu\text{l}$  или  $< 4000/\mu\text{l}$  или  $> 10\%$  несегментираних неутрофила (Kaukonen i sar, 2015).

Тешка сепса се дефинисала сепсом узрокованом органском дисфункцијом или ткивном хипоперфузијом, са следећим критеријумима: сепсом узрокованом хипотензијом (сistolни крвни притисак мањи од 90 mmHg, пад систолног притиска за 40 mmHg од почетног, средњи артеријски притисак мањи од 70 mmHg или систолни притисак који је за мање од две стандардне девијације нижи од нормалног за дату старосну доба, у одсуству других узрока хипотензије), повишене вредности лактата, поремећај менталног статуса, диуреза испод 0,5 ml/kg/h,  $PaO_2/FiO_2 < 250$  кад пнеумонија није извор инфекције или  $PaO_2/FiO_2 < 200$  кад јесте, креатинин  $> 176,8 \mu\text{mol/l}$ , билирубин  $> 34,2 \mu\text{mol/l}$ , број тромбоцита  $< 100000/\mu\text{l}$  и коагулопатија где је  $INR > 1,5$  (INR, енгл. international normalized ratio). За категоризацију органске дисфункције или ткивне хипоперфузије довољно је да било који од наведених критеријума буде испуњен. Септични шок представља подгрупу тешке сепсе и дефинише се хипотензијом узрокованом сепсом упркос адекватној надокнади течности (Levy i sar, 2003).

Највећи проблем ове прве дефиниције сепсе је била ниска специфичност уз високу сензитивност. Пацијент који је акутно болестан има позитивне SIRS критеријуме, међутим, неки пацијенти са сепсом немају SIRS критеријуме. Због тога је у Вашингтону 2001. године, одржан састанак, од стране ACCP, SCCM, Европског удружења интензивне медицине (ESICM), Америчког торакалног удружења (ATS) и Удружења за хируршке инфекције (SIS), на коме су усаглашени нови критеријуми за сепсу. Сепса је дефинисана као инфекција плус неки од следећих критеријума и то: хипертермија или хипотермија, тахикардија или тахипнеја, измењен ментални статус, едем или позитиван биланс течности, хипергликемија (у одсуству дијабетес мелитуса), леукоцитоза или леукопенија, повишен С-реактивни протеин (CRP) или прокалцитонин, хипотензија, ниска сатурација кисеоником мешане венске крви ( $SvO_2$ ) или високог срчаног индекса, хипоксија, олигурија или повишен креатинин, поремећај коагулације, илеус, тромбоцитопенија, повишен билирубин, повећање лактата и споро капиларно пуњење (Levy i sar, 2003). Концепт сепсе, тешке сепсе и септичног шока је остао непромењен, а предложен је и нови модел за градацију тежине инфекције и назван PIRO (енгл. Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction) систем. PIRO систем је модел за одређивање стадијума инфекције и праћење реакције домаћина на основу фактора за које се претпоставља да утичу на исход (Levy, 2004). Нова дефиниција је имала већу сензитивност, али мању специфичност, и PIRO систем није заживео, а још јаснији сигнал да је потребна промена била је чињеница да је мали проценат лекара прецизно користио тачну дефиницију сепсе (Poeze i sar, 2004; Zhao i sar, 2012).

Године 2014. састали су се експерти интензивне медицине са циљем да се ажурира дефиниција и клинички критеријуми за идентификацију пацијената у сепси. Фебруара 2016. године објављена је нова дефиниције сепсе (Singer *et al.*, 2016). Предложено је да дефиниција сепсе буде "органска дисфункција опасна по живот услед неадекватног одговора домаћина на инфекцију", а за критеријум користи SOFA скор (SOFA, енгл. Sequential Organ Failure Assessment), а да се термин "тешка сепса" више не користи, с обзиром да је органска дисфункција неопходна за постављање дијагнозе (Seymour *et al.*, 2016). За постављање дијагнозе сепсе користе се специфични клинички критеријуми - промена вредности SOFA скорa  $\geq 2$  изнад почетних вредности, а за постављање дијагнозе септичког шока - потреба за вазопресорима ради одржавања средњег артеријског притиска (MAP, енгл. mean arterial pressure)  $\geq 65$  mmHg и концентрација лактата у серуму  $> 2$  mmol/l у одсуству хиповолемије. Са циљем раног препознавања пацијената са сумњом на инфекцију, за које је вероватно да ће доћи до лошег исхода у виду продуженог лечења у јединици интензивне неге и смрти, развијен је нови, поједностављен метод, назван брза SOFA (qSOFA - quick SOFA) који се састоји само од три параметра: тахипнеа - брзина дисања  $\geq 22$ /мин, хипотензија - систолни притисак  $< 100$  mmHg и промена менталног стања - GCS  $< 15$  (GCS, енгл. Glasgow Coma Scale). Највећи разлог за критику ове најновије дефиниције сепсе, стоји у бојазни од повећаног ризика да се употребом нових критеријума не пропусти рано препознавање пацијената са сепсом и тиме одложи адекватно лечење све док се не развије органска дисфункција (Simpson, 2016). Сам SOFA скор је развијен као процена акутне дисфункције органа и не узима у обзир промене код пацијената са хроничном, од раније присутном дисфункцијом, а при томе је и тешко примењив у земљама у развоју (Sprung *et al.*, 2016).

### 1.1.2. Епидемиологија, фактори ризика и етиологија сепсе

Сепса не представља обољење него синдром који је последица инфекције и она може бити и крајњи догађај у некој другој, терминалној болести, што такође утиче на њену учесталост, морталитет и превенцију. Сходно томе, стопа смртности од сепсе се креће се од 15% до 56% (Bauer *et al.*, 2020). Студија о глобалном оптерећењу болестима (GBD, енгл. The Global Burden of Diseases Study), спроведена на светском нивоу, у коју је било укључено 195 држава у периоду од 1990 до 2017. године дала је најприближнији увид у актуелну епидемиологију сепсе (James *et al.*, 2018). Процењено је да је у 2017. години широм света било око 48,9 милиона случајева сепсе и око 11 милиона смртних случајева повезаних са сепсом, што представља 19,7% умрлих те године.

Такође анализом опсервационих студија из Европе, Аустралије и Северне Америке процењено је да је у наведеним деловима света морталитет од септичног шока од 34,7 до 37,3% (Vincent *et al.*, 2019).

Према GBD, учесталост сепсе је опала за 37%, а смртност се смањила за 52,8% од 1990 до 2017. године. Учесталост сепсе и смртност варира у односу на регион, а највећи проблем представља у субсахарској Африци, Океанији, јужној Азији, источној Азији и југоисточној Азији, где смртност у одређеним регијама износи и до 80% од свих оболелих, у односу на 20-40% у развијеним државама (Rudd *et al.*, 2020). Доказано је да је учесталост сепсе већа у економски неразвијенијим државама и међу људима са ниским приходима. Доказано је да је чешћа хоспитализација због сепсе него услед инфаркта миокарда и možданог удара заједно, са стопом болничког морталитета од 25% до 30%, и то чини трећину до половину смртних случајева у болници. Ове чињенице указују да све ово представља не само медицински, него и озбиљан економски проблем. У Србији, према подацима из GBD годишње од сепсе оболи око 24000 становника, док је око 8000 смртних случајева годишње повезано са сепсом (Rudd *et al.*, 2020). Доказано је да је ризик од појаве сепсе код небелачке популације двоструко већи од беле популације, при чему се највећи ризик појављује код особа црне расе (Barnato *et al.*, 2008). Од сепсе чешће оболевају мушкарци него жене. Нарушен имунитет је важан фактор ризика, било због узимања имunosупресивних лекова, малигних болести, неухрањености или стреса (услед операције, трауме или опекотине) (Angus *et al.*, 2001). Најосетљивија група за развој сепсе су млади и старији људи, јер је њихов имунолошки систем слабији (Biehl *et al.*, 2016).

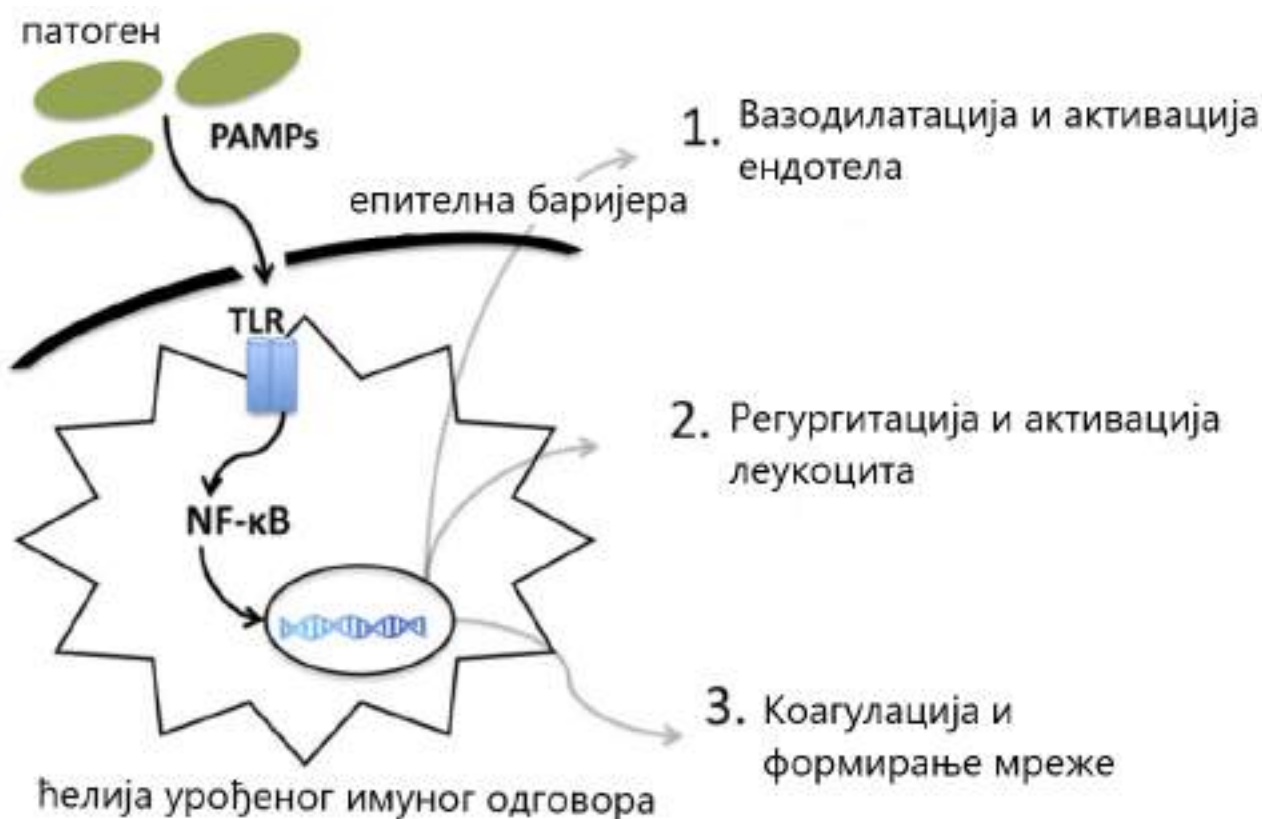
Доказано је да сепса најчешће настаје у болници, центрима за негу оболелих или старих и ван болнице (70-80% случајева) (Sessoni *et al.*, 2018). Најчешће место инфекције која доводи до сепсе су: плућа (60-67%), абдомен (18-22%), крвоток (15%), бубрежни и генитоуринарни тракт (14%). У извештају SOAP студије (Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients - SOAP), објављеном 2006. године, која је спроведена у јединицама интензивне неге у 24 европске државе, однос грам-позитивних и грам-негативних изолата код пацијената са сепсом је био практично подједнак (Vincent *et al.*, 2006).

### 1.1.3. Патофизиологија сепсе

Сепса је синдром у коме долази до поремећеног одговора домаћина на инфекцију, са појавом две супротне реакције, проинфламаторне и антиинфламаторне. Овај дисрегулисани имунолошки одговор на инфекцију повезан је са неуспехом да се поврати хомеостаза, постаје штетан за домаћина, а оштећују се и ћелије (Van der Poll *et al.*, 2017).



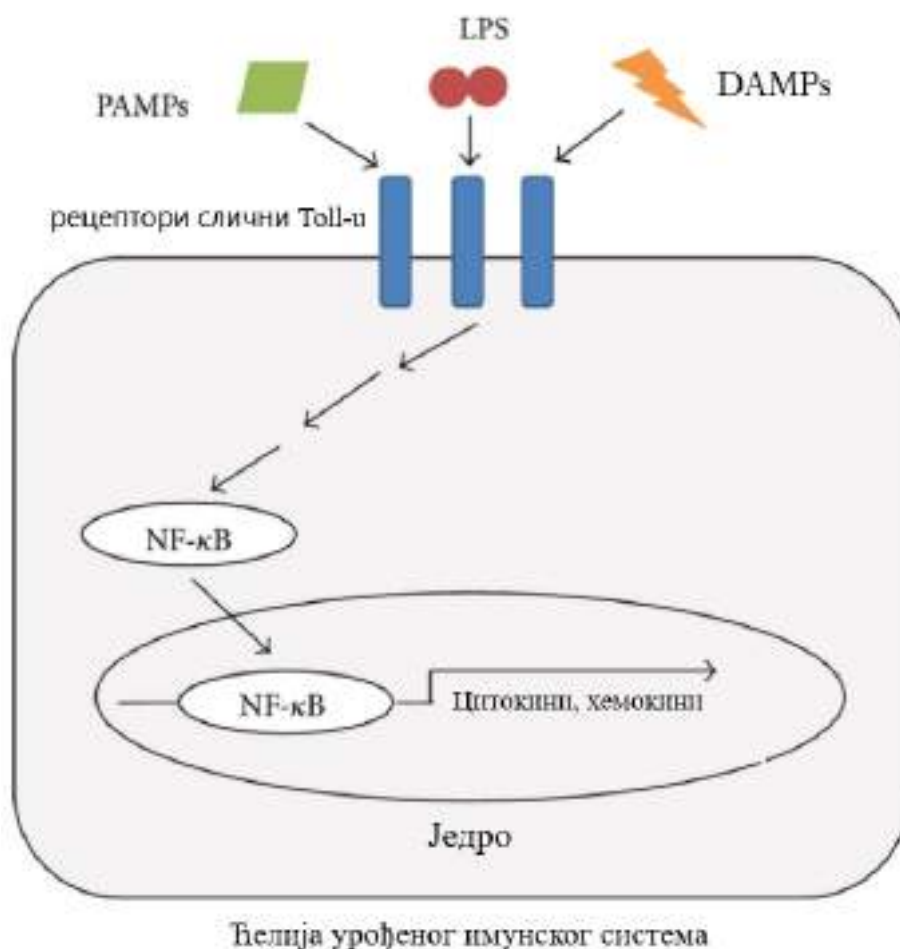
Урођени имунски одговор је прва линија одбране од микроорганизама и он започиње активацијом ћелија урођене имуности као што су: моноцити/макрофаги, дендритичне ћелије, неутрофили, урођеноубилачке (NK, енгл. natural killer) ћелије и ћелије ендотела. На површини ових ћелија, али и на ћелијама стечене имуности, се налазе рецептори за препознавање (PRRs, енгл. pattern-recognition receptors) (Слика 1). PRR препознају саставне делове микроорганизама (липополисахарид ћелијског зида грам-негативних бактерија, пептидогликане грам-позитивних бактерија, РНК вируса, липопептид флагела), који се називају молекулским обрасцима патогена (PAMPs, енгл. pathogen associated molecular patterns) (Takeuchi i Akira, 2010). Такође, урођени имунски систем препознаје и унутрашње сигнале опасности, молекуле које се ослобађају из оштећеног или некротичног ткива, такозване алармине (молекулски обрасци оштећења) - DAMPs (енгл. damage associated molecular patterns). Алармини могу изазвати локалну проинфламаторну реакцију привлачењем ефекторских ћелија, али и повећавањем проинфламаторног одговора. Примери алармина су: heat shock protein (HSP), фибриноген, С100 протеин, хијалуронска киселина и HMGB1 (енгл. high mobility group box 1 protein). У клиничким истраживањима показано је да тежина сепсе корелира са повишеним вредностима DAMPs-а у серуму (Matzinger, 2002).



Слика 1. Рани ћелијски и молекуларни догађаји током инфекције (Seeley i sar, 2012).

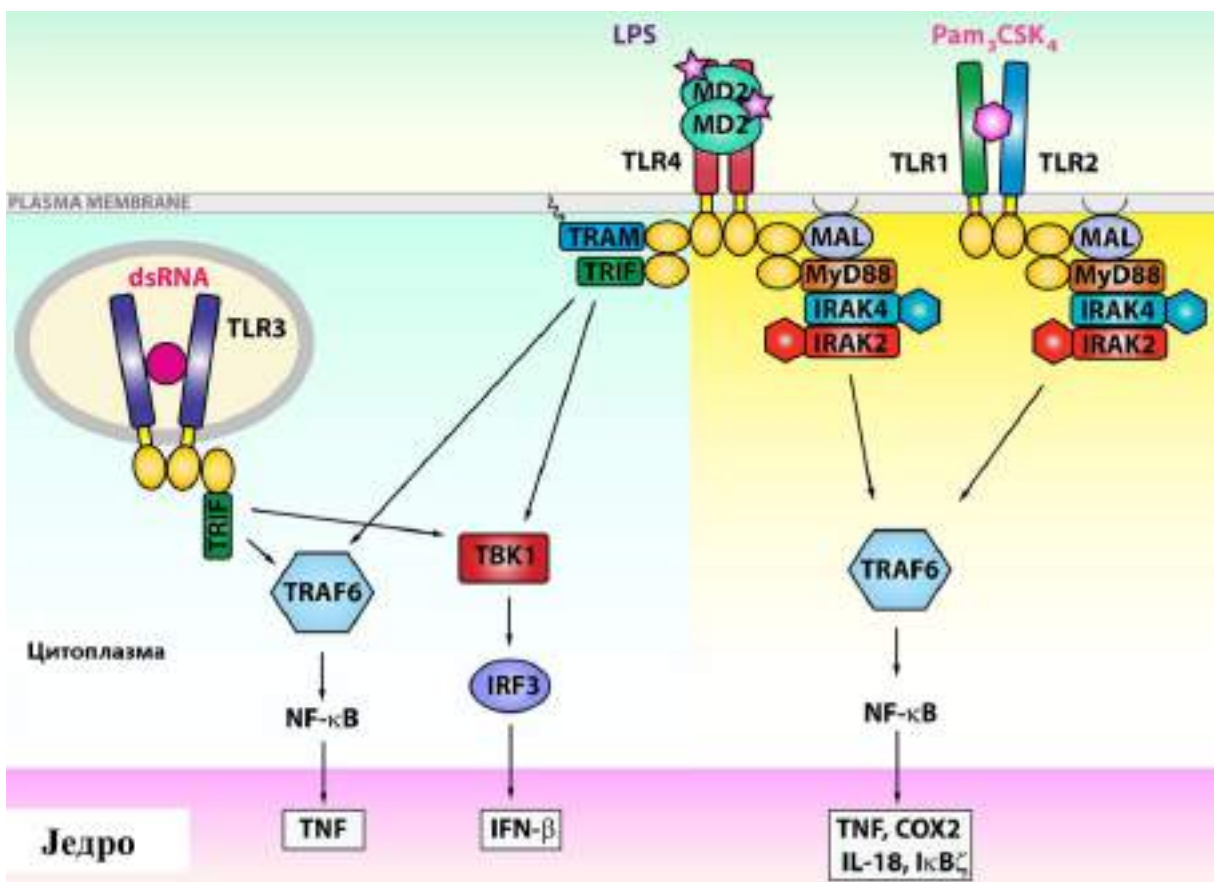
Постоје 4 типа PRRs и они се деле на мембранске и цитоплазматске. Мембрански рецептори су рецептори слични Toll-у (TLR, енгл. Toll like receptors) и лектински рецептори, а цитоплазматски рецептори су рецептори слични NOD-у (NLR, енгл. NOD like receptors) и рецептори слични RIG-у (RLR, енгл. RIG-like receptors). У патофизиологији сепсе најзначајнију улогу има Toll like receptors 4 (TLR-4).

Везивање PAMPs и DAMPs за Toll like receptors 4 доводи до активације ћелија урођене имуности (моноцита/макрофага, дендритичних ћелија), покреће се сигнална каскада која активира транскрипционе факторе, пре свега нуклеарног фактора кара-В (NF- $\kappa$ B). Активација NF- $\kappa$ B промовише транскрипцију гена за секрецију медијатора инфламаторног одговора (проинфламаторних цитокина, хемокина, алармина) (Слика 2). Активација NOD рецептора може довести до формирања великих протеинских комплекса који се називају инфлазоми, који учествују у продукцији кључних цитокина (IL-1 $\beta$  и IL-18) као и каспаза које имају велику улогу у апоптози. Активирани ћелије урођене имуности лаче проинфламаторне медијаторе и то: фактор некрозе тумора- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлеукин 1 (IL-1) и интерлеукин 6 (IL-6), интерферон тип 1 (IFN 1), хемокине и простагландине (Stearns-Kurosawa i sar, 2011).



Слика 2. Активација имунског одговора у сепси (Schulte i sar, 2013).

Toll-like рецептори (TLR) се могу поделити у две групе зависно од ћелијске локализације и препознавању одређених лиганда. Постоје TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 и они су смештени на површини ћелија и препознају углавном липидне, липопротеинске и протеинске компоненте ћелијске мембране микроорганизама. TLR 3, 7, 8, 9 се налазе унутарћелијски у ендоплазматском ретикулуму, ендозому, лизозому и ендолизозому где препознају нуклеинске киселине микроорганизама. TLR-4 препознаје липополисахарид (ЛПС), TLR-2 заједно са TLR-1 или TLR-6 препознаје липопротеине, пептидогликане, зимосан, манан и tGPI муцин (Kawai i Akira, 2010) (Слика 3). TLR-5 препознаје бактеријске флагелине, TLR-10 заједно са TLR-2 препознаје лиганде *Listeria Monocytognes*. TLR-10 препознаје вирус грипа типа А (Lee i sar, 2014). Унутарћелијски TLR препознају нуклеинске киселине бактерија и вируса као и сопствене нуклеинске киселине у аутоимуним болестима (Blasius i Beutler, 2010). TLR-3 препознаје вирусну dsRNA, малу интерферирајућу РНК те властиту РНК насталу оштећењем ћелија (Bernard i sar, 2012). TLR-7 препознаје једноланчану РНК из вируса, TLR-8 препознаје вирусну и бактеријску РНК (Guiducci i sar, 2013). TLR-9 препознаје бактеријску и вирусну ДНК и хемозоин из *Plasmodium-falciparum*.



Слика 3. Активација сигналне каскаде TLR-а (Botos i sar, 2011).

Без обзира на врсту TLR-а и везаног лиганда њихово повезивање активира сигналну каскаду која изазива индукцију гена укључених у одбрану домаћина од микроорганизама. TLR се састоји од ванћелијског дела (ектодомена) са понављајућим аминокиселинским секвенцама богатим леуцином одговорним за препознавање PAMP/DAMP молекула. На њега се наставља трансмембрански део и цитоплазматски домен назван Toll/IL-1 рецептор (TIR) која покреће сигналну каскаду. Ектодомен има облик потковице путем које се TLR повезује са PAMP/DAMP молекулама као хомодимер или хетеродимер заједно са корецептором као помоћним молекулом (Botos i sar, 2011).

Након везања лиганда, TLR доживљава конформациске промене које осигуравају усмеравање TIR-domain-containing адаптацијских молекула према TIR домену TLR-а. Четири адаптацијска молекула који учествују у том процесу су: 1) MyD88 (енгл. myeloid differentiation) 2) TIR-associated protein (TIRAP)/MyD88-adaptor-like (MAL), 3) TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- $\beta$  (TRIF)/TIR-domain-containing molecule 1 (TICAM1) и 4) TRIF-related adaptor molecule (TRAM) (Yamamoto i sar, 2002). Активација сигналне каскаде и стварање проинфламаторних цитокина и интерферона типа 1, одвија се највећим делом путем MyD88 и TRIF адаптацијских молекула (Слика 3).

Првобитна секреција проинфламаторних цитокина може да се заустави на локалном нивоу, или да изазове системски инфламаторни одговор, који поред активације урођеног и стеченог имунитета, паралелно и истовремено укључује и активацију других хомеостазних система: система комплемента, оштећење ендотела, покретање коагулационе каскаде и покретање неуроендокриног одговора на системску инфламацију. С обзиром на чињеницу да је ланац патогенетских догађаја у сепси покренут секрецијом проинфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), први покушаји терапијског деловања били су усмерени ка антиинфламаторној терапији и покушају заустављања самооштећења организма узрокованог "олујом" проинфламаторних цитокина (Skirecki i sar, 2012). Након првобитних охрабрујућих резултата забележених на анималним моделима, покушана је примена антагониста TNF- $\alpha$  и IL-1, блокада TLR-4 и антагониста ендотоксина на хуманој популацији. Спроведено је неколико клиничких истраживања која нису дала задовољавајуће резултате. Напротив, неке студије чак бележе лошији исход код болесника лечених антиинфламаторном терапијом, у односу на пацијенте код којих није примењивана имуномодулаторна терапија. Код малог броја процената пацијената забележен је позитиван ефекат антиинфламаторне терапије на ток и исход болести (Hotchkiss i sar, 2013).

Са циљем покушаја проналаска одговора на питање зашто антиинфламаторна терапија није дала очекиване резултате настављена су истраживања патогенезе сепсе и постављена је нова теорија о сепси као стању у којем је за висок морталитет одговорна пре свега имуносупресија, која настаје као последица патогенетских збивања током сепсе. Иако извршен проценат пацијената умире у првих неколико дана од почетка болести од последица "олује" проинфламаторних цитокина, велики проценат болесника (> 70%) преживи ту првобитну доминацију проинфламаторног одговора.

Код ових пацијената забележене су честе суперинфекције опортунистичким бактеријама и гљивицама (*Enterococcus spp*, *Acinetobacter spp*, *Stenotrophomonas spp*, *Candida spp*) као и реактивација вируса из групе херпес вируса код претходно имунокомпетентних особа, што је доказ да је имуни систем код таквих болесника супримиран. Даљи докази за сепсу као новонастало "стање имунопарализе" код имунокомпетентних особа долазе од открића да поједини септични болесници губе способност реаговања по типу касне преосетљивости. Још један доказ пружају студије које показују да код 76,6% оболелих од сепсе, септично стање није санирано. Описано "стање имунопарализе" може се објаснити пре свега повишеним концентрацијама антиинфламаторних цитокина, интерлеукина-10 (IL-10), интерлеукина-4 (IL-4), солубилних TNF рецептора, IL-1 рецептора, повишеним нивоима адреналина и кортизола, активацијом антиоксидативног одговора и смањеном експресијом HLA-DR (енгл. human leukocyte antigen). Ову теорију поткрепљује и тзв. стање хибернације ћелија имуног система те масивна апоптоза лимфоцита која је такође доказана у студијама на пацијентима умрлим од сепсе. Супресија имунитета описана је на готово свим ћелијама које партиципирају у имуном одговору (Torgersen i sar, 2009).

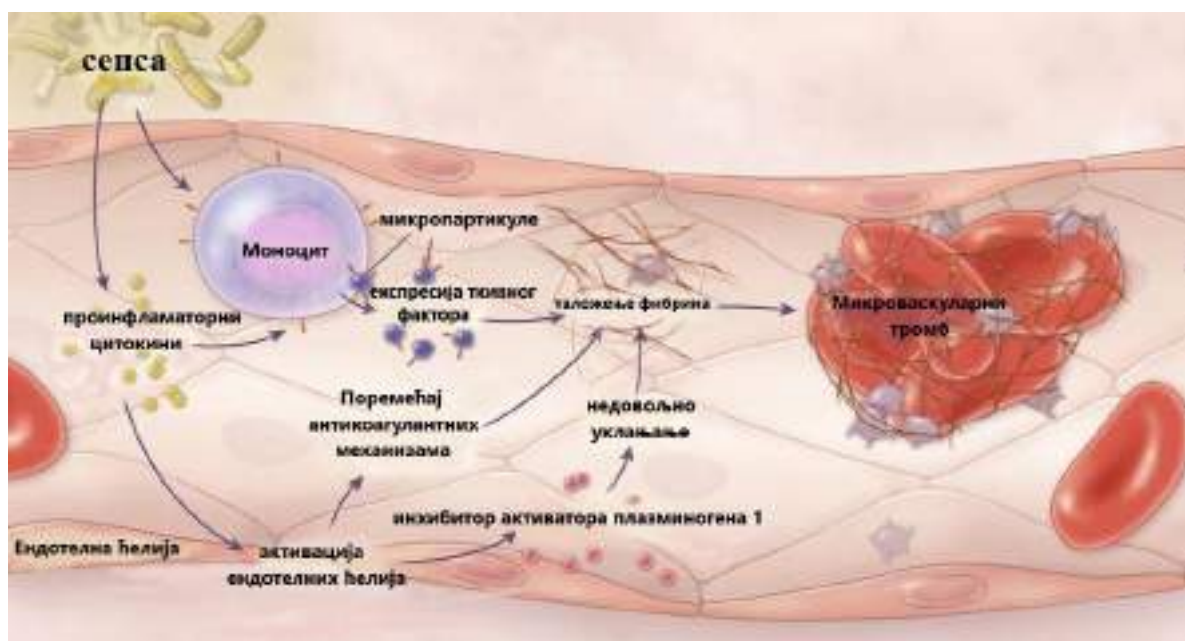
Првобитне студије на анималним моделима претпоставиле су да секреција антиинфламаторних цитокина следи након проинфламаторне фазе, међутим каснија испитивања показала су да се код људи тај процес дешава практично истовремено. Ипак, истраживачи су сагласни са чињеницом да је иницијално након контакта са патогеном доминантан проинфламаторни одговор који се карактерише симптомима повишене температуре, шока и убрзаним метаболизмом. Интензитет проинфламаторног и антиинфламаторног одговора као и њихов међусобни однос зависи од узраста болесника, присутних коморбидитета, нутритивног статуса, као и патогености и вируленцији узрочника. Стога данашње теорије патогенезе сепсе истичу потребу за индивидуалним приступом пацијенту оболелом од сепсе, у смислу прецизних анализа које би одредиле да ли се болесников имуни систем у датом тренутку налази у фази хиперинфламације или имуносупресије, ради даље одлуке о терапијском приступу.

Значајну улогу у патофизиологији сепсе имају цитокини, који функционишу као гласници између ћелија, стимулишу раст и диференцијацију ћелија, репарацију и ремоделирају ткива, као и регулишу имуни одговор. Ћелије урођеног имуног одговора које продукују ефекторне цитокине су моноцити, дендритске ћелије и NK ћелије, док цитокине у стеченом имунском одговору продукују активирани Т лимфоцити (Burkovskiy i sar, 2013). Поједини проинфламаторни цитокини (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) и њихови рецептори изазивају рани, неконтролисани хиперинфламаторни одговор у сепси, такозвану "citoкинску олују", а након контакта са микроорганизмима осим проинфламаторних ослобађају се и антиинфламаторни цитокини (Gardlund i sar, 1995). Код пацијената са сепсом постоји различити citoкински профил, па је и исход сепсе другачији (Hotchkiss i sar, 2013). Проинфламаторни медијатори делују на ендотелне ћелије крвних судова доводећи до вазодилатације, повећане пропустљивости и накупљања неутрофила у ткивима.

Важан део инфламаторне реакције је активација компоненти комплемента, тако да је повећан ниво C3a и C5a, а C5a се везује на рецепторе који се налазе на површини неутрофила и ендотелних ћелија доводећи до ослобађања реактивних врста кисеоника (РВК) и хемотаксичног одговора са привлачењем неутрофила (Bosmann i Ward, 2013). У сепси проинфламаторни цитокини активирају каскаду коагулације доводећи до различитих манифестација које могу варирати од благог прокоагулантног стања до дисеминоване интраваскуларне коагулације (ДИК) која се карактерише микротромбозама и крварењем. Такође, долази до таложења фибрина преко три основна пута: конверзијом антитромбина у тромбин активацијом ткивног фактора (TF), дисфункцијом антикоагулантних механизма и смањењем разградње фибрина због инхибиције фибринолитичког система (King i sar, 2014). Сматра се да је хиперкоагуабилно стање у сепси изазвано ослобађањем ткивног фактора на површини моноцита, полиморфонуклеарних и ендотелних ћелија. Ткивни фактор доводи до системске активације коагулационе каскаде, он је кључни фактор у конверзији протромбина у тромбин, доводи до активације тромбоцита и формирања тромбоцитних тромбова. Протеин Ц и антитромбин као главни антикоагулантни механизам не могу да регулишу овај поремећај коагулације у сепси што је иначе могуће у нормалним условима. Активирани протеин Ц има антикоагулантне ефекте тиме што доводи до деградације фактора Va и VIIIa. Такође има и јак антиинфламаторни ефекат јер инхибише проинфламаторне цитокине (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6) (Vincent, 2012). Он супримира и везивање лимфоцита и неутрофила за ендотел.

Код пацијената са сепсом смањена је концентрација протеина Ц и тромбомодулина што омогућава да каскада коагулације буде нерегулисана. Осим прокоагулантног стања у сепси виђамо и инхибицију фибринолизе што нас све доводи до зачараног круга микроваскуларних тромбоза (Слика 4).

Сматра се да је сепса системски, проинфламаторни одговор на инфекцију, коју прати фаза имуносупресије коју карактеришу лимфопенија и секундарне инфекције. Пацијенти који преживе рану сепсу често развијају инфекције микроорганизмима који нису типично патогени код домаћина. Протеин PD-1 (енгл. Programmed cell death protein 1) и IL-7 се сматрају важним у основи инхибиције функције Т-лимфоцита, стога су повезани са касном сепсом и имуносупресијом код пацијената који преживе рану сепсу (Venet i Monneret, 2018). Ова запажања довела су до хипотезе да рано хиперинфламаторно стање еволуира до хипоинфламаторног стања са значајном имуносупресијом. Новија сазнања сугеришу да се проинфламаторна и фаза имуносупресије могу десити истовремено, при чему интензитет оба одговора зависи од више фактора (генетике и коморбидитета домаћина, као и од вируленције и концентрације патогена) (Seymour i Rosengart, 2015).



Слика 4. Патогенеза дисеминиране интраваскуларне коагулације у сепси (Hunt, 2014).

Сепса омета дистрибуцију протока крви у органским системима путем вазодилатације и поремећаја микроциркулације, јер долази до редукције густине капилара и повећања перфузије што резултује повећањем дифузионе дистанце за кисеоник и смањене оксигенације ћелија. Дисфункција микроциркулације повезана је са лошијим исходима сепсе (De Backer i sar, 2014). До исхемије ткива може доћи услед неусклађености између испоруке кисеоника и потребе ткива на системском и локалном нивоу.

Такође, дисфункција митохондрија може бити узрок неадекватне екстракције кисеоника од стране ткива, упркос адекватној испоруци, и то се назива цитопатска хипоксија. Сматра се да су ткивна хипоксија, дисфункција митохондрија и апоптоза најважнији фактори за органску дисфункцију изазвану сепсом (Singer, 2014). Сепса се одликује апоптозом ћелија стечене и урођене имуности. Доказано је да је код пацијената са сепсом апоптоза узрок смањења броја лимфоцита у слезини и лимфном ткиву црева (Hotchkiss i sar, 1999), а нарочито Б-лимфоцита и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита у слезини, што је удружено са лимфопенијом (Hotchkiss i sar, 2002). Код пацијената са дужим трајањем сепсе губитак Б-лимфоцита и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита је израженији. Такође је доказано да у слезини септичних пацијената долази и до изразитог губитка фоликулских дендритских ћелија (FDC), као и до смањеног броја интердигиталних дендритских ћелија (IDC). Губитак FDC и IDC објашњава губитак Б-лимфоцита и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита који се виђа у сепси, мада је могуће и обрнуто, да губитак лимфоцита доводи до губитка дендритских ћелија (Hotchkiss i sar, 2002).

#### 1.1.4. Дијагноза сепсе

Сепсу дефинишемо као животно угрожавајућу органску дисфункцију узроковану дисрегулираним одговором домаћина на инфекцију, а клиничка слика може бити врло варијабилна. Неконтролирана запаљенска реакција може довести до кардиоваскуларних, аутономних, ендокриних, метаболичких и неуролошких поремећајима, што се често завршава смрћу. Због свега наведеног веома је важно рано посумњати, идентификовати и применити антимикуробну и супортивну терапију. Зато је осмишљен алгоритам брзе процене потенцијално септичних пацијената qSOFA скалом, како би се проценила потреба за даљом дијагностиком и терапијом, а њу чине три критеријума: 1) респираторна фреквенција (већа од 22/мин), 2) измењено стање свести и 3) систолни крвни притисак (мањи од 100 mmHg). У случају да су два од три критерија позитивна, поставља се радна дијагноза сепсе и након узимања материјала за микробиолошку, имунолошку и биохемијску дијагностику, одмах се започиње терапија (Shankar-Hari i sar, 2016).

##### 1.1.4.1. Дисфункција органа у сепси

Са новом дефиницијом сепсе, дисфункција органа је неопходна за постављање дијагнозе и представља приоритет у лечењу, а једна је од кључних ствари за њено рано препознавање.



Синдром мултиорганске дисфункције (MODS, енгл. Multiple Organ Dysfunction Syndrome) је хипометаболично стање са нарушеним имунитетом и клиничким и биохемијским знацима поремећене функције органских система који настаје услед акутне повреде или обољења. За постављање дијагнозе MODS-а, довољно је да два органска система покажу поремећај функције у акутној болести (Boomer i sar, 2011). Тренутно постоје два основна концепта која објашњавају настанак MODS синдрома. Према првом, ендотелна дисфункција, смањена деформабилност еритроцита и микроваскуларна тромбоза доводе до оштећења микроциркулације са последицом нехомогеног капиларног протока, ткивне хипоксије и органске дисфункције (Mizock, 2009). Према другом, оксидативни стрес доводи до митохондријалне дисфункције и смањене синтезе аденозин трифосфата (АТФ), са последичном редуцијом потрошње кисеоника. Опоравак органа након неколико дана или недеља углавном представља правило код преживелих пацијената. Дисфункција органа је заштитни механизам и пролазно стање успоравања или заустављања ћелијског метаболизма, које је конципирано да спаси тело од даљих оштећења, а погођени органи се практично "искључе" током акутне фазе болести, али поврате функционалност када болест престане (Singer i sar, 2004). Ова хипотеза представља потпору модерном приступу лечења критично оболелих у виду избегавања сувишних и потенцијално штетних интервенција (Mehta i Gill, 2019).

*Неуролошка дисфункција и сепси.* Септична стања могу бити праћена можданом дисфункцијом, поремећајем осе хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда, адреналном инсуфицијенцијом и аутономном дисфункцијом. Поремећаји мождане функције честа су појава код септичних пацијената који се карактеришу поремећајем стања свести, у виду енцефалопатије, делиријума или коме (Zumla, 2010). Такође могућа је појава тремора, као и лезија можданих живаца са сензорним или моторичким испадима. Код тешког стања сепсе, нарушено је нормално лучење хормона хипофизе (хормона раста, АСТН и пролактина). У неким случајевима, поремећај се може налазити и у самој надбубрежној жлезди (инфекција *N. meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Citomegalovirusa*, *Histoplasma capsulatum*) што резултира примарну адреналну инсуфицијенцију (разарање жлезде, крварење и последична некроза). Попратни симптоми резултат су смањеног одговора на стрес, и то су умор, слабост, губитак апетита, мучнина, повраћање, пролив или затвор, хипогликемија, хипонатремија, хиперкалиемија, хиперкалцемија, хиповолемија, хипотензија, шок као и губитак пазушне и пубичне длакавости.

Аутономна дисфункција у току сепсе може бити централна и периферна, и она се карактерише губитком способност организма да контролише срчани ритам, крвни притисак и респираторне покрете, доводећи до смањења наведених функција (Oral i DePalo, 2000).

*Кардиоваскуларна дисфункција у сепси.* Врло јаким и многобројним вазодилатацијским механизмима током запањеног одговора у сепси, развија се хипотензија која онемогућава стално допремање ткива крвљу. Као реакција на смањену артерио-венску разлику притисака, симпатички одговор стимулише рад срца те узрокује тахикардију, а у поодмаклим стадијима сепсе депресију миокарда и брадикардију. Код ових пацијената запајају се периферни знаци смањеног тонуса крвних судова, што се испољава топлом и црвеном кожом, а у каснијим стадијима због венске стазе може се јавити и периферна цијаноза. У периферној крви се запажа лактатна ацидоза, а кад су вредности лактата веће од 2 mmol/L, све указује на развој септичког шока.

Пацијената са сепсом (10-70%) имају ослабљену функцију миокарда у виду сниженог срчаног индекса (CI) (енгл. cardiac index), снижене систолне функције, поремећаја дијастолне функције и дилатације леве коморе (L'Heureux i sar, 2020). Ово стање се назива септичном кардиомиопатијом и представља пролазну дисфункцију срчане функције код пацијената са сепсом, без исхемије миокарда као узорочног фактора (Beesley i sar, 2018). Инсуфицијенција десне коморе се верификује код чак 50% пацијената са сепсом, поготово кад је удружена са ARDS-ом (енгл. Acute Respiratory Distress Syndrome). Инфламаторни одговор у сепси утиче на тонус крвних судова узрокујући вазоплегију, као и губитак интегритета ендотелно-капиларне баријере, што има за последицу губитак интраваскуларног волумена и смањења притисака пуњења срца, што последично, утиче на допремање кисеоника периферним ткивима и усмерава лечење критично оболелог пацијента (Burgdorff i sar, 2018).

Такође једна од првих промена је појава тромбоцитопеније (мање од  $150 \times 10^9/L$ ), али се спонтана крварења почињу јављати тек када њихов број падне испод  $20 \times 10^9/L$ . Попратне појаве укључују пораст фибриногена и његових распадних продуката (Д-димера).

*Респираторна дисфункција у сепси.* Иницијални одговор респираторног система у сепси карактерише се тахипнејом, а често и диспнејом. Хипервентилација као одговор на створену ацидозу услед недостатка ткивне перфузије може бити толико јака да болесник има респираторну алкалозу. У терминалним стадијумима сепсе, респираторна функција се испољава у виду агоналног дисања и инхибиције централних респираторних центара као и замором респираторних мишића. Због хиперинфламаторног одговора и неутрофилне инфилтрације у алвеоле и алвеоларним едемом развија се ARDS.

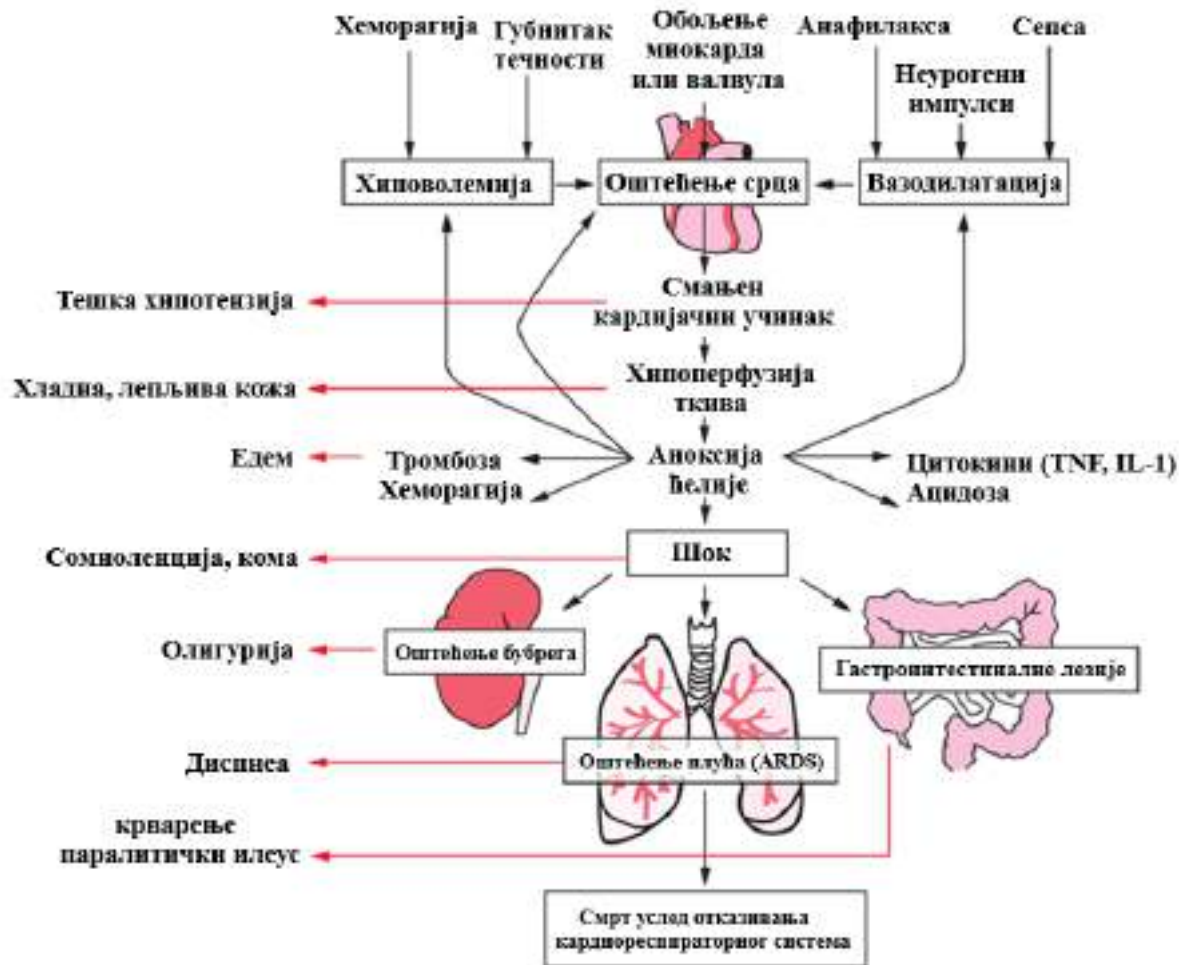
Иако се морталитет у ARDS-у значајно смањио последњих година и даље износи и до 50% код пацијената у септичном шоку, а доминантни узрок смртог исхода је мултиорганска дисфункција, а не хипоксија (Kallet i sar, 2019). Често ARDS представља најранију манифестацију мултиорганске дисфункције у сепси, са клиничким знацима у виду тахипнее, отежаног дисања са употребом помоћне респираторне мускулатуре и осталим карактеристикама које прате акутну респираторну инсуфицијенцију са хипоксијом и/или хиперкапнијом и потребом за механичком вентилацијом (Kress i sar, 2009).

*Ренална дисфункција у сепси.* У току сепсе развија се акутна бубрежна инсуфицијенција (АВ) и то код 22-53% пацијената и са значајним морталитетом (38-41%) (Gordon i sar, 2016). Акутна бубрежна инсуфицијенција током сепсе, доводи до смањеног излучивања урина, и повишеног нивоа креатинина у крви. Пацијенти који развију АВ као последицу сепсе имају 50% веће шансе за смртним исходом од пацијената који имају АВ без сепсе (Bellomo i sar, 2017).

*Оштећење јетре у сепси.* Она се карактерише порастом јетрених биомаркера (аспартат-аминотрансферазе-AST, аланин-аминотрансферазе-ALT и билирубина) и коагулопатијом која се препознаје тромбоцитопенијом, хиперкоагулабилношћу и ретко израженим ДИК-ом. Клинички се манифестује као хипоксични хепатитис или сепсом индукована холестаза (Nessler i sar, 2012).

*Гастроинтестинална дисфункција у сепси.* Сепса се манифестује повећаном пермеабилношћу црева са транслокацијом бактерија и ендотоксина, ослабљеном перисталтиком и илеусом, исхемијом црева, панкреатитисом, акалкулозним холециститисом и стрес улкусима (Naak i Wiersinga, 2017).

*Сепса и кожа.* Кожне манифестације код особа са сепсом могу се појавити у два облика. Прво, оне могу бити лоциране на месту инокулације узрочног микроорганизма у кожу кад се обично виде као пустуле или красте, а друго могу да се узрочници хематогено расеју и тада се појављују у облику петехија, пустула, *ecthyme gangrenosum* или целулитиса. Кожне промене могу бити и поседица тромбозе малих и средњих крвних судова, а најчешће се уочавају на крајњој периферији, на шакама и стопалима (Zumla, 2010).



Слика 5. Патогенеза септичког шока (Damjanov i sar, 2001).

Септички шок је најтежа манифестација сепсе, и он се одликује смањењем системског васкуларног отпора што ће условити и слабу прерасподелу протока у микроциркулацији. Септички шок почиње инфекцијским жариштем које ослобађа микроорганизме и/или један или више медијатора у крвоток који могу изазвати вазоконстрикцију, али и вазодилатацију.

Периферна вазодилатација узрокује смањење системског васкуларног отпора и велики минутни волумен срца. Лоша дистрибуција крвотока уз присутну лактичну ацидозу и поред великог минутног волумена срца и дејства медијатора, доводи до претеране вазодилатације у једном, али и вазоконстрикције у другом делу васкуларног система. Иако је минутни волумен срца висок, ипак долази до дилатације комора и смањења њихове функције те наступа стање депресије миокарда. Ако септички шок потраје, заједничко деловање периферних васкуларних абнормалности и депресија миокарда узрокује леталан исход (50% случајева). Смрт је последица хипотензије и/или вишеструког престанка рада органа (бубрега, јетре, плућа и мозга) (Solomkin i sar, 2010) (Слика 5).

### 1.1.5. Микробиолошки узрочници инфекција и сепсе

Бактеријску флору усне дупље и једњака највише чине *Streptococcus viridans*, *Neisseria spp.* и *Peptostreptococcus spp.* У желуцу, деловањем желудачне киселине, број бактерија је значајно смањен тако да се може рећи да се жeluдац, дуоденум и јејунум сматрају стерилним за бактеријску флору. Микрофлору дебелог црева чине анаеробне (96-99%) и аеробне (1-4%) бактерије. На састав бактеријске флоре имају утицај старост, начин исхране, фактори дигестивне функције (киселост желудачног сока, присуство жучних киселина, цревни мотилитет) као и стање имунолошког система. Унутрашњост интестиналног система представља погодну средину за развој и живот бактерија. Ту бактерије добијају потребне материје за синтезу ћелијских компоненти, тако да се ћелијске деобе одвијају сваких 20-30 минута. Бактеријски егзотоксини имају токсично дејство јер испољавају ефекте на коагулациони систем и делују протеолитички на ензиме ћелијског зида.

Сепсу и септички шок, углавном изазивају грам-негативне бактерије својим липополисахаридима, затим пептидогликани грам-позитивних и грам-негативних бактерија као и егзотоксини грам-позитивних микроорганизама, као што су хемолизини, стрептолизини, леукоцидини, колагеназе, хијалуронидазе, хепариназе, стрептокиназе, коагулазе, лецитиназе. У 30-80% случајева сепсу изазивају грам-негативне, а у 5-24% случајева грам-позитивне бактерије. Студија Angusа i van der Pollа (2013) показала је да сепсу у 62% случајева изазивају грам-негативне бактерије, у 47% случајева узрочник је грам-позитивна бактерија, а у 19% придружена је и гљивична инфекција. Све распрострањенија примена инвазивних процедура у процесу лечења и имуносупресивна терапија доприносе њиховом расту.

#### 1.1.5.1. Грам-позитивне бактерије

Грам-позитивне бактерије имају двослојну цитоплазматску мембрану са ригидним ћелијским зидом који омогућава преживљавање у осмотски неадекватној средини. Већина патогених грам-позитивних бактерија има додатне екстрацелуларне структуре, полисахаридне капсуле и површинске протеине неопходне за преживљавање у крви.

Стафилококе, од којих је *Staphylococcus aureus* најважнији патоген код људи, најчешће колонизирају кожу, ако се кожа и слузница повреде (нпр. хируршким захватом или траумом) и могу проћи и размножити се у поткожном ткиву узрокујући типично локализован површински апсцес. Међутим, ако продру у лимфу и крв наступа стафилококна бактеријемија и могући септички шок.

Стрептококе су грам-позитивне бактерије сферичног до овоидног облика које стварају карактеристичне ланце приликом раста и углавном су анаероби. Водећи узрочник бактеријске сепсе и менингитиса из ове врсте је стрептокок групе Б, док су ентерококи врло запажени као узрочници интраабдоминалних и уринарних инфекција.

*Clostridium spp.* је једина грам-позитивна анаеробна врста бактерија, која ствара споре. Егзотоксини клостридија доводе до фулминантне ткивне деструкције, а као посебно токсични се издвајају лецитиназе  $\alpha$  токсина и  $\gamma$  токсин који директно оштећују ћелијске мембране. Алфа токсин лизира еритроците и доводи до секундарне анемије и хемоглобинурије. Слично делују и колагеназе које уништавају колагена влакна и спречавају процес локализације инфекцијског фокуса. Услед деструкције капиларне мреже настају многобројне тромбозе са последичним престанком ткивне перфузије.

### 1.1.5.2. Грам-негативне бактерије

Грамм-негативне бактерије поседују цитоплазматску мембрану и пептидогликански слој (нешто редукован). За ове бактерије карактеристична је спољашња мембрана која је ковалентно везана за тетрапептиде пептидогликанског слоја липопотеина. Ови протеини садрже специјалне липидне састојке на терминалном цистеину који чврсто везује липопотеине у спољашњу мембрану. Спољашњи слој спољашње мембране садржи ЛПС, састављене од релативно конзервираног ди-*N*-ацетилглукозаминског костура са фосфатним, хидроксилним и аминоксидним групама. Цела ова структура означена је као липид А и поседује већину важних биолошких особина које су повезане са ЛПС-ом.

Међу првим болестима које произилазе из бактеријских инфекција су оне које су узроковане микроорганизмима који продукују токсине. Липидни део А грамм-негативног ЛПС-а узрокује сепсу, која се карактерише повишеном телесном температуром, протеолизом мишића, неконтролисаним интраваскуларном коагулацијом и шоком. Ови ефекти су последица стварања IL-1 и TNF- $\alpha$ , који показују хипертермичку активност делујући на хипоталамус, повећавају пропустљивост крвних судова, ремете активност ендотелних ћелија индукујући их на прокоагулацијску активност.

Од грамм-негативних бактерија издваја се *Escherichia coli* (*E. coli*), која насељава гастроинтестинални тракт. Код особа са ослабљеним имунитетом, невирулентни сојеви могу довести до пнеумоније, сепсе или инфекције уринарног тракта, нарочито ако постоји присуство страног тела (нпр. ендоваскуларни катетер).

Претходно здраве особе подложне су такозваној контактної инфекцији узрокованој нормалним садржајем, код руптуре црева која настаје код апендицитиса или абдоминалне трауме. *Escherichia coli* представља мали део нормалне флоре црева - преко 99% су стриктно анаероби - али је значајан патоген у оним инфекцијама које настају као резултат изласка нормалног цревног садржаја у претходно стерилну околину. *E. coli* нормалног цревног садржаја је примарно одговорна за рану септикемију повезану са изливањем цревног садржаја, док су анаеробне врсте потребне да се формира апсцес. *E. coli* се обично налази у културама узорака узетим код перитонитиса узрокованог перфорацијом слепог црева, дивертикулума или пептичног улкуса, а често се налази и у крвотоку болесника с тежим облицима болести. Често се среће и у случајевима интраабдоминалних апсцеса, холециститиса и при исхемији црева. Она је грам-негативна аеробна бактерија интестиналног тракта, која је покретна захваљујући флагелама. Поседује капсулу која представља фактор вируленције јер спречава фагоцитозу. Најважнији антиген је О антиген или ендотоксин, липополисахаридни комплекс у зиду бактерије, одговоран за настанак ендотоксемије у присуству бактеријске инфекције. Прецизније, то је спољашњи слој бактеријске мембране кога граде липид А и полисахаридни слој. Липид А је одговоран за већину биолошких дејстава ендотоксина јер снажно утиче на имуни систем тако што индукује селективну пролиферацију Б лимфоцита и њихову диференцијацију до секреторних плазма ћелија. Директни ефекти ендотоксина су хипотензија са циркулаторним колапсом, грозницом, леукопенијом, тромбоцитопенијом, дермалном некрозом и кортикалном некрозом бубрега.

*Klebsiella pneumonia* и њени блиски сродници су главни узрочници инфекција доњег респираторног тракта (узрокујући лобарну пнеумонију), уринарног тракта, билијарног тракта и хируршких рана. Многе од ових инфекција су удружене са бактеријемјом и животно угрожавајућим септичким шоком. *Klebsiella spp.* је грам-негативни бацил без флагела, који показује изразиту тенденцију ка стварању апсцеса и узрочник је бројних респираторних и уринарних инфекција.

Сојеви *Proteusa* се нормално налазе у земљи, води и отпаду и део су нормалне фекалне флоре. Као и друге грам-негативне бактерије *Proteus* може контаминирати опекотине, декубитисне улкусе и хируршке ране и даље изазвати инвазију у крвоток. Клиничке манифестације су типичне за грам негативну сепсу укључујући и шок. У већини случајева као улазно место је уринарни тракт, билијарно стабло, гастроинтестинални тракт и током хируршких захвата.

Индол негативни *Proteus mirabilis* и индол позитивни *Proteus vulgaris* показују велику склоност ка стварању апсцеса и чест је узрочник уринарних и респираторних инфекција. Отпорне су на многе антибиотике, нарочито *Proteus vulgaris*, који се неретко изолује из апсцесних формација.

*Pseudomonas aeruginosa* је у природи широко распрострањен и налази се у земљи, води, биљкама и животињама укључујући и људе. Код здравих људи често настањује спољашње уво, горњи респираторни тракт и дебело црево. Лучи веома јак егзотоксин А и многе ензиме (еластазу и лецитиназу). Има способност колонизације дигестивног тракта, што је битно са аспекта дуготрајне антибиотске терапије. Већина инфекција са *Pseudomonas aeruginosa* су болничког порекла и најчешће се преноси на болеснике путем руку особља или испаравањем из потенцијалних депоа инфекције, а то су респиратори, ендоскопски апарати, умиваоници и други извори за које је карактеристична висока влажност.

*Bacteroides spp.* и *Fusobacterium spp.* су грам-негативни анаероби, врло високе вируленције. Основна одлика анаеробне флоре је мешовитост бактеријских врста, зато важну улогу у таквим полимикробним инфекцијама има *Bacteroides melanigenicus*, изразито патогена бактерија, која продукује факторе раста неопходне другим анаеробним бактеријама. *Bacteroides fragilis* је најважнији представник ове групе. Њихова патогеност огледа се у огромном броју излучених егзотоксина, различите структуре, као што су хепариназе које изазивају ДИК.

### 1.1.6. Биомаркери сепсе

Важност ране идентификације септичних стања показује и податак да се при започињању неадекватне антибиотске терапије петоструко смањује стопа преживљења (Kumar i sar, 2009). Доказано је да при одлагању антибиотске терапије у септичком шоку, смртност расте за 7,6% по сату, у првих 6 сати (Kumar i sar, 2006). Додатне потешкоће у идентификацији узрочника сепсе јавља се и код новорођенчади, политрауматизираних пацијената и пацијената с панкреатитисом, те се из тог разлога решење проналази у идентификацији биомаркера сепсе (Rhodes i sar, 2017).

Пошто се клиничка слика септичних пацијената најпре показује као дисфункција појединих органских система, не постоји специфични дијагностички тест који може идентификовати сепсу, али се одговор домаћина на инфекцију често може квантификовати. Стога препознајемо три битне улоге потенцијалних маркера сепсе.



Прва је идентификација односно искључивање сепсе при чему треба напоменути да су биомаркери често бољи у искључивању него у потврђивању присутности поремећаја. Искључивање септичних стања могуће је уколико су маркери довољно осетљиви, а проблем у потврђивању појављује се јер не постоји ни један маркер који је у потпуности специфичан већ га редовно индукују друге ноксе попут трауме, опекотине или неке друге врсте стреса.

Друга улога биомаркера огледа се у процени тежине болести и одређивању прогнозе водећи се логиком да већа концентрација маркера представља теже стање односно лошију прогнозу.

Трећа улога представља процену одговора на примењену терапију што се обично постиже евалуацијом трендова одређених маркера или њихових комбинација са правилом да пад тренда обично представља повољан, а повишење тренда неповољан одговор на терапију. Такође треба нагласити да ниједан имунолошко/биохемијски маркер не може сасвим сигурно предвидети инфекцију без детаљних и квалитетних клиничких биометријских маркера, односно прецизно узете анамнезе те детаљно обављеног клиничког прегледа.

#### 1.1.6.1. Хематолошки маркери и индекси

*Седиментација еритроцита (СЕ).* Брзина СЕ расте унутар 24 до 48 h, од појаве неког запаљенског догађаја, и постепено се успорава током недеље у којој наступа повлачење инфламације. Треба напоменути да брзина СЕ приликом инфективних стања често није нити довољно брза нити довољно висока, да би могли са сигурношћу тврдити да је узрок SIRS-а инфективна етиологија. Постоји мањкавост брзине СЕ, као предиктора морталитета, односно није доказана значајна разлика у брзини СЕ код особа које јесу и особа које нису преживеле сепсу. Упркос томе што је брзина седиментације еритроцита један од најстаријих дијагностичких тестова у процени инфламаторног одговора, његова употреба у сврху дијагнозе сепсе је изузетно ограничена, те су се задњих десетак година у клиничкој пракси појавили значајно бољи маркери који осетљивије, специфичније и раније указују клиничару на могућност постојања сепсе.

*Леукоцити (WBC) и однос неутрофила и лимфоцита (NLR).* Током SIRS-а јавља се поремећај укупног броја леукоцита, тако да постојати леукоцитоза ( $\geq 11 \times 10^9/L$ ), односно леукопенија ( $\leq 4 \times 10^9/L$ ) или у њиховој одсутности, скретање у лево (појава незрелих врста леукоцита у периферној крви) више од 10%. Поремећај укупног броја леукоцита као маркера сепсе произлази из чињенице да се код септичних пацијената могу јавити леукоцитоза или леукопенија, а одређени део пацијената ће бити у "сивој зони" нормалног броја леукоцита.

Сепса је обично праћена повишеним односом неутрофила и лимфоцита (NLR). Тачан механизам раста неутрофила и пада лимфоцита у сепси још увек није у потпуности разјашњен. Доказано је да деловање ендогених катехоламина на  $\beta_2$ -адренергичке рецепторе доводи до смањења у отпуштању лимфоцита, а стимулација  $\alpha$ -адренергичких рецептора повећава мобилизацију гранулоцита (Vincent i sar, 2006). Количина гранулоцита и њихових прекурсора у периферној крви је повећана, али су нарушени хемотаксиски механизми и продукција слободних радикала. У септичним стањима наступа масовна апоптоза лимфоцита при чему долази до значајног смањења  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцита те ова два основна механизма доводе до пораста гранулоцита и смањења лимфоцита, резултирајући повишеним NLR односом (Shrestha i sar, 2017).

*Тромбоцити (PLT), средња запремина тромбоцита (MPV) и однос тромбоцита и лимфоцита (PLR).* Током сепсе се јавља коагулацијски поремећај, пад броја тромбоцита и са најозбиљнијом компликацијом - ДИК-ом, која се манифестује стварањем угрушака и истовременим крварењем на више места. Долази до пада броја тромбоцита услед смањене производње, повећане потрошње, облитерације и секвестрације тромбоцита у слезини. Септичко стање доводи до смањења производње мегакариоцита и стимулације фагоцитозе прекурсора тромбоцита (Mavrommatis i sar, 2000). Инфламаторна и тромботична стања у сепси могу променити величину тромбоцита, односно средњу запремину тромбоцита (MPV). Већи тромбоцити су реактивнији од мањих, јер могу лакше да ослободе хемијске медијаторе као одговор на ендогене или егзогене стимулусе. Када се потрошња тромбоцита повећа, коштана срж производи више незрелих тромбоцита и ово доводи до повећања MPV (Zhang i sar, 2015). Доказано је да пацијенти са септичким шоком, који имају високе вредности MPV и низак број тромбоцита, имају лошу прогнозу и мањи проценат преживљавања (Gao i sar, 2014). Такође је доказано да је висок PLR индекс, значајно повезан са повећаним морталитетом пацијената са сепсом (Shen i sar, 2019).

### **1.1.6.2. Лактати**

Повећан ниво лактата у крви код пацијената са сепсом је биомаркер анаеробног метаболизма и последица смањеног снабдевања ткива кисеоником (Gotts i Matthay, 2016). Међутим, доказано је да се повећане вредности лактата јављају и у условима адекватне ткивне перфузије, а аеробна гликолиза може бити убрзана услед стимулације  $\beta_2$ -адренергичких рецептора (James i sar, 2018).

Један од главних узрока повишене концентрације лактата код пацијената са сепсом је повећан анаеробни метаболизам пирувата, услед ткивне или целуларне хипоксије. Целуларна хипоксија је последица дисфункције митохондрија, која је уосталом и један од могућих механизма настајања мултиорганске дисфункције током сепсе (Fink, 2001).

Такође, повећан ниво лактата у крви је последица повећане аеробне гликолизе, јер је пируват основни продукт аеробне гликолизе. Инфламација повезана са сепсом индукује повећање производње пирувата повећаним приливом глукозе, али и катаболизмом протеина у мишићима, ослобађајући аминокиселине које се потом трансформишу у пируват (Levy, 2006). Ово стање, које се назива убрзана аеробна гликолиза, настаје када брзина метаболизма угљених хидрата превазилази оксидативни капацитет митохондрија. Убрзана аеробна гликолиза стимулисана је ендогеним и/или егзогеним катехоламинима преко  $\beta_2$ -адренергичких рецептора (Levy i sar, 2008). Такође, повећана концентрација лактата у крви може бити и последица смањеног метаболизма у јетри, да ли због примарне болести јетре као што је цироза или услед инсуфицијенције јетре у оквиру мултиорганске дисфункције током сепсе (Sterling i sar, 2015).

Повишена концентрација лактата у крви корелира са тежином клиничке слике септичног пацијента, те представља изузетно важан биомаркер тежине болести и предиктор морталитета.

### 1.1.6.3. Реактанти акутне фазе

Реактанти акутне фазе (APR, енгл. Acute phase reactants) су инфламаторни маркери чија се серумска концентрација значајно мења приликом запаљења. Њихова синтеза је највише стимулисана IL-6, али и другим проинфламаторним цитокинима, као што су TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$ . Позитивни реактанти акутне фазе су они чија продукција и серумске концентрације расту приликом инфламаторног одговора, а најважнији су прокалцитонин, Ц-реактивни протеин, протеин који веже липополисахарид, феритин, фибриноген, хепцидин и серумски амилоид А. Негативни реактанти акутне фазе су они чија се синтеза и серумске концентрације смањују током запаљеног одговора, и ту спадају албумин, преалбумин, трансферин, протеин који веже ретинол и антитромбин.

*Ц-реактивни протеин (CRP)*. Ц-реактивни протеин припада породици пентраксина и састоји се од пет идентичних негликозилисаних полипептидних ланаца од којих сваки садржи 26 аминокиселинских остатака (Pepys i Baltz, 1983).

Ц-реактивни протеин је добио име према способности преципитације полисахарида Ц бактерије *Streptococcus pneumoniae*. CRP је реактант акутне фазе чија концентрација у серуму може нарасти до 1000 пута, унутар 48 сати од настанка инфекције или оштећења различитих ткива. Он се ствара у јетри, а у мањој мери у ћелијама масног ткива као одговор на стимулацију IL-6, IL-1 и TNF- $\alpha$  (Gabay i sar, 1999). CRP је модулатор урођене имуности, а може се везати за специфичне лиганде и активирати комплемент. Он модификује функцију ендотелних ћелија, инхибира неутрофилну активацију, делује на моноците и макрофаге, инхибира активацију и агрегацију тромбоцита. CRP је у серуму једна је од најчешћих биохемијских анализа и највише се примјењује у клиничкој пракси у откривању инфекција и праћењу њиховог тока (Gupta i sar, 2002). Највећа мана CRP-а у сепси је недостатак специфичности. Повећање концентрације CRP-а може упозорити на запаљење и/или оштећење ткива било које етиологије, као што су бактеријске или вирусне инфекције, разне упалне реакције, некрозе, трауме или малигни процеси (Sasaki i sar, 2002). Постоперацијска концентрација CRP-а може се преклопити са сепсом нарочито у почетној фази, када је рано препознавање сепсе од великог значења. Због његове доступности и прилично једноставне интерпретације резултата мерења, CRP је још увек најчешће кориштен маркер инфекције болесника смештених у болницама укључујући и оне с високим ризиком за развој сепсе.

*Прокалцитонин (PCT)*. Прокалцитонин је протеин састављен од 116 аминокиселина и ствара се у неуроендокриним ћелијама штитне жлезде, а присутан је у крви у врло ниској концентрацији. У стањима тешких упала, сепси и стањима сличним сепси концентрација PCT се повећава чак неколико хиљада пута без повећања концентрације калцитонина и то због синтезе у не-неуроендокриним ћелијама. PCT има дуг полуживот у крвној плазми, и то око 20-36 сати. Доказано је да се повећање концентрације PCT-а јавља већ након 3 до 5 сати, након апликације ЛПС-а, а највећу концентрацију достиже 24 до 36 сати након изложености организма бактеријама или липополисахаридним компонентама. Повећање концентрације се јавља и код опекотина, топлотног удара и инхалацијског пнеумонитиса, док је повећање у гљивичним инфекцијама варијабилно, а вирусне инфекције не изазивају значајан пораст овог биомаркера (Morgenthaler i sar, 2003). Доказан је дијагностички и прогностички значај PCT-а у разликовању болесника с неинфективним SIRS-ом од оних са сепсом, а велика корист овог биомаркера је у праћењу учинка антимикуробне терапије код пацијената са интраабдоминалним и другим инфекцијама. Доказано је да је ризик за сепсу био 88% већи код болесника са повишеним PCT, а 84% код повишеног CRP-а (Watkins i Lemonovich, 2012). Прокалцитонин може помоћи клиничарима у процени ризика за развој сепсе и/или септичког шока.

*Липополисахаридни везујући протеин (LBP).* Липополисахарид је поларан макромолекул који чини део зида ћелија грам-негативних бактерија и одговоран је за лепезу имуних одговора током инфекције (Van der Poll i Opal, 2008). Учинак ЛПС-а као једног од РAMP-ова посредован је везањем на TLR-4 рецептор на имуним ћелијама, који преко 4 основна пута (MyD88, TIRAP, TRIF и TRAM) индукује нуклеарну транслокацију NF-κB и доводи до повећане синтезе проинфламаторних цитокина. Проинфламаторни цитокини (IL-1 и IL-6) су одговорни за стимулацију хепатоцита и синтезу LBP-а.

Липополисахаридни везујући протеин (енгл. Lipopolysaccharide binding protein) спада у групу протеина акутне фазе, а главна функција му је везивање ЛПС-а. Ради се о гликозилираном протеину величине 58 kDa чије се концентрације повећавају и до 30 пута током запаљенског одговора. У људској плазми се налази у релативно великим количинама, а стимулацијом његове продукције током запаљенског одговора повећава се способност везивања ЛПС-а из циркулације те његове доставе молекулу CD14 која потом преноси ендотоксин на MD2 са којим ствара комплекс ЛПС-MD2. Тек тај комплекс има могућност активације TLR-4 рецептора који ће путем MyD88 и TRIF интрацелуларних путева узроковати улазак NF-κB у једро и започети појачану продукцију проинфламаторних цитокина. Концентрација LBP-а у плазми расте у SIRS-у, сепси, али и при акутној трауми након стимулације хепатоцита IL-1 и IL-6. Успркос задовољавајућој брзини индукције и адекватном порасту вредности, LBP се ипак сматра неспецифичним маркером јер је његова продукција стимулисана и у другим стањима која узрокују SIRS, попут политрауме, опекотине или панкреатитиса, а при томе се концентрације значајно не разликују од SIRS-а инфективне етиологије. Из тог разлога не можемо на основу вредности LBP-а закључивати о томе да ли је запаљенска реакција последица инфективне или неинфективне ноксе (Prucha i sag, 2003). LBP је показао релативно незадовољавајућу осетљивост и специфичност при постављању дијагнозе SIRS-а и сепсе. Успркос разочаравајућим резултатима у популацијама одраслих септичних пацијената, улога биомаркера LBP-а може се пронаћи у раној дијагнози сепсе код новорођенацади.

#### **1.1.6.4. Цитокински маркери сепсе**

Током сепсе, важна је улога цитокина, нискомолекуларних гликопротеина, који учествују у међућелијској комуникацији. Цитокини учествују у активацији, пролиферацији и диференцијацији ћелија, као и у регулисању имунолошких реакције и упалних процеса, а могу деловати и цитотоксично.

Карактерише их каскадно лучење и стварање тзв. "citoкинске мреже" која се састоји од citoкина који позитивном повратном спрегом појачавају сопствено лучење. У SIRS-у, који је одговоран за ћелијску смрт у раним фазама запаљенског одговора региструје се учинак проинфламаторних citoкина од којих су најважнији IL-1, IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$ . У другој фази сепсе која се карактерише имуносупресијом, најпре се примјећује деловање антиинфламаторних citoкина (IL-10). Интерлеукини су citoкини који су име добили по томе што их луче леукоцити и делују на леукоците. Њихов пораст често је први корак у развоју запаљенског одговора на инфекцију који доводи до даљих промена у параметрима које можемо сматрати биомаркерима сепсе. Из тог разлога, одређивање њихових концентрација у раној фази сепсе може нам олакшати и убрзати постављање дијагнозе сепсе, а мерење њихових концентрација помоћи у процени прогнозе, терапијског учинка и лечења септичних пацијената.

*Интерлеукин 6 (IL-6).* Интерлеукин 6 је нискомолекуларни гликопротеин величине 19-26 kDa који спада у групу citoкина урођеног имунитета, чију синтезу и лучење изазивају бактеријски токсини, имунокомплекси, фагоцитоза, слободни радикали, вирусна ДНК, леукотријени, хемокини и други citoкини (највише IL-1 и TNF- $\alpha$ ), као и ЛПС из ћелијског зида грам-негативних бактерија. Интерлеукин 6 стварају макрофаги, ендотелне ћелије и Т лимфоцити. Он делује благо пирогено, те има врло важно имуностимулационо деловање од чега је најважнија стимулација завршне диференцијације Б лимфоцита у плазма ћелије и стимулација раста и диференцијације Т лимфоцита према Th2 лимфоцитима. Пораст нивоа IL-6 стимулисан је запаљенском реакцијом и његове вредности расту врло брзо, те је самим тиме добар маркер за рано постављање дијагнозе сепсе. Ипак, ради се о неспецифичном маркеру који је резултат запаљенског процеса и који може бити последица локалне инфекције, сепсе или хроничног запаљенског процеса.

Након инфективног стимулуса, ниво IL-6 рапидно расте у првих сат времена, а максималну концентрацију постиже након два сата. Доказано је да он има просечну осетљивост од 72% и просечну специфичност од 77% у дијагностиковању SIRS-а, сепсе и септичног шока. IL-6 своје место може наћи у дијагностиковању неонаталне сепсе. Концентрације прокалцитонина су повишене у првих 72 сата живота, те је PCT готово неупотребљив у том раздобљу као маркер сепсе, али је IL-6 добро решење као довољно брз, осетљив и специфичан маркер за рану дијагнозу и рани почетак терапије сепсе.

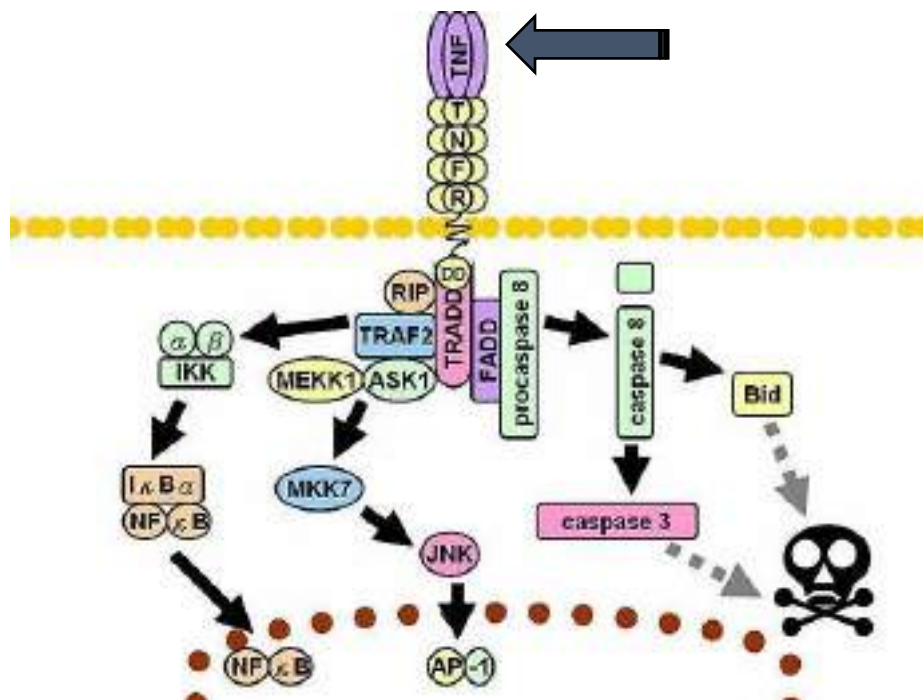
*Интерлеукин 1 (IL-1).* Интерлеукин 1 је нискомолекуларни гликопротеин величине 17 kDa и цитокин урођене имуности кога продукују макрофаги, мастоцити ендотелне ћелије, као и неке епителне ћелије. Интерлеукин 1 обухвата два слична молекула: IL-1 $\alpha$  који се налази на ћелијској мембрани и IL-1 $\beta$  који се излучује у ванћелијску течност. За разлику од егзогене примене IL-6 и TNF- $\alpha$ , егзогена апликација IL-1 $\beta$  не активира септични одговор, стога се претпоставља да IL-1 није одговоран за иницијацију септичне каскаде, већ њено одржавање. Ипак, утврђено је да ниво IL-1 директно корелира с тежином септичног стања. Ниво IL-1 код одраслих здравих особа је мањи од 1 pg/mL, али при апликовању ЛПС-а који је најбољи стимуланс индукције проинфламаторних цитокина, његови нивои почињу да расту и досежу максимум након 3 до 4 сата. Због веома брзе индукције IL-1 је маркер у неонаталној сепси.

*Интерлеукин 8 (IL-8 CXCL 8).* Интерлеукин 8 је гликопротеин величине 8-12 kDa који делује као проинфламаторни цитокин, односно хемокин кога најпре луче макрофаги, неутрофили, Т лимфоцити, ендотелне ћелије, фибробласти и епителне ћелије попут глаткомишићних ћелија дисајних путева, хепатоцита и кератиноцита. Главна улога, као хемокина, је да привлаче ћелије на места која су стимулирана запаљењем различитих ткива, било да се ради о инфекцији микроорганизама или некој другој нокси која оштећује ткиво. Запаљенски стимулуси могу бити IL-6 и TNF- $\alpha$ , различити митогени, лектини, кристали и вируси. Специфичност IL-8 у односу на остале хемокине је његова способност да привлачи најпре неутрофилне леукоците, а значајно мање друге врсте имуних ћелија изузев активираних еозинофила.

Нивои IL-8 у плазми здравих особа су мањи од 60 pg/ml, а током ендотоксемије расту за 90 минута и свој максимум достижу након 120 минута. Интерлеукин 8 није специфичан маркер сепсе јер његову секрецију стимулишу многобројне ноксе. Доказано је да је IL-8 добар маркер за постављање ране дијагнозе неонаталне сепсе. Додатна дијагностичка улога IL-8 могла би се пронаћи у процени тежине септичког стања у смислу постојања ДИК-а и MODS-а. Наиме, нивои IL-8 значајно позитивно корелирају са тежином органских оштећења код пацијената са сепсом.

*Фактор некрозе тумора- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).* Фактор некрозе тумора је цитокин величине 17 kDa којег најпре луче макрофаги и Т лимфоцити, а у циркулацији се налази у облику хомотримера величине 51 kDa. Као и остали проинфламаторни цитокини има многобројне ефекте на ткива током запаљенског одговора, а његово стварање најјаче стимулише ЛПС.

TNF- $\alpha$  активира ендотел крвних судова и појачава ефекат адхезијских молекула на њима што хемотаксично делује на неутрофиле и моноците, те повећава приањање запаљенских ћелија и њихову екстравазацију као и појачани излазак течности у запаљенко подручје. Такође, он појачава прокоагулантно деловање ендотелних ћелија, што појачава локално згрушавање крви. Стимулацијским деловањем на коштану срж мобилише неутрофиле и доводи до појаве неутрофилије, а у великим дозама инхибира еритропоезу и мијелопоезу. Слично осталим прозапаљенским цитокинима, TNF- $\alpha$  има пирогено деловање и стимулише синтезу протеина акутне фазе, а при узрапредовалим инфекцијама и злоћудним туморима узрокује липемију, анорексију и кахексију као последицу инхибиције липопротеин-липазе. Ипак, једна од најважнијих улога TNF- $\alpha$ , која га издваја од осталих цитокина, је његова могућност да изазива апоптозу ћелија. Везањем TNF- $\alpha$ , за његов рецептор на мембрани ћелија који су повезани са адапторским молекулама TRADD и TRAF6, започиње активацију каспазних каскада које воде ка цепању ДНК молекула и разарању ћелијских структура (Слика 6).



Слика 6. Вишеструки сигнални путеви цитокина TNF- $\alpha$ .

Нивои TNF- $\alpha$  у плазми здравих особа су нижи су од 2,8 pg/mL, а при стимулацији ЛПС-ом почињу рапидно да расту и достижу максималне концентрације за 60 до 90 минута. Доказано је да TNF- $\alpha$  омогућава постављање ране дијагнозе неонаталне сепсе, и њихове концентрације значајно расту у тежим облицима сепсе и септичном шоку. Исто тако, вредности TNF- $\alpha$  су значајно повишене код пацијената са лошим исходом него код преживелих (Kumar i Rizvi, 2010).



*Интерлеукин 10 (IL-10)*. Интерлеукин 10 је хомодимер величине од 34 до 40 kDa који се убраја у групу имуносупресијских цитокина те се по својој функцији значајно разликује од до сада поменутих запаљенских медијатора. Имуносупресијски цитокини смањују имунолошку реакцију, што је важно за ограничавање њиховог трајања и за успостављање имунотолеранције. Секрецију IL-10 стимулишу проинфламаторни цитокини IL-12 и IL-27, као и ЛПС који снажно стимулише регулаторне Т лимфоците, макрофаге (при продуженом инфламаторном одговору) и неутрофиле (Ouyang i sar, 2011). Интерлеукин 10 делује најпре на леукоците супримирајући запаљенску реакцију, смањује синтезу проинфламаторних цитокина од стране макрофага и синтезу Th1 цитокина и на тај начин усмерава имуну реакцију према хуморалној имуности (Th2) (Oral i DePalo, 2000). Интерлеукин 10 смањује препознавање ЛПС-а и једарну транслокацију NF-κB, што називамо развојем ендотоксинске толеранције. Наведени процес, у којем деловање IL-10 чини само део целокупног имуног механизма, називамо репрограмирањем моноцита/макрофага.

Улога IL-10 у септичним стањима примарно служи ограничавању трајања запаљења односно ткивног оштећења које ће произвести инфламаторни одговор, али у сепси резултира продуженом имуносупресијом која оставља домаћина изложеног додатним, неретко мултирезистентним патогенима као и неадекватним ћелијским метаболизмом, водећи септичног пацијента у стање кахексије.

Ниво IL-10 у плазми одрасле здраве особе је испод 2 pg/mL. За разлику од осталих цитокинских маркера који се могу користити у раној дијагнози сепсе, интерлеукин 10 се најбоље користити у процени тежине и прогнозе болести с обзиром на патофизиолошку природу септичног одговора у којој се прво јавља хиперинфламаторно, а затим и имуносупресивно стање организма. Концентрације IL-10 расту спорије и врхунац достижу касније, зависно од тежине септичког одговора. Праћење IL-10 током сепсе, побољшава могућност раног препознавања имуносупресивне фазе септичног одговора, као и употребу нове имунотерапије којом би се сузбио антиинфламаторни одговор и ојачао имунитет појединца.

#### **1.1.6.5. Остали важни биомаркери сепсе**

*Пресепсин (sCD 14-ST)*. Пресепсин је пептид величине 13 kDa, који настаје протеолизом sCD14 (површинског корецептора гликопротеинске структуре) чија је мембранска компонента (mCD14) везана гликозилфосфатидил-инозитолом за мембрану ћелије, а његоба главна функција је везивање ЛПС и пептидогликана из бактерија или комплекса ЛПС и LBP са TLR рецепторима (Labeta i sar, 1993).

Везањем ЛПС-а за CD14, активирају се TLR рецептори који покрећу сигналне путеве ћелијске активације, фагоцитозу и стварање цитокина који учествују у одбрани домаћина против патогена (Zanoni i Granucci, 2013). CD14 се налази највећим делом на моноцитима, макрофагима, неутрофилима, Б лимфоцитима, а има га и на хондроцитима, дендритичним ћелијама, као и епителним ћелијама црева (Jersmann, 2005). Такође, оштећени хепатоцити могу бити показатељи нивоа CD14, нарочито за време ендотоксемије. Концентрација пресепсина у крви, може бити доказ реакције организма на присутност патогена. Недавним испитивањем показано је да се пресепсин може детектовати већ један сат након ендотоксемије, са повећаном концентрацијом у трећем сату (Chenevier-Gobeaux i sar, 2016). Полуживот пресепсина у крвној плазми је око 4 до 5 сати. Ове чињенице говоре у прилог томе да би пресепсин могао бити специфичан показатељ инфекције, који би захваљујући кратком полуживоту у плазми могао допринети боље вођеној терапији.

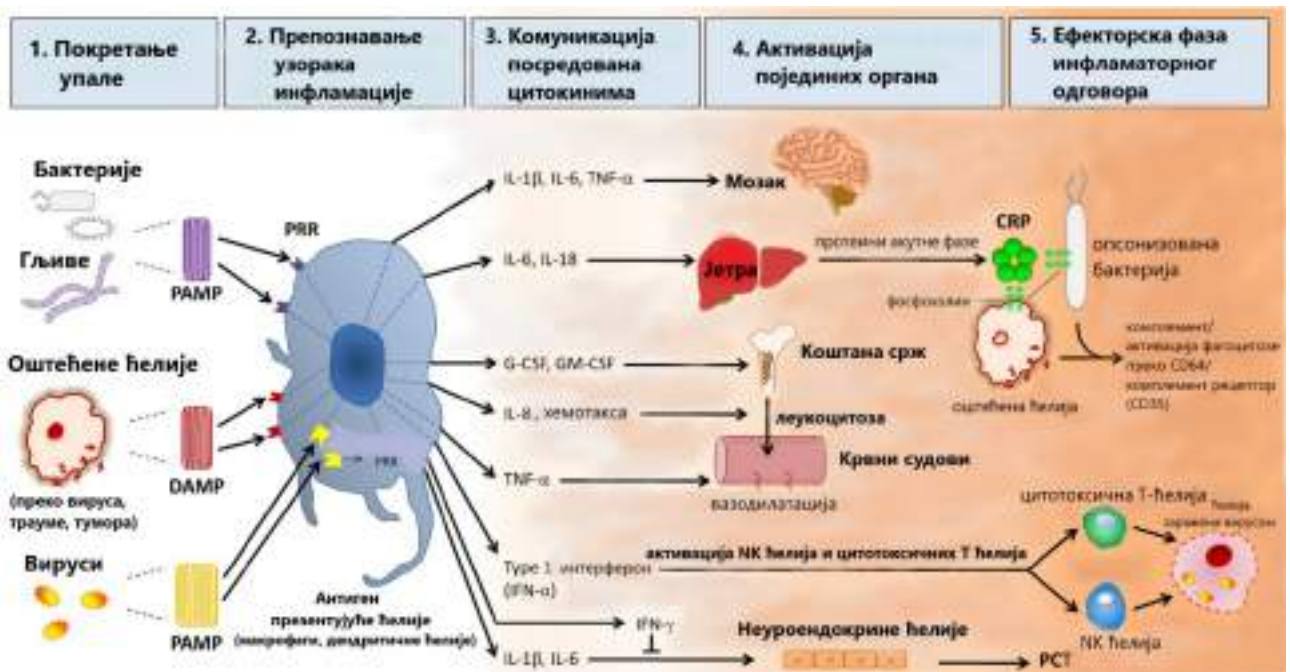
Доказано је да су повећане вредности пресепсина у првом дану, значајно повезане са појавом оштећења појединих органа (Masson i sar, 2014). Доказано је да болесници код којих примењена антимикуробна терапија није задовољавајућа, имају сталан пораст пресепсина у првих седам дана. Испитивањем прогностичке тачности нивоа пресепсина у сврху исхода болести, показало се да је висока концентрација пресепсина на почетку клиничког стања показатељ смртог исхода. Такође је доказано да болесници са респираторним инфекцијама имају мање вредности пресепсина од оних са инфекцијама уринарног и дигестивног система (Yang i sar, 2016).

Такође је доказано да концентрација пресепсина расте у раној фази сепсе, а у стању септичког шока достиже свој максимум. Пресепсин се као мали протеин излучује бубрезима, и њена концентрација у плазми зависи од бубрежне функције. Смањена брзина гломеруларне филтрације проузрокује лажно повећање вредности пресепсина у плазми, па се вредности изнад граничних код болесника са поремећајем бубрежне функције морају тумачити са опрезом (Kotera i sar, 2014).

*Рецептор CD64.* CD64 (други назив Fc $\gamma$ R1) је рецептор за Fc крај имуноглобулина G (IgG), који је експримиран у малим количинама на неутрофилима. Пошто IgG делује као опсонин, везањем Fc краја имуноглобулина на Fc $\gamma$ R1 рецептор стимулише се фагоцитоза, реакција оксидације и продукција проинфламаторних цитокина и хемотаксина (Patnaik i sar, 2020). Иако неутрофили у мировању имају малу могућност експресије CD64 на својој мембрани, при запаљенском одговору долази до активације неутрофила проинфламаторним цитокинима (IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и његове концентрације се повећавају унутар 4 до 6 сати.

У одсутности стимулације неутрофила, експресија CD64 почиње се смањивати након 48 сати, а нормализује се кроз 7 дана (De Jong i sar, 2016). С обзиром на то да је пораст CD64 уско повезан с бактеријском инфекцијом и карактерише га брзо опадање након престанка стимулације IgG-ом, он има добре предиспозиције као потенцијално одличан биомаркер сепсе. CD64 је обећавајући маркер који показује високу осетљивост и специфичност, а испољава добру корелацију са тежином сепсе.

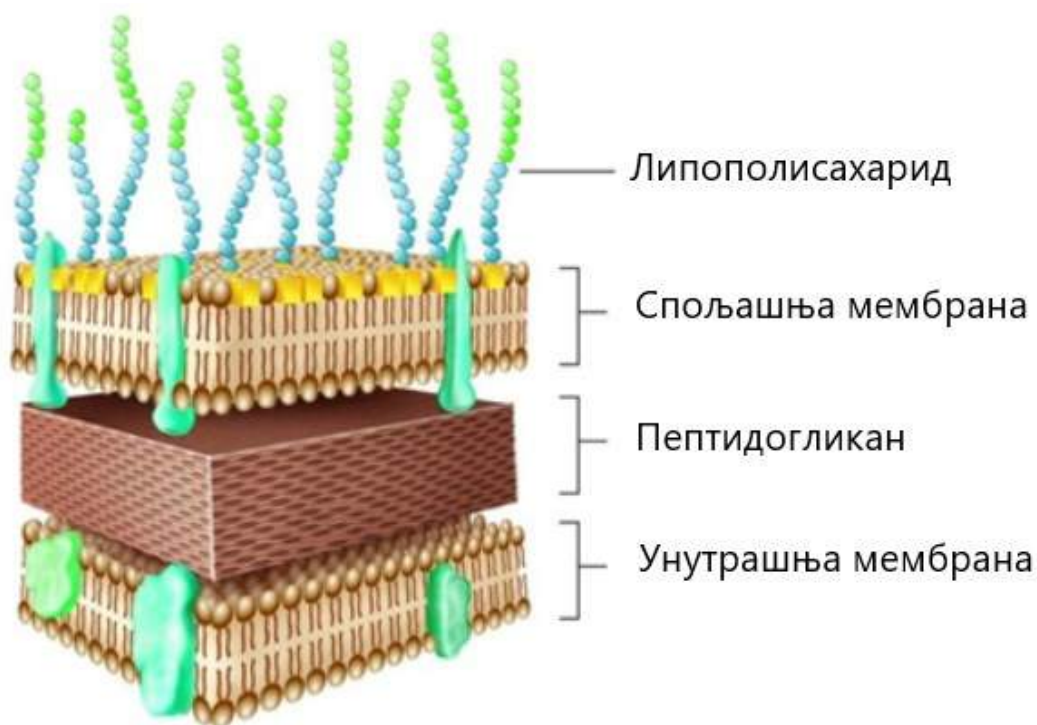
*Рецептор sTREM-1.* TREM-1 (енгл. triggering receptor expressed on myeloid cells-1) је рецептор који припада имуноглобулинској суперфамилији и експримирају га полимофонуклеари и зрели моноцити, и он учествује у одговору урођене имуности на грам-позитивне, грам-негативне бактерије и гљивичне узрочнике. Стимулација TREM-1 рецептора доводи до мобилизације калцијумових јона и активације NF-κB што последично узрокује продукцију металопротеиназа, проинфламаторних цитокина и хемотаксина, као и дегранулацију неутрофила. Иако лиганд овог рецептора још није познат, зна се да активација TREM-1 у присутности TLR-2 и TLR-4 рецептора доводи до повећане експресије TREM-1 на мијелоидним ћелијама. sTREM-1 је биомаркер који настаје цепањем трансмембранског домена TREM-1 рецептора, и он се може мерити у кожи, телесним течностима и инфицираним ткивима (Lemarié i Gibot, 2020). Истраживања су показала да је sTREM-1 одличан маркер сепсе, који је већ при ниским граничним вредностима показује врло високу осетљивост и специфичност у разликовању сепсе и SIRS-а неинфективне етиологије (Gibot i sar, 2004).



Слика 7. Физиолошки инфламаторни одговор и улога укључених молекула који се користе као биомаркери сепсе (Niehues, 2018).

## 1.2. Ендотоксемија и инфламаторни одговор

Липополисахарид представља компоненту ћелијског зида грам-негативних бактерија. Грам-негативне бактерије имају трослојни ћелијски омотач који се састоји из: а) унутрашње или плазма-мембране, б) ћелијског зида изграђеног из пептидогликана и в) спољашње мембране на чијој површини се налазе изложени молекули ЛПС-а (Слика 8). За разлику од њих, грам-позитивне бактерије немају спољашњу мембрану и на њиховој површини углавном нема молекула ЛПС-а. У првим истраживањима о токсичним ефектима бактерија, деловање ЛПС-а је означено као деловање "ендотоксина" за које се сматрао да се не ослобађају са површине бактеријске ћелије, осим у случају оштећења мембране. Касније је показано да је ЛПС саставни део спољашњих мембранских везикула уз помоћ којих бактерије међусобно размењују ДНК и РНК материјал, протеине и ендотоксине, а и да ослобађање ЛПС-а на овај начин у организму домаћина може изазвати имуни одговор.



Слика 8. Ћелијски зид грам-негативних бактерија са молекулима липополисахарида на спољашњој мембрани.

### 1.2.1. Липополисахарид (ендотоксин) - структура

ЛПС се састоји из липида А, хидрофилног језгра и О - антигена, укупне тежине 10-20 kDa. Липид А је комплекс фосфорилисаног гликозамин-дисахарида са молекулима масне киселине које цео комплекс ЛПС-а везују за фосфолипиде мембране.

Липид А представља токсичну компоненту липополисахарида и приликом лизе бактериских ћелија од стране имуног система домаћина, липид А ослобођен у фрагментима мембране може изазвати грозницу, дијареју и ендотоксемију. Хидрофилно језгро садржи хептозе и 3-деокси-D-мано-окт-2-улосонску киселину (Слика 9).



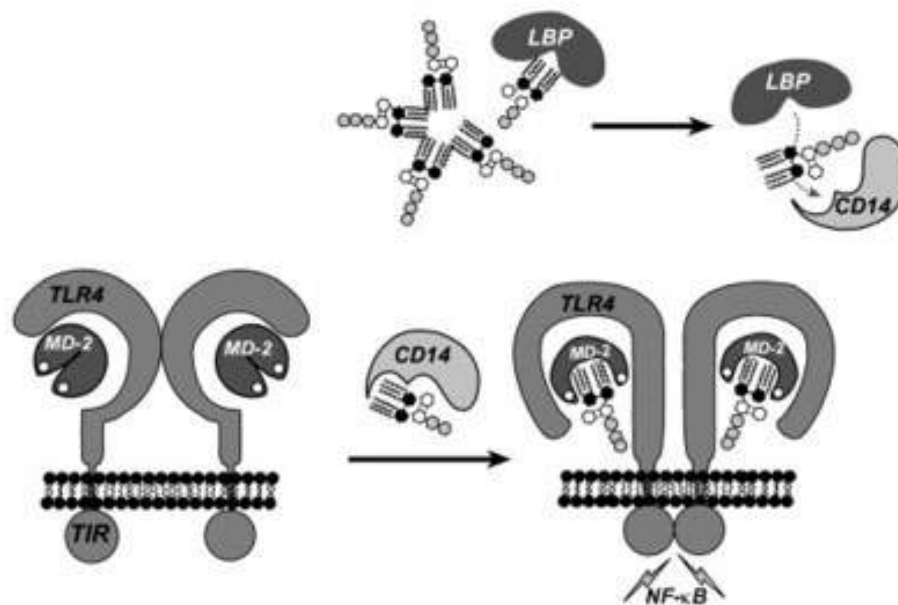
Слика 9. Структура липополисахарида.

O-антиген се састоји из понављајућег низа хидрофилних олигосахарида и представља спољашњи домен ЛПС молекула. ЛПС чији O-антиген има краће ланце назива се још и "груби" ЛПС (енг. rough LPS) док је онај који има дуже ланце O-антигена "глатки" ЛПС (енг. smooth LPS). Антитела домаћина препознају управо O-антигене, а њихова структура варира у зависности од соја бактерија и откривено је да различити сојеви само једне врсте бактерије *E. coli* продукују око 160 различитих O-антигена (Raetz i Whitfield, 2002). O-антиген, који се сматра најбитнијим, у комбинацији са K-антигеном (антиген капсуле) и X-антигеном (флагелин) одређују серотип у оквиру једне бактеријске врсте, па је на пример, комбинација O111:K58:X2 регистрована као серотип *E. coli* O111:Б4. Због разлика у биолошкој активности различитих O-антигена, при извођењу експеримената у којима се ЛПС-ом изазива имуни одговор неопходно је водити рачуна о избору и конзистентном коришћењу серотипа (Akarsu i Matuk, 2007).

О-антиген омогућава бактерији заштиту од дејства жучних киселина и неких антибиотика, па тако спољашња мембрана бактерије чији молекули ЛПС-а имају краће ланце О-антигена има слабију заштиту од хидрофобних антибиотика.

### 1.2.2. Ефекти ендотоксина на имуни одговор

ЛПС изазива активацију урођеног имуног одговора преко CD14/TLR-4/MD-2 рецепторског комплекса који се налази на моноцитима, дендритичким ћелијама, макрофагама, Б лимфоцитима и још неким ћелијама (Слика 10). Протеин CD14 (енг. cluster of differentiation 14) и TLR-4 припадају рецепторима који препознају PRR, тачније рецепторима који препознају РAMP. Њима у препознавању О-антигена ЛПС-а помажу MD-2 молекул који представља корецептор TLR-4 и LBP-а и презентује га наведеним рецепторима.



Слика 10. Активација имуног одговора ЛПС-ом преко CD14/TLR-4/MD-2 рецепторског комплекса.

Протеин CD14 служи као рецептор за овај комплекс и присутан је код мијелоидних ћелија, као што су моноцити/макрофаги. Постоје два типа протеина CD14, везан за мембрану (mCD14) и солубилни (sCD14). mCD14 нема могућност преноса ЛПС сигнала из екстрацелуларног простора у цитозол, јер не поседује трансмембрански домен.

Протеин MD-2 је екстрацелуларни протеин за који се везује ЛПС, а повезан је са екстрацелуларним доменом TLR-4. Преношење ЛПС-а од mCD14 до комплекса TLR4-MD-2 доводи до мултиполимеризације рецепторског комплекса (енгл. LBP/CD14/TLR4/MD-2 complex) у ћелијској мембрани (Rhee, 2014).

Сматра се да постоје два пута активације урођеног имуног одговора ЛПС-ом, у зависности од типа ЛПС-а који покреће активацију присутних рецептора. Груби ЛПС може активирати TLR-4 и без активације CD14 рецептора, при чему се покреће сигнални пут који резултира транскрипцијом TNF- $\alpha$ , док глатки ЛПС захтева активацију CD14 рецептора и у његовом присуству може доћи до активације пута који резултира транскрипцијом интерферона  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) или коактивације TLR-4 и првог пута (Godowski, 2005). Због шире распрострањености TLR-4 наспрам CD14 рецептора, где су ови последњи експримирани само на макрофагама, неутрофилима и дендритским ћелијама, груби ЛПС може активирати већи број ћелија и изазвати имуни одговор. Системска имуна активација у одговору на присуство ЛПС-а обухвата транскрипцију и ослобађање проинфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) (Luheshi, 1998). IL-1 и IL-6 настају локално на месту покретања имуног одговора и делују на фибробласте и ендотелне ћелије које додатно продукују ове цитокине. Циркулишући IL-6 индукује у хипоталамусу синтезу простагландина (PG) посредовану циклооксигеназом 2 (COX-2), а PGE<sub>2</sub> делује на термосензитивне неуроне хипоталамуса, што доводи до повећања телесне температуре (Roth i sar, 2009). Присуство ЛПС-а у крви може довести до септичког шока у случају израженог имуног одговора и то се назива ендотоксемија. Ћелијски одговор на ЛПС подразумева стварање и ослобађање медијатора који умножавају и преносе микробне сигнале на друге ћелије и ткива (Rittirsch i sar, 2008).

Такође постоје и неколико других ћелијских одговора на ЛПС, као што су фагоцитоза (Blander i Medzhitov, 2004), аутофагија (Xu i sar, 2007) и производња митохондријалних реактивних врста кисеоника (West i sar, 2011). Фагоцитоза је процес уништавања и ингестије микроорганизама, у коју су укључени фагозоми и лизосоми који формирају фаголизозоме - чији су ензими: а) фагоцитна оксидаза (која преводи молекулски кисеоник у супероксидни анјон и РВК - токсичне за унешене микроорганизме), б) индуцибилна азот-моноксид-синтаза (iNOS) - која преводи аргинин у азот-моноксид и в) лизозомална протеаза - која разлаже протеине микроорганизама.

Септични шок изазван грам-негативном бактеријском инфекцијом, један је од водећих узрока смрти у интраабдоминалним инфекцијама. Ендотоксин ових бактерија започиње настанак септичког шока, стимулацијом цитокина.

Иако су ендотоксини различитог бактеријског порекла, молекуларна структура и биолошка својства су им врло слична. Ендотоксин се мора ослободити из бактерије и брзо везати за различите протеине крвне плазме, активирајући читав низ реакција од којих су неке и нежељене одбрамбене реакције организма.

Ефекти ендотоксина, који зависе од његове концентрације у циркулацији, на организам су: грозница и повишена температура (системски одговор), дисфункција различитих органа, метаболички одговор, ендокрини одговор, стимулација ћелија јетре да стварају протеине акутне фазе, хематолошке промене (леукоцитоза), хуморални одговор (фибринолиза, хемостаза, систем комплемената), инфламаторне ћелије (неутрофили, алвеоларни макрофаги) и цитокински одговор (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6).

Ефекти ендотоксина на кардиоваскуларни систем одликују се појачаном срчаном радњом, убрзаним пулса и повећаном потрошњом кисеоника што ће условити бржи пролаз крви кроз бубреге и пад васкуларног отпора. Да би се прилагодио новонасталом стању у организму долази до прерасподеле крвотока што је и увод у хипердинамску фазу шока. Повишена температура доприноси појачаном раду кардиоваскуларног система, док промене респираторне функције подразумевају примарно повећан број респирација, пад парцијалног притиска угљен-диоксида и тек касније промена у парцијалном притиску кисеоника као и алвеоларно-епителне пермеабилности. Ендотоксин узрокује и значајно повећања цревне и бубрежне пермеабилности, што ће за последицу имати израженију транслокацију бактерија и самог ендотоксина и развој ендогене сепсе. Повећана потрошња кисеоника главна је метаболичка промена у оквиру ендотоксемије. Највећа потрошња кисеоника је услед повећаног протока крви на нивоу сплахничког крвотока, па се ова појава праћена повећаним метаболизмом, назива сплахнички метаболички одговор (Chang i Li, 2011).

Ендокрини одговор подразумева секрецију хормона стреса, који одржавају хомеостатске механизме за време сепсе и септичног шока и то су: кортизол, глукагон и катехоламини. Присуство ендотоксина у плазми снажно утиче на хипоталамично-питуитарно-адреналну осовину и узрокује снажно лучење АСТН-а, хормона раста, плазматских катехоламина ендорфина и вазопресина. Ендотоксин својим деловањем узрокује и промене у метаболизму гвожђа у смислу пада његовог нивоа у серуму. Из јетре се ослобађају и велике количине CRP-а чије је повећање значајно јер се одржава и 24 сата након последње ендотоксинске стимулације. Хематолошки ефекти ендотоксина зависе од његове количине, тако да у првим сатима, може доћи до леукопеније која се наставља леукоцитозом уз појаву незрелих неутрофила и штапићастих ћелија.

Током ендотоксемије, присутна је и моноцитопенија, као резултат пада броја лимфоцита и моноцита, а значајно се смањује и број тромбоцита.



Циљни орган за деловање ендотоксина је ендотел крвних судова и то путем директног оштећења или преко секундарних медијатора (IL-1, TNF $\alpha$ ). Контрола стварања фибрина зависи од равнотеже која постоји између тромбогених фактора и заштитних механизма који контролишу стварање тромба и фибринолизе. Врло брзо након дејства ендотоксина и развоја сепсе долази до накупљања фибрина и микротромба, самим тим и активације фибринолитичког система, а последично до инсуфицијенције микроциркулације (Siracusano i Girasole, 2009).

Током ендотоксемије синтетишу се РВК, које се стварају у неутрофилима и макрофагима, и ослобађају екстрацелуларно, након излагања хемотаксичним агенсима, имуним комплексима или у склопу фагоцитне активације. Они учествују у процесима оштећења ендотелних ћелија са повећаном пермеабилношћу капилара, инактивацији антипротеаза са последично повећаном деструкцијом структурних компоненти ткива (нпр. еластин) и оштећењу других (туморских) ћелија. У плазми и интерстицијалној течности налазе се антиоксидативни молекули који елиминишу деловање РВК и то су церулоплазмин, фракција трансферина која не садржи гвожђе, ензими супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPx). Сходно томе, утицај РВК у инфламаторним реакцијама зависи од равнотеже између продукције и инактивације ових метаболита од стране ћелија и ткива.

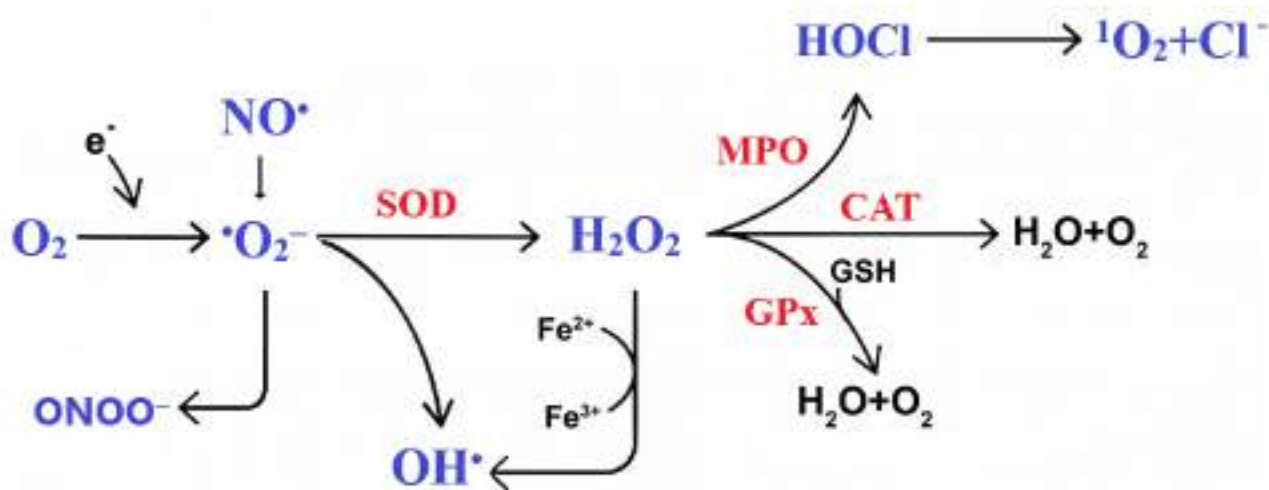
Азот-моноксид (NO) има бројне улоге у настанку сепсе. Ензим азот-моноксид-синтетаза катализује реакцију синтезе NO. Липополисахарид, цитокини и остали проинфламаторни медијатори су моћни активатори iNOS. Превелика продукција азот-моноксида доприноси развоју септичног стања и прогресији у септични шок, јер NO изазива релаксацију глатких мишића крвних судова, доводећи до вазодилатације и последично до хипотензије.

Слободни кисеонични радикали као што су супероксид анијон радикал, водоник-пероксид, хидроксилни радикал и хипохлорна киселина имају физиолошку улогу у неутрализацији бактерија. Ипак губитак контроле води оксидативној модификацији биолошки важних молекула као што су липиди, протеини и нуклеинске киселине. Током ендотоксемије, слободни радикали изазивају липидну пероксидацију и оксидативно оштећење протеина у ћелијским мембранама.

### 1.3. Оксидативни стрес и ендотоксемија

Оксидативни стрес представља стање у коме постоји неравнотежа између стварања реактивних врста кисеоника (РВК) и/или азота (РВА) и способности антиоксидативних система да изврше њихову неутрализацију и уклањање. У физиолошким условима у организму постоји баланс између стварања слободних радикала и антиоксидативне одбране, чиме се спречава појава оксидативног стреса.

Реактивне врсте кисеоника су молекули који садрже кисеоник и имају неспарене електроне, услед чега су нестабилни и веома реактивни. У РВК спадају водоник-пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), супероксидни анјон радикал ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), хидроксилни радикал ( $\text{OH}\cdot$ ) и синглетни кисеоник ( $^1\text{O}_2$ ) (Слика 11).



Слика 11. Механизам стварања реактивних врста кисеоника/азота и механизми антиоксидативне заштите.

Супероксид настаје једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника у процесу оксидативне фосфорилације у митохондријама, и он је прекурсор осталих РВК и пероксинитритног анјона. У реакцији супероксида са  $\text{H}_2\text{O}_2$  у присуству  $\text{Fe}^{3+}$ , ствара се  $\text{OH}\cdot$  (Haber-Weiss-ova реакција). У физиолошким условима супероксид уклања ензим SOD и преводи га у  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Водоник-пероксид у присуству  $\text{Fe}^{2+}$ , парцијалном редукцијом гради хидроксилни радикал (Fenton-ova реакција). Каталаза разлаже  $\text{H}_2\text{O}_2$  на воду и молекулски кисеоник. Глутатион пероксидаза такође има способност детоксикације водоник-пероксида, али и хидропероксида масних киселина у присуству редукованог глутатиона (GSH). Синглетни кисеоник настаје из молекулског кисеоника у присуству светлости (Kowluru, 2003).

У реактивне врсте азота (РВА) спадају азот-моноксид (NO), азот диоксид (NO<sub>2</sub>) радикал и пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>). Азот-моноксид настаје из L-аргинина каталитичком акцијом једне од изоформи ензима азот-моноксид-синтазе (неуроналне - nNOS; ендотелијалне - eNOS и индуцибилне - iNOS) у присуству кисеоника и NADPH. Веће концентрације NO стварају се под дејством iNOS-а и повезују се са настанком многих болести.

Пероксинитритни анион настаје у реакцији супероксида и азот-моноксида. Протоновањем ONOO<sup>-</sup> настаје нестабилна пероксинитритна киселина, која се разлаже на хидроксилни и азот-диоксид радикал. Пероксинитрит је моћан оксидант који изазива оштећење липида мембрана (липидна пероксидација), протеина (оксидација и нитровање тирозина) и нуклеинских киселина (прекид молекула ДНК) (Kowluru, 2003).

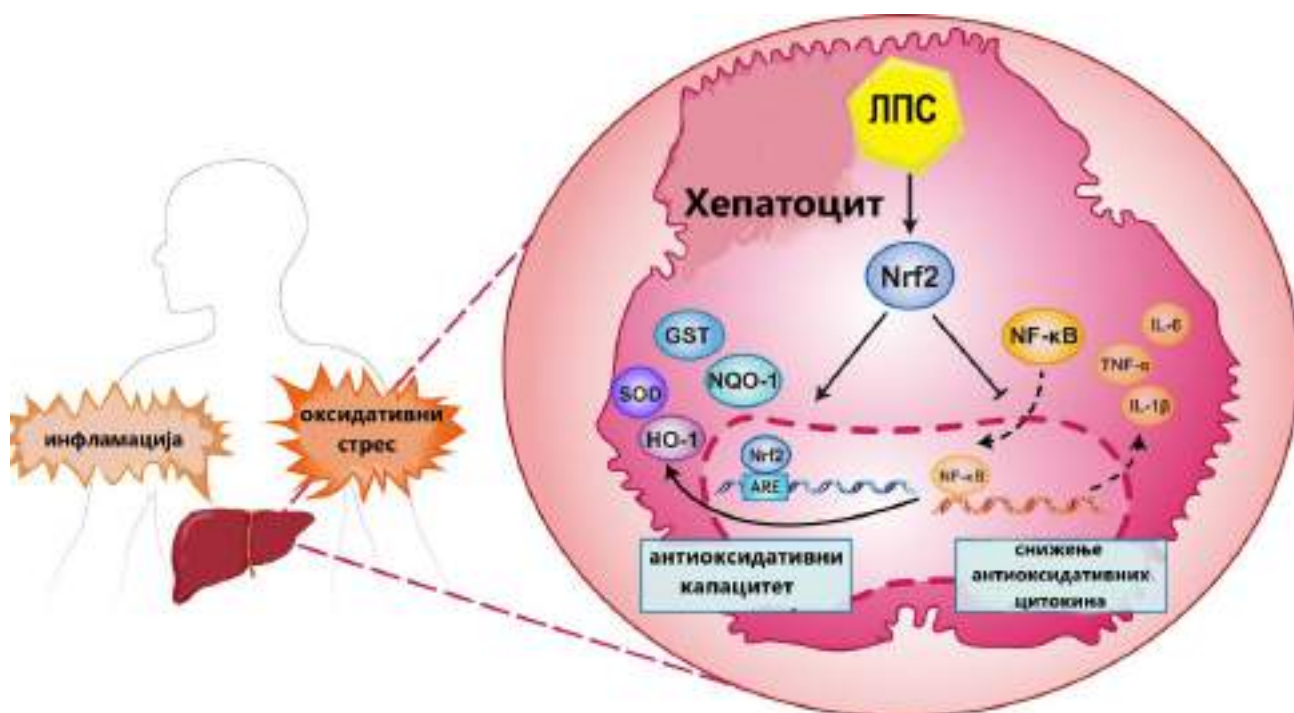
Сем ензима антиоксидативне заштите (SOD, CAT, GPx) за антиоксидативну заштиту значајни су биомолекули као што је глутатион, протеини који везују гвожђе и неензимски антиоксиданси (витамин Е, витамин Ц, мелатонин, аминокиселине и пептиди који садрже тиол групу). Када прооксиданси надвладају заштитни, антиоксидативни капацитет ћелије, долази до повећања интензитета оксидативног стреса.

Липополисахарид се везује за TLR-4 и активира NF-κB, што доводи до ослобађања проинфламаторних медијатора који су укључени у цитозоларну производњу РВК и РВА, и повећања оксидативног и нитрозативног стреса (Liu i sar, 2017; Al-Dossari i sar, 2020). Током оксидативног стреса у ендотоксемији, долази до исцрпљивања и дисфункције антиоксидативне одбране: CAT, SOD, глутатион С-трансферазе (GST), глутатион редуктазе (GR) и GSH, као и истовременог повећања прооксидативних маркера: ксантин оксидазе (ХО), оксидованог глутатина (GSSG) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, што доводи до оштећења ћелија јетре (Shah i sar, 2015; Kurosaki i sar, 1995). Током инфламаторне фазе, РВК изазивају хипертрофију и хиперплазију Kupffer-ових ћелија, које производе и ослобађају бројне штетне и проинфламаторне компоненте које оштећују ћелије паренхима јетре. Успостављено оксидационо стање доводи до оштећења митохондријалне ДНК и поремећаја транспорта електрона и пумпања протона кроз унутрашњу мембрану митохондрија (Suliman i sar, 2003; Quoilin i sar, 2014), као и до смањења мембранског потенцијала. TNF-α изазива некрозу ћелија јетре, ослобађањем еластазе и индукцијом РВК-а из Kupffer-ових ћелија, и стимулише ослобађање NO - индукцијом ензима iNOS, и тако доприноси погоршавање нитрозативног стреса.

#### 1.4. Нуклеарни фактор еритроид 2 као одбрамбени механизам против оксидативног стреса и запаљења током ендотоксемије

Нуклеарни фактор еритроид 2 (Nrf-2) испољава значајан одбрамбени механизам против оксидативног стреса и запаљења. Сигнални пут фактора транскрипције Nrf-2 је укључен у експресију гена који кодирају антиоксидативне ензиме GST, CAT, SOD (Guo i sar, 2017). Доказано је да се током оксидативног стреса, Nrf-2 пут подвргава регулацији како би инхибирао или бар смањило оксидативни стрес, појачавајући активност поменутих антиоксидативних ензима (Ahmadi i Ashrafizadeh, 2020). Познато је да се у условима без оксидативног стреса Nrf-2 континуирано разграђује везивањем за Кеар1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (Kobayashi i sar, 2016). Међутим у присуству интензивнијег оксидативног стреса у условима ендотоксемије, деградација Nrf-2 се зауставља, што доводи до брзе акумулације и активације овог протеина. Нуклеарни фактор еритроид 2, као одговор на оксидативни стрес и појаву РВК-а, преноси се у једро где се везује за ДНК промоторе и покреће транскрипцију гена за антиоксидативне ензиме (Kaspar i sar, 2009).

Доказано је да Nrf-2 инхибира LPS-индуковану експресију проинфламаторних цитокинских гена за TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ . Поред тога Nrf-2 потискује инфламаторни одговор макрофага, блокирањем транскрипције проинфламаторних цитокина (Kobayashi i sar, 2016).



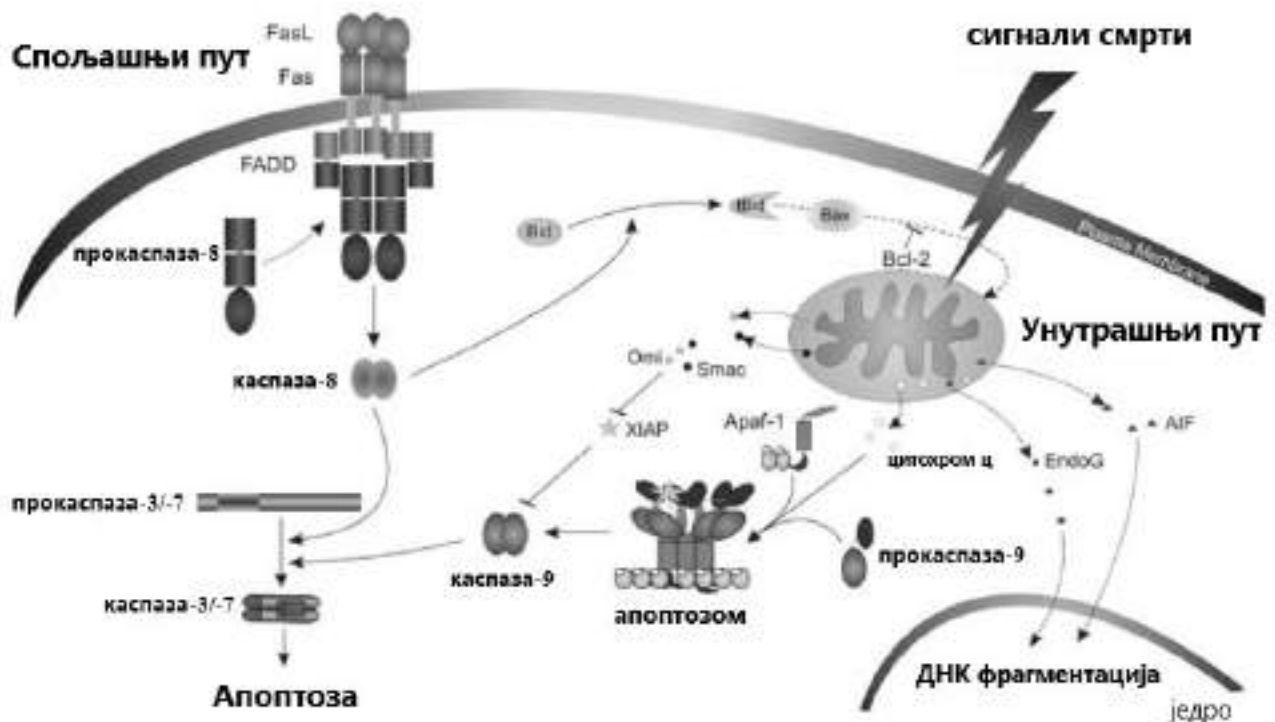
Слика 12. Нуклеарни фактор еритроид 2 (Nrf-2) током ендотоксемије (Dai i sar, 2021).

## 1.5. Апоптоза и ендотоксемија

Апоптоза или програмирана ћелијска смрт представља облик "самоубиства" ћелија (Hengartner, 2000). Она је регулаторни механизам ткивне хомеостазе, која зависи од равнотеже између пролиферације и смрти ћелије. Организам је развио компликовани контролни систем за балансирање равнотеже између живота и смрти. У организму човека сваке секунде се ствара неколико стотина хиљада ћелија процесом митозе, а скоро исти број умире процесом апоптозе у циљу одржања хомеостазе. Апоптотичка сигнализација има значајну улогу у патогенези различитих болести. Смањење апоптозе води у канцер (ћелијска акумулација), аутоимуност (неспособност елиминације аутореактивних лимфоцита), као и инфекцију (немогућност елиминације инфицираних ћелија) (Reed, 2002).

Познато је да апоптозу могу изазвати: физиолошки активатори (неуротрансмитери, недостатак фактора раста, калцијум, гликокортикоиди), активатори настали услед оштећења ("heat shock" протеини, вирусна инфекција, бактеријски токсини, оксиданси, слободни радикали), терапијски агенси (хемиотерапеутски лекови) и токсини (етанол,  $\beta$ -амилоид пептид) (Lang i sar. 2004). Деловањем наведених фактора ћелија улази у апоптозу, која се одвија кроз три фазе: фаза индукције, фаза егзекуције и фаза деградације. Иако наведени фактори различитим механизмима иницирају апоптотични процес, активација каспаза (цистеинских протеаза) представља централну карику апоптотичног процеса. До сада је откривено око 14 различитих каспаза које су, према механизму деловања, подељене у две велике групе. Прву групу, или иницијаторне каспазе, чине цистеинске протеазе способне да врше активацију појединих каспаза, где спадају: каспаза 1, 2, 8, 9, 10 и 12. Другу групу чине ефекторне каспазе (каспаза 3, 6, 7 и 14), способне да врше разградњу бројних ћелијских протеина, резултујући ћелијском смрћу (Danial i Kosmeyer, 2004). Све каспазе се синтетишу у свом инактивном облику, као прокаспазе, поседујући сопствени инактивни домен. Овај инактивни домен, код иницијаторних каспаза је неколико пута већи, у односу на ефекторне каспазе (Yuan i Horvitz, 2004). Иницијаторне каспазе, у свом инактивном домену, садрже CARD (енгл. caspase recruitment) домен (каспазе 2 и 9) или DED (енгл. death effector) домен (каспазе 8 и 10). Захваљујући овим доменима, каспазе могу да реагују са разним другим молекулима, који могу да регулишу њихову активност. Активација иницијаторних каспаза, резултује даљом активацијом ефекторних каспаза, доводећи до каскадне активације каспаза.

Постоје два начина активације апоптозе, спољашњим и унутрашњим путем (Hildeman i sar, 2003) (Слика 13). Спољашњи пут активације апоптозе започиње активирањем рецептора смрти, што доводи до индуковане ћелијске смрти или ACID (енгл. activation induced cell death). То су повшински рецептори који преносе апоптотичке сигнале након везивања специфичних лиганда. Најзначајнији рецептори смрти, који се налазе на површини ћелије и способни су да изазову ACID су: Fas (CD95), TNF-R1, Car1, DR3 (TRAM), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) i DR6. Сви рецептори смрти, у свом интрацелуларном сегменту, поседују DD домене смрти. Код CD95 рецептора, интрацелуларни домен смрти је FADD (енгл. Fas associated death domain) (Yuan i Horvitz, 2004). Активација CD95 рецептора, од стране његовог лиганда (FasL), доводи до формације DISC комплекса (енгл. death inducing signaling complex), који је способен да активира прокаспазу-8 у каспазу-8. Створена велика количина каспазе-8, заједно са каспазом-1, активира прокаспазу-3, која потом улази у једро ћелије и индукује деградациону фазу апоптозе. Уколико дође до активације апоптотичног процеса, преко TNF-R1, долази до активације каспазе-3, преко TRADD-a (енгл. TNF receptor-associated death domain), у комбинацији са FLICE-om (FADD like ICE домен) (Screaton i Xu, 2000). Такође, неки индукциони чиниоци, као што су стрес протеини и оксидативни метаболити, делују директно на прокаспазу-3 и претварају је у активни облик, омогућујући даљи развој апоптотичног процеса (Stepp i sar, 2000). Ћелије које имају капацитет да индукују овај директни, каспаза зависни пут апоптозе се квалификују као ћелије типа 1 (Scaffidi i sar, 1998).



Слика 13. Спољашњи и унутрашњи пут активације процеса апоптозе.

Код ћелија типа 2, сигнал који долази са активираних рецептора смрти не изазива каскадну активацију каспаза, довољно снажну за егзекуцију ћелијске смрти. Овде апоптотички сигнал мора бити појачан преко митохондијалног пута. Интрацелуларни или унутрашњи чиниоци, у које спадају недостатак цитокина, РВК-ом индукована оштећења ћелије, доводе до пасивне ћелијске смрти или АСАД (енгл. activated cell autonomous death) (Scaffidi *i sar*, 1999). Веза између сигнализације каспазама и митохондрија се остварује преко протеина Bid, члана Bcl-2 фамилије. Протеин Bid се активира каспазом-8, а затим улази у митохондрију где делује као и Вах и Вах проапоптотички протеини из Bcl-2 фамилије протеина. Они ослобађају цитохром ц и друге проапоптотичке протеине из митохондрије у цитозол. Цитозоларни цитохром ц везује Аraf-1, који доживљава конформационе промене и ствара структуру која се назива апоптозом. То је комплекс налик точку одговоран за активацију иницијаторне каспазе-9 (Acehan *i sar*, 2002). Активирана каспаза-9 иницира активацију ефекторних каспаза (каспазе 3, 7 и 6) и тиме завршавају апоптозу.

Стварањем активираних каспаза и њиховим уласком у једро ћелије, започиње деградациона фаза апоптозе. У деградационој фази, каспаза-3 и друге активираних каспазе, доводе до разградње многих структуралних и других протеина унутар ћелије. Најпознатији циљни супстрати су: структурни протеини (актин, фодрин), филаментни протеини (кератин-18, плетин), сигнални протеини (Raf-1, Akt-1, D4-GD1, MEKK-1), протеини који регулишу транскрипцију или ДНК репликацију (MDM2, Rb, SREBP 1/2), као и протеини који регулишу ДНК и РНК метаболизам (DNA-PK, PARP, DSEB/RF-C140). Међу циљним протеинима, налази се и ДНК фрагментациони фактор (DFF) који представља хетеродимер, који се састоји од две субјединице: 1) DFF40 или CAD (каспазом стимулирана ДН-аза) и 2) DFF45 или ICAD (инхибитор ДН-азе). У физиолошким условима, DFF40 субјединица је инхибирана DFF45 субјединицом. Активирана каспаза-3 или друге активне каспазе, разлагањем DFF-а ослобађају CAD, која затим улази у једро и врши фрагментацију ДНК молекула, што представља један од кључних морфолошких карактеристика апоптотичне смрти ћелија (Woo *i sar*, 2004).

### 1.5.1. Фрагментација ДНК молекула у процесу апоптозе

Крајњи резултат процеса апоптозе је фрагментација ДНК молекула ендонуклеазама (ДН-азе), које врше разградњу ДНК ланаца на тачно одређеним местима. Ендонуклеазе су ензими који катализују разградњу међу-нуклеотидних веза истовремено на више места унутар молекула нуклеинских киселина.

Последњих година се све више говори о ДН-азама као главним егзекуторима апоптозе, одговорним за интернуклеозомалну фрагментацију ДНК молекула. Интернуклеозомална фрагментација ДНК молекула је маркер апоптозе и представља разлагање хромозомске ДНК на фрагменте величине олигонуклеозома (Wyllie, 1980). Све ДН-азе одговорне за процес апоптозе могу се класификовати у три групе: 1) бикатјонска ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  зависна) или алкална ДН-аза (позната и као ДН-аза I), 2) монокатјонска ( $\text{Mg}^{2+}$  зависна, такође из класе алкалне ДН-азе) или CAD (каспаза-3 зависна ДН-аза) и 3) кисела (катјон независна ДН-аза) или ДН-аза II (Counis i Torriglia, 2000).

#### 1.5.1.1. Алкална ДН-аза (ДН-аза I)

До сада је пронађено неколико алкалних ДН-аза ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  зависна или  $\text{Mg}^{2+}$  зависна или ДН-аза I) које се инхибирају цинком или актином (Lazarides i Lindberg, 1974), са оптималном  $\text{pH}=7,4$ , чије је учешће у ДНК фрагментацији познато. ДН-аза I хидролизује један или оба ланца ДНК при чему настаје 5'-фосфо-три/тетра-олигонуклеотиди. У присуству  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  се врши разлагање једног ланца, док се разлагање дволанчане ДНК дешава у присуству  $\text{Mn}^{2+}$ . Овај ензим учествује у деградацији хроматина током процеса апоптозе. Код људи је идентификовано присуство 4 члана фамилије ДН-азе I и то: ДН-аза I и њена три аналога DNK S<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, DNK S<sub>1</sub>L<sub>2</sub> и DNK S<sub>1</sub>L<sub>3</sub> (Rodríguez i sar, 1997). Доказано је да хумана ДН-аза I садржи 2 цистеина, који су одговорни за дисулфидне везе и стабилност молекула. У активном центру се налазе два хистидина, глутаминска и аспарагинска киселина (Ulmer i sar, 1996). За активност овог ензима важни су аргинин (у положају 41) и тирозин (у положају 76), који омогућавају контакт ДН-азе I и ДНК молекула (Kish i sar, 2001).

#### 1.5.1.2. Кисела ДН-аза (ДН-аза II)

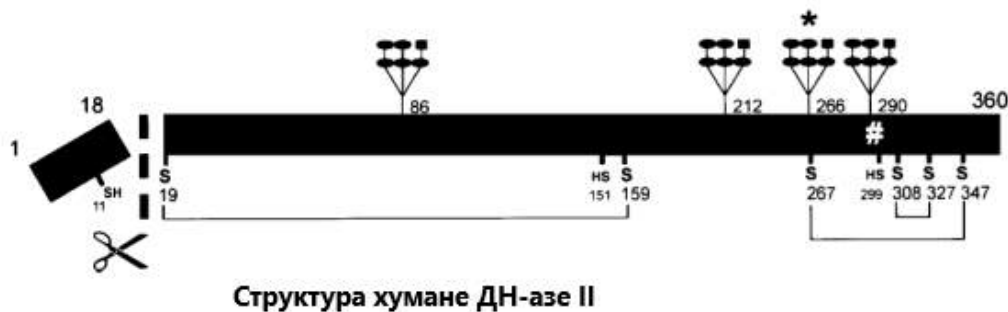
Идентификована је и ДН-аза II, катјон независна, чија је оптимална активност на  $\text{pH}=5$ . ДН-аза II у киселој средини ствара 3'-олигонуклеотиде. То једна од најраније откривених нуклеаза, са биохемијским карактеристикама познатим од 1960. године (Bernardi i Griffe, 1964). Разлагање фосфодиестарске везе се остварује везивањем супстрата за активни центар ензима у којем се налазе остаци хистидина и не зависи од присуства катјона (MacLea i sar, 2002). Деловање ДН-азе II остварује се кроз три фазе.

Иницијална фаза се карактерише индукцијом вишеструких једноланчаних прекида у пределу фосфодиестарске кичме.



Средња фаза се карактерише стварањем киселих-растворљивих нуклеотида и ослобађањем олигонуклеотида величине око 1000 бп или мање.

Терминална фаза се састоји из споријег, нелинеарног хиперхромног померања због даље редукције величине олигонуклеотида. Предоминантна субћелијска локализација ДН-азе II у киселим лизозомима указује да се овај ензим може наћи и у стањима некрозе.



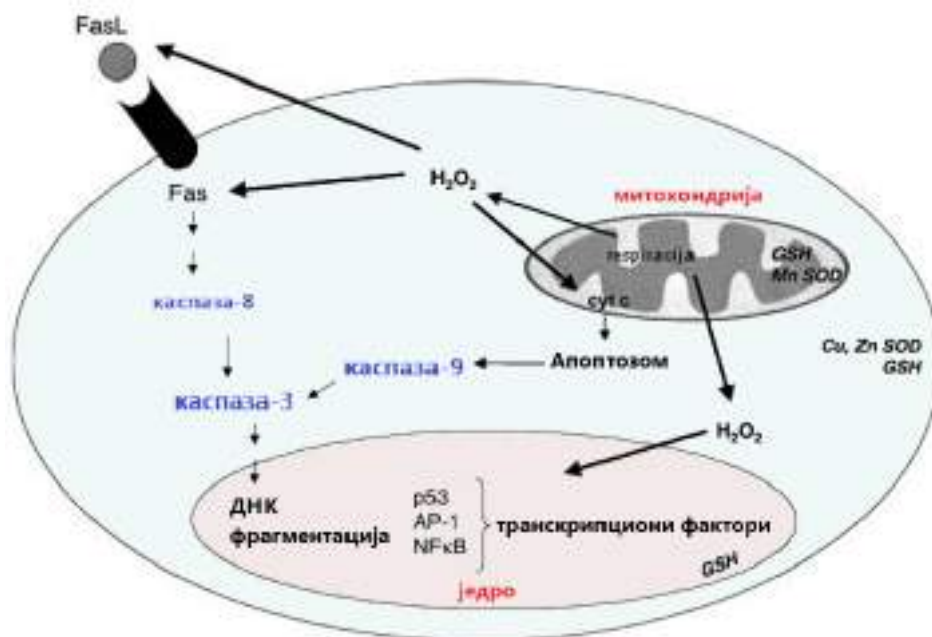
Слика 14. Структура хумане ДН-азе II (MacLea i sar, 2003).

Апоптоза за разлику од некрозе, представља строго регулисану програмирану ћелијску смрт. Она може бити покренута спољашњим или митохондријалним путем (у којем се формирају канали у митохондријалној мембрани кроз које цитохром ц излази у цитозол). Ослобођени цитохром ц покреће каскаду каспаза, која се завршава активацијом каспазе-3 и фрагментацијом ДНК молекула ендонуклеазама (ДНазе I и II). Доказано је да у току ендотоксемије, долази до апоптозе различитих ћелија (Lauková i sar, 2020).

### 1.5.2. Оксидативни стрес и апоптоза

Данас се верује да митохондрија представља један од могућих актера у механизму покретања апоптозе (Ravagnan i sar, 2002). Познато је да митохондрија представља главно место стварања РВК (Morel i Barouki, 1999). Процењено је да од укупне количине кисеоника, који учествује у респираторном ланцу, око 4% кисеоника улази у синтезу супероксидног анјона. У више модела апоптозе, детектован је повећан интензитет оксидативног стреса, непосредно пре финалне активације каспаза, у програмираној ћелијској смрти (Tripathi i Hildeman, 2004). Ови налази су потврђени и испитивањима која су показала да апликација антиоксиданаса, може значајно инхибисати апоптозу ћелија, слично као и при апликацији инхибитора каспаза (McGowan i sar, 1996). Интезивна продукција слободних радикала доводи до активације транскрипционих фактора, као што је NF- $\kappa$ B, који су веома важни у апоптози и инфламацији (Morel i Barouki, 1999).

Експериментално је доказано да РВК могу да активирају процес апоптозе. Доказано је да NO оштећује ДНК (тако повећава степен мутагености), реакцијом са  $\text{O}_2^-$  продукује пероксинитрит који има значајну улогу у цитотоксичним процесима, може да изазове инактивацију антиоксидативних ензима (CAT, SOD), а такође може да покрене процес апоптозе активацијом каспазе-3, индукцијом пропустљивости митохондријалне мембране (МПТ) и активацијом Fas рецептора смрти (Chandra i sar, 2000).



Слика 15. Утицај интрацелуларних РВК на покретање апоптозе (Chandra i sar, 2000).

Доказано је да  $\text{H}_2\text{O}_2$  врши атак на митохондрије и узрокује повећање пропустљивости митохондријалне мембране и излазак цитохрома ц у цитозол. Цитохром ц се везује за Аraf-1 и постаје важан саставни део апоптозома, који покреће каскадну активацију каспазе-9, а затим и каспазе-3. Један од алтернативних путева је да  $\text{H}_2\text{O}_2$  побуђује апоптозу активацијом Fas/FasL система, али друге студије говоре да је он Fas-независтан молекул. Доказано је да транскрипциони фактори могу бити модулирани од стране  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Нуклеарна транслокација p53 је изазвана  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а свеприсутни транскрипциони фактори NF-κB и AP-1 се активирају такође  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Uberti i sar, 1999). Једном активирани ови транскрипциони фактори могу бити покретачи транскрипције про-апоптотичких гена (Chandra i sar, 2000).

## 1.6. Метаболизам Л-аргинина и полиамина

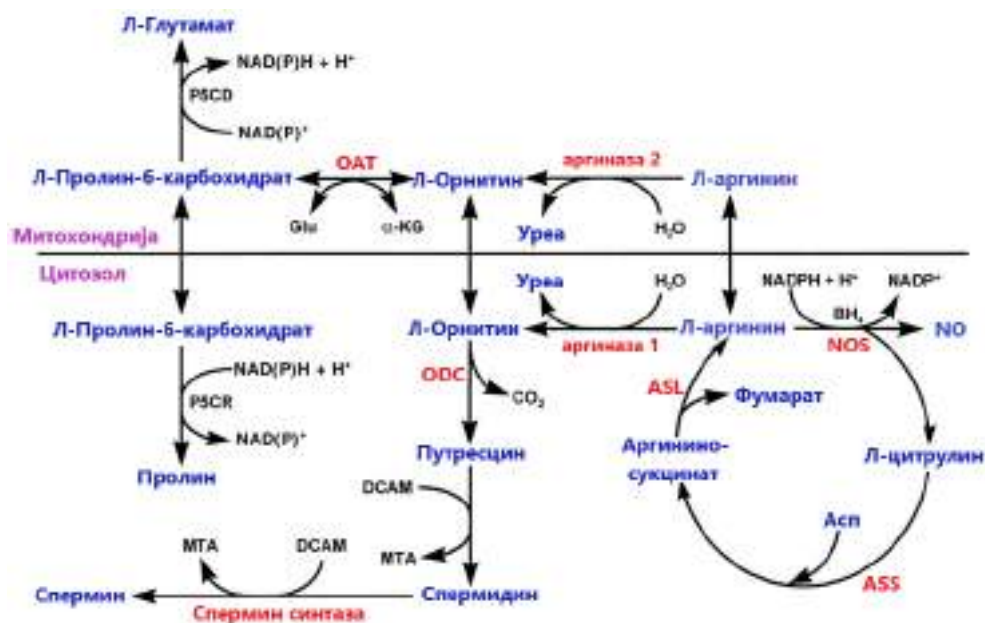
Метаболизми Л-аргинина и полиамина, имају велики значај у многим интеракцијама у ћелији. У многим болестима и патолошким стањима долази до значајних промена у овим метаболичким путевима.

### 1.6.1. Метаболизам Л-аргинина

Л-аргинин је факултативно есенцијална аминокиселина и прекурсор за синтезу протеина, урее и креатина. Централну улогу у метаболизму аргинина има циклус синтезе урее, који представља главни пут детоксикације организма од амонијака (Withers, 1998). Три крајња продукта катаболизма ове аминокиселине су сигнални молекули у ћелији, а то су глутамат, азот-моноксид и агматин. Глутамат се може превести у  $\gamma$ -аминобутерну киселину (GABA), главни инхибиторни неуротрансимер.

#### 1.6.1.1. Аргиназа и катаболизам аргинина

Под дејством аргиназе, аргинин се разграђује на уреу и орнитин. Орнитин под дејством орнитин декарбоксилазе (ODC) прелази у путресцин, деловањем орнитин аминотрансферазе се метаболише у глутамат, или помоћу орнитин транскарбамоилазе се катаболише у цитрулин (Nikolić i sar, 2003). Аргиназа је Mn-завистан ензим, који поседује две изоформе (аргиназа I и II), а његов оптималан рН је 9,0 - 9,5. Активност цитозоларне аргиназе I је откривена у перипорталним хепатоцитима и она учествује у циклусу синтезе урее, док је аргиназа II доказана у мозгу, бубрегу и танком цреву (Gotoh i sar, 1997). Цитозолна аргиназа је важна у синтези полиамина, а митохондријална аргиназа у биосинтези глутамина и пролина (Louis i sar, 1999; Nikolić i sar, 2007). Хипотеза да аргиназа може да регулише доступност аргинина за синтезу полиамина је доказана чињеницом да је активност аргиназе коиндукована са ODC-ом и да ћелије са дефицитом аргиназе не могу да пролиферишу у медијуму без додатка орнитина и полиамина (Слика 16).



Слика 16. Метаболизам Л-аргинина и полиамина.

### 1.6.1.2. Азот-моноксид и цитрулин

Из аргинина се под дејством азот-моноксид-синтазе, врши цепање терминалног гванидино азота при чему се ствара цитрулин и ослобађа NO. Азот-моноксид-синтаза заправо катализује реакцију L-аргинина, NADPH и кисеоника, при чему настају NO, цитрулин и NADP (Martella, 1994). Овај ензим поседује три изоформе: nNOS (нервно ткиво), iNOS (индуцибилна) и eNOS (ендотелна). Ове изоформе су Ca зависне (осим iNOS) и продукују NO као одговор на физиолошке стимулусе. Деловањем конститутивних изоформи NOS настаје NO који је постојан свега неколико секунди или минута, док iNOS продукује азот-моноксид, сатима или данима.

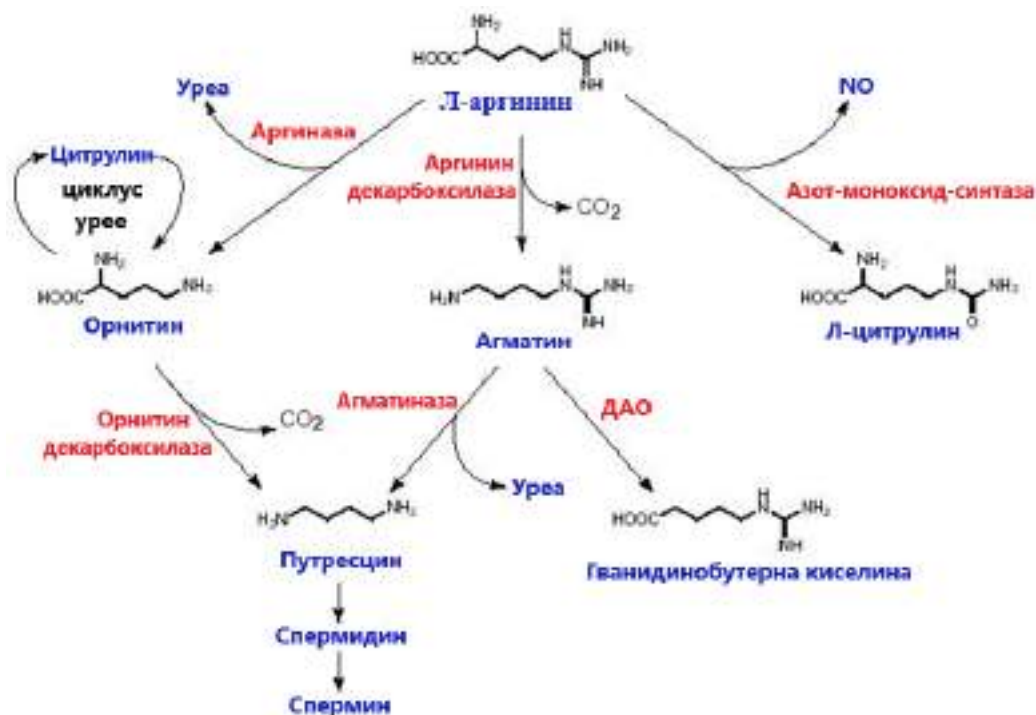
Азот-моноксид је високо реактивни молекул, који брзо дифундује кроз ћелијске мембране, ствара комплексе са различитим молекулима и остварује ефекте у свим органима. Осим ћелија васкуларног ендотелијума и активираних макрофага, за које је недвосмислено утврђено да поседују механизме којима се NO синтетише из аргинина, он се ствара и у ћелијама ЦНС-а, тимуса, јетре, плућа, бубрега, тестиса, гастроинтестиналног тракта (Beskapan i Korpenol, 1996). Најновија истраживања говоре да је NO битан за регулацију васкуларног тонуса, неуротрансмисију и имуни одговор (Liaudet i sar, 2000). Биолошки ефекти NO су протективни (антиоксидативни, инхибиција адхезије леукоцита, смањење токсичности TNF- $\alpha$ ), регулаторни (васкуларни тонус, адхезија ћелија, васкуларна пермеабилност, неуротрансмисија, бронходилатација, инхибиција адхезије тромбоцита, функција бубрега) и некад токсични (инхибиција неких ензима, оштећење ДНК молекула, липидна пероксидација, смењење антиоксидативних депоа) (Gow i sar, 1999).

Азот-моноксид у реакцији са кисеоником се преводи у азот-диоксид (NO<sub>2</sub>). У ћелијама молекулски кисеоник није примарна мета NO. Азот-моноксид радије реагује са супероксид анјон радикалом, стварајући снажан оксидант - пероксинитрит (Murphy, 2000). Пошто поседује неспарени електрон, NO може брзо да реагује са  $\cdot\text{O}_2^-$ , када се ствара ONOO $\cdot$ . Брзина ове реакције је већа од оне којом SOD катализује димутацију  $\cdot\text{O}_2^-$  у водоник-пероксид (Hule i Padmaja, 1993). Створени пероксинитрит реагује са бројним молекулима, делујући као оксидантни и нитришући агенс. Он врши нитровање тирозина и тирозинских остатака и ствара нитротирозин.

Азот-моноксид може да нитрозилише тиол групе и при томе прелази у нитрозонијум јон (NO<sup>+</sup>). Овај јон реагује са тиол групама, стварајући нитрозотиоле који могу да преносе NO<sup>+</sup> групу на друге сулфхидрилне групе протеина, стварајући стабилније ковалентне везе.

Сматра се да су реакције нитровања и нитрозилације важне у деловању NO, као што су инхибиција аденил циклазе, активација протеин киназе Ц, инхибиција NMDA рецептора у можданом ткиву, нитрозилација рецептора. Нитровање остатка тирозина и цистеина у нуклеопротеидима и последична активација или инхибиција ових молекула налазе се у основи биолошког одговора на NO у ткивима (Van der Vliet i sar, 1995).

Из аргинина декарбоксилацијом под дејством специфичне митохондријалне аргинин декарбоксилазе (ADC), настаје агматин (4-аминобутил-гванидин) (Слика 17). Galea i sar. (1996) су доказали да је агматин компетитивни инхибитор NOS, нарочито његове индуцибилне изоформе. Агматин заправо доводи до повећања или смањења експресије NOS, у зависности од типа и функције ћелије. У ендотелним ћелијама он повећава синтезу NO. У микроглијалним ћелијама агматин смањује продукцију NO, изазвану токсичним липополисахаридом бактерија (Abe i sar, 2000).



Слика 17. Метаболички путеви Л-аргинина и агматина (Reis i sar, 2000).

### 1.6.2. Полиамини

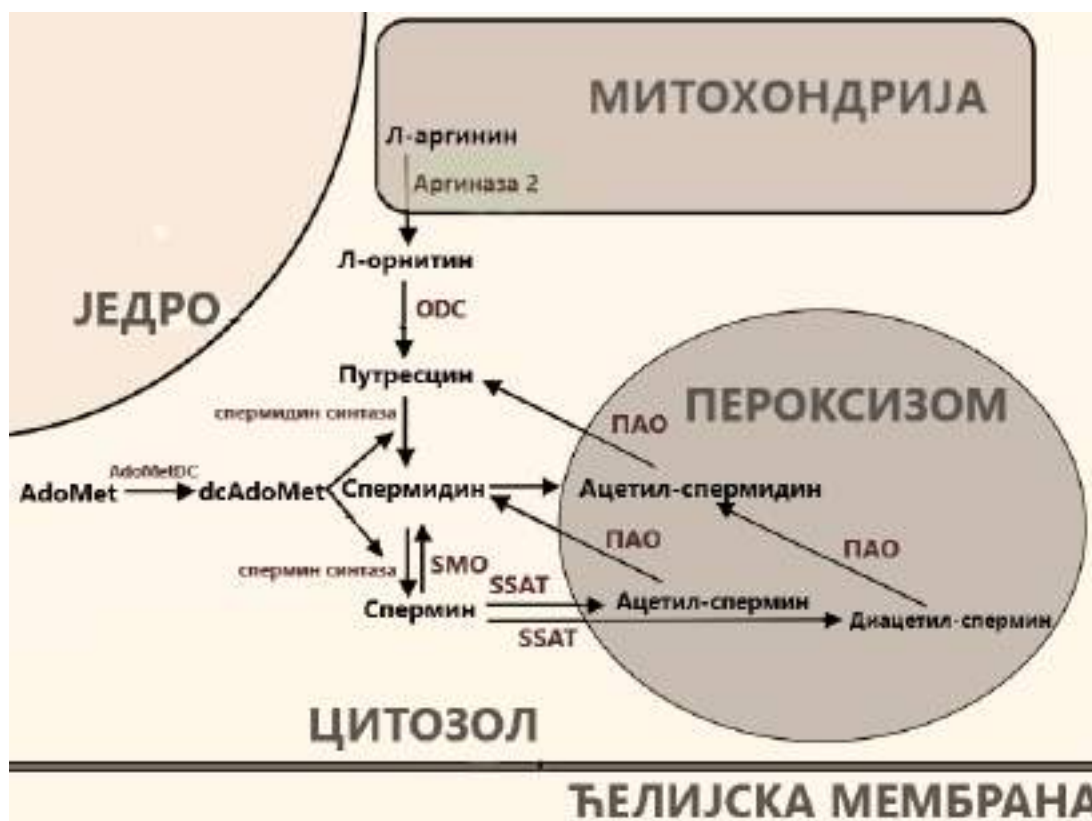
Полиамини (спермин и спермидин) и њихов прекурсор диамин путресцин, представљају непротеинске азотне базе мале молекулске масе, присутне у свим живим системима. Полиамини у ћелијама дисосују као поликатјони, и њихови молекули су носиоци позитивног наелектрисања. Захваљујући интеракцији са нуклеинским киселинама, они су укључени у виталне процесе, раста, деобе и диференцијације ћелија, а тиме и у регенеративним, репаративним и пролиферативним процесима (Bjelaković i sar, 2007).

Акумулација полиамина у ћелијским мембранама и ћелијском зиду, указује на њихову улогу у регулацији пермеабилности ових структура за различите материје (Schuber, 1989). У хуманим ткивима, највише полиамина има у простати, панкреасу, косној сржи, тимусу, јетри, мозгу, а знатно мање у еритроцитима и крвној плазми.

Полиамини се сматрају есенцијалним за живот, пошто инхибитори биосинтезе полиамина блокирају раст ћелија. Они имају специфичну улогу у ембрионалном развоју, ћелијском циклусу, неурохемији, функцији имуног система, апоптози и канцеру (Thomas i Thomas, 2001).

### 1.6.2.1. Метаболизам полиамина

Биосинтеза полиамина се врши из аминокиселина, Л-орнитина и Л-метионина, уз учешће више ензима. Превођење Л-аргинина у Л-орнитин, под дејством аргиназе је први корак у процесу синтезе полиамина. Иницијална и лимитирајућа реакција у биосинтези полиамина је декарбоксилација Л-орнитина, под дејством специфичне орнитин декарбоксилазе (ODC) и формирање путресцина. Други пут биосинтезе путресцина подразумева декарбоксилацију Л-аргинина при чему настаје агматин. Путресцин из агматина може настати директно, под дејством агматиназе или преко N-карбамоил путресцина (уз издвајање амонијака) (Слике 17 и 18).



Слика 18. Метаболизам аргинина, орнитина, путресцина, спермидина и спермина (Janne i sar, 2004).

За даљу синтезу полиамина потребна су два молекула декарбоксилисаног С-аденозилметионина (SAM). Под дејством спермидин-синтазе, преноси се једна аминок-пропил група са С-метил-тиоаденозил-хомоцистеина на путресцин, при чему настаје спермидин. Даљом кондензацијом спермидина са још једним молекулом С-метил-тиоаденозил-хомоцистеина, под дејствојм спермин-синтазе, настаје спермин. С-аденозилметионин је извор аминок-пропил група неопходних за синтезу спермидина и спермина (Слика 18).

У ћелијама сисара, физиолошки пут катаболизма полиамина остварује се интрацелуларном конверзијом полиамина. Док су реакције биосинтезе спермидина и спермина иреверзибилне, интерконверзија полиамина натраг у путресцин је могућа и остварује се деловањем два ензима: спермидин/спермин N<sup>1</sup>-ацетил трансферазе (SSAT) и полиамин оксидазе (ПАО). Данас се све више овај процес интерконверзије полиамина означава и као путресцински циклус (Thomas i Thomas, 2001). Први корак у процесу интерконверзије полиамина је ацетилација спермина на N<sup>1</sup> позицији, под дејством SSAT, при чему настаје N<sup>1</sup>-ацетил-спермин. У следећој етапи он је супстрат ПАО, која катализује оксидативну дезаминацију овог једињења, при чему настаје спермидин, уз издвајање једног молекула 3-ацетамидопропанала и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Конверзију спермидина у путресцин такође катализују ова два ензима аналогним реакцијама. Такође је откривена спермин-оксидаза (SMO) која може да конвертује спермин назад у спермидин, без потребе за ацетилисањем спермина (Слика 18).

Путресцин се може даље подвргнути оксидативној дезаминацији једне аминок-групе, под дејством ензима диамино оксидазе (ДАО), при чему настаје  $\gamma$ -аминобутиралдехид, а из њега GABA. У ЦНС-у формирање GABA из путресцина под дејством ДАО је минимално, због мале активности овог ензима у мозгу. Највећи део путресцина се у мозгу сисара физиолошки разграђује директним путем преко моноацетил-путресцина, који се оксидативном дезаминацијом под дејством моноамино оксидазе (МАО) преводи у N-ацетил- $\gamma$ -аминобутират алдехид, који се затим деацетилише у GABA (Seiler i Al-Terib, 1974). GABA је главни инхибиторни неуротрансмитер у ЦНС-у сисара. Резултати који се односе на активност ПАО и ДАО у ткиву јетре и слезине доказују да ова два ензима играју кључну улогу у одржавању укупног садржаја полиамина у ткивима сисара (Bjelaković i sar, 1987).

*Ензим полиамин оксидаза (ПАО).* Овај ензим учествује у процесу биодеградације полиамина, катализујући реакције оксидације аминок-групе унутар ланца полиамина (спермина, спермидина или њихових ацетилисаних деривата), цепајући њихов молекул на полиамин са краћим ланцем и један молекул 3-ацетамидопропанала, уз издвајање H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Полиамин оксидаза је флавин ензим (кофактор је FAD), делује при рН=10, а највећа специфична активност овог ензима је доказана у пероксизомалној фракцији ћелија бубрега и јетре. До сада је откривено четири изоензима ПАО, од којих сваки има другачију супстратну специфичност (Volkenius i Seiler, 1981). Доказано је да ПАО највише преферира на N<sup>1</sup>-ацетил спермин, док SMO преферира на спермин. Највећа активност ПАО у ткивима човека је доказана у јетри, тестисима и бубрезима. У серуму gravidних жена доказана је повећана активност ПАО у другом и трећем триместру.

Доказано је да је активност овог ензима већа или је у равнотежи са активношћу ензима биосинтезе полиамина, те се на основу тога може закључити да он игра значајну улогу у регулацији количине полиамина у ткивима сисара. Сматра се да ПАО задржава путресцински део молекула полиамина у ћелији, у условима када је потребно да се снизи садржај спермина и спермидина.

*Ензим диамино оксидаза (ДАО).* Он је кључни ензим терминалног катаболизма полиамина. Он катализује реакцију оксидативне дезаминације путресцина, кадаверина и хистамина, при чему настају одговарајући аминокaldeхиди, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NH<sub>3</sub>. Реакција се одвија у присуству кисеоника, као акцептора водоника и електрона. ДАО је локализована у микрозомалној фракцији и значајно је концентрисана на глатком ендоплазматском ретикулуму. Оптимални рН за дејство овог ензима је 7,0 - 7,4 (неутрална средина). Коензим овог ензима је пиридоксал фосфат, преко чије алдехидне групе се овај ензим везује за свој супстрат-диамин. Диамино оксидаза спада у групу аминокaldeхаза које садрже бакар. Агенси који везују бакар (нпр. диетилтиокарбамат), инхибиторно делују на активност овог ензима. Двовалентни бакар улази у састав простетичне групе ензима.

ДАО може деловати на већи број супстрата, тј. на ароматичне и алифатичне диамине са највише шест угљеникових атома у молекулу. Алифатични амини су бољи супстрати овог ензима од ароматичних, а најбољи од њих је путресцин. Доказано је да садржај путресцина у ткивима пацова има регулаторну улогу у односу на активност ДАО у истим ткивима.

Водоник-пероксид и аминокaldeхиди произведени током деградације полиамина, имају цитототоксична својства и могу учествовати у покретању програмиране ћелиске смрти (Pachment i Pierce, 1989). Удружено деловање SSAT и ПАО у ацетилацији и оксидацији полиамина доводи до продукције H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> који делује као индуктор SSAT и апоптозе и узрокује један јасан кружни апоптотични сигнал ћелије.



### 1.6.2.2. Метаболизам полиамина и ендотоксемија

Доказано је да у току сепсе, долази до промене нивоа полиамина (спермина, спермидина и путресцина), као и активности два кључна ензима укључена у регулацији њиховог метаболизма (ПАО и ДАО) (Nikolic i sar, 2007). Током ендотоксемије, у току које долази до оштећења функције бубрега, доказано је смањење активности ПАО (Zahedi i sar, 2010). Катаболизам спермина и спермидина, активношћу ПАО доводи до повећања високо токсичних метаболита ( $H_2O_2$  и 3-ацетаминопропанала, који отиче у акролеин). Токсичан  $H_2O_2$  може довести до липидне пероксидације, оксидативне модификације протеина, покретања апоптозе (изазива пораст активности каспазе-3), али такође може да обезбеди супстрат за МПО. Смањена активност аргиназе (цурењем ензима из оштећених хепатоцита у циркулацију, ослобађањем лизозомалних ензима и смањеним концентрацијама IL-4 и IL-13) (Hesse i sar, 2001), праћена је повећањем нивоа NO и преусмеравањем метаболизма аргинина ка синтези цитрулина, а не ка биосинтези полиамина (који су значајни за пролиферацију и регенерацију ћелија) (Nikolic i sar, 2007). Током сепсе, NO реагује са  $\cdot O_2^-$  и ствара цитотоксични ONOO<sup>-</sup>, који индукује липидну пероксидацију и оштећење ДНК молекула (Laskin i Laskin, 2001). Доказано је да егзогена примена антиоксиданса мелатонина регулише биосинтетски ген за полиамине и смањује активност ензима ПАО и ДАО (Quinet i sar, 2010).

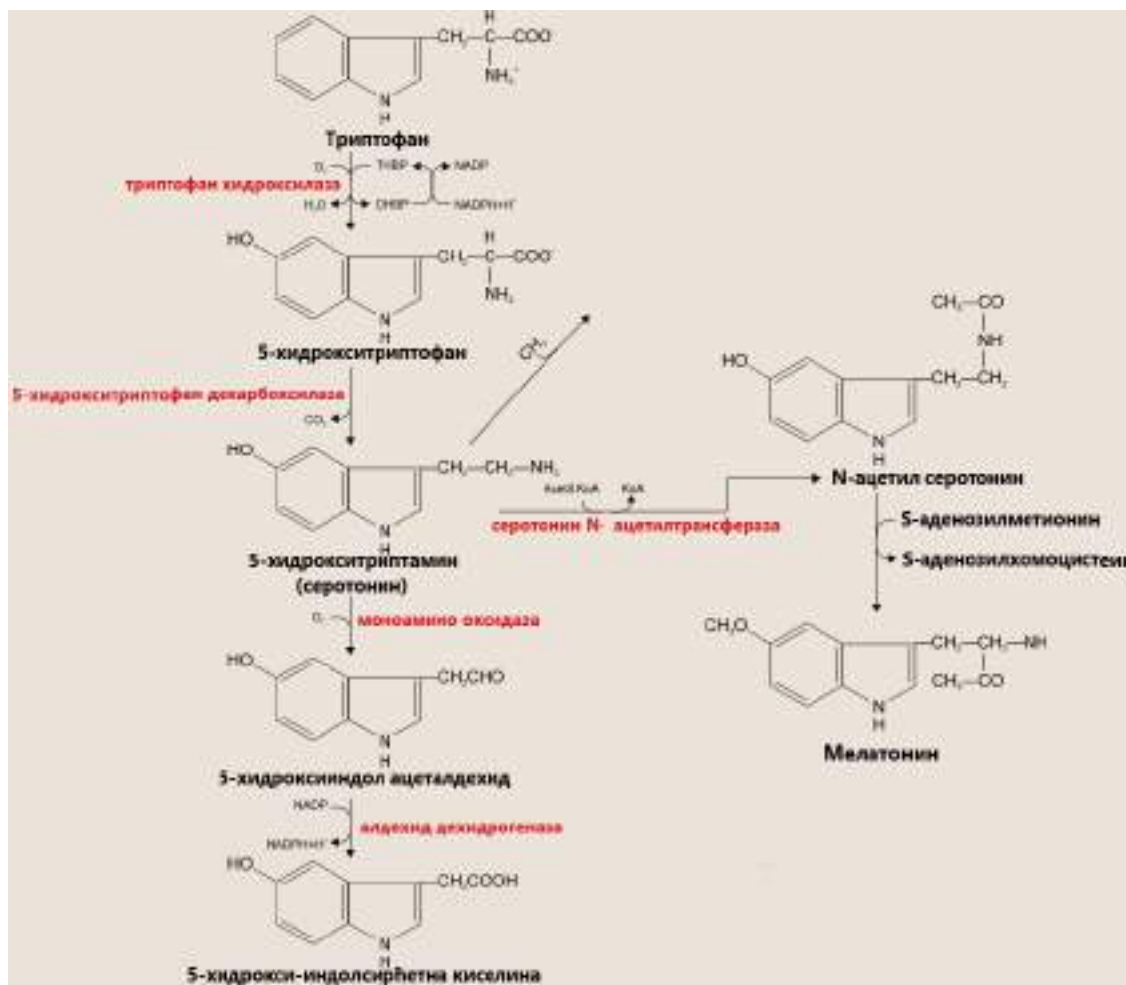
## 1.7. Мелатонин

Мелатонин (Мел) је по хемијској структури N-ацетил-5-метокси триптамин, он је неурохормон, а први пут је изолован 1958. године из пинеалне жлезде говечета (Lerner i sar, 1958). Највећи део циркулишућег мелатонина се синтетише у пинеалној жлезди у току ноћи (јер његову синтезу и секрецију инхибише светлост), а делом се синтетише и у екстрапинеалним ткивима као што су ретина, гастроинтестинални тракт, кожа, лимфоцити (Carrillo-Vico i sar, 2004), плацента, тимус, мождано ткиво и коштана срж (Sahelian, 1996). Због тога што су његове концентрације у крви значајно веће током ноћи и скоро немерљиве током дана, често се назива "хормон таме" (Reiter, 1991). Мелатонин утиче на сан, радну активност, температуру тела, активност вегетативног, дигестивног и кардиоваскуларног система. Доказано је да овај хормон успорава или чак спречава процес старења и развој канцера (Dun-Xian i sar, 2007).

### 1.7.1. Биосинтеза, разградња и регулација синтезе мелатонина

Мелатонин се не депонује у пинеалној жлезди већ дифундује из ћелија у крвоток, а његов полуживот у циркулацији је око 20 минута (Simonneaux i Ribelayga, 2003). Због чињенице да се не депонује и да има кратак полуживот, сматра се да концентрација измерена у серуму, верно одражава синтезу мелатонина у пинеалној жлезди.

Синтеза мелатонина из триптофана се одвија кроз низ ензимских реакција, тако што се најпре у митохондријама под дејством триптофан хидроксилазе синтетише 5-хидрокситриптофан који се конвертује у 5-хидрокситриптамин (серотонин), под дејством 5-хидрокситриптофан декарбоксилазе у цитозолу. Серотонин се затим ацетилише под дејством ензима N-ацетил трансферазе у N-ацетил серотонин. Метилацијом N-ацетил серотонина под дејством хидроксииндол-O-метил трансферазе/ацетил серотонин метил трансферазе, уз учешће SAM-а настаје мелатонин. Деловањем моноаминооксидазе (MAO) серотонин се разлаже оксидативном дезаминацијом у 5-хидрокси-индолсирћетну киселину која се излучује урином (Слика 19) (Simonneaux i Ribelayga, 2003; Reiter i sar, 2014).



Слика 19. Биосинтеза мелатонина.

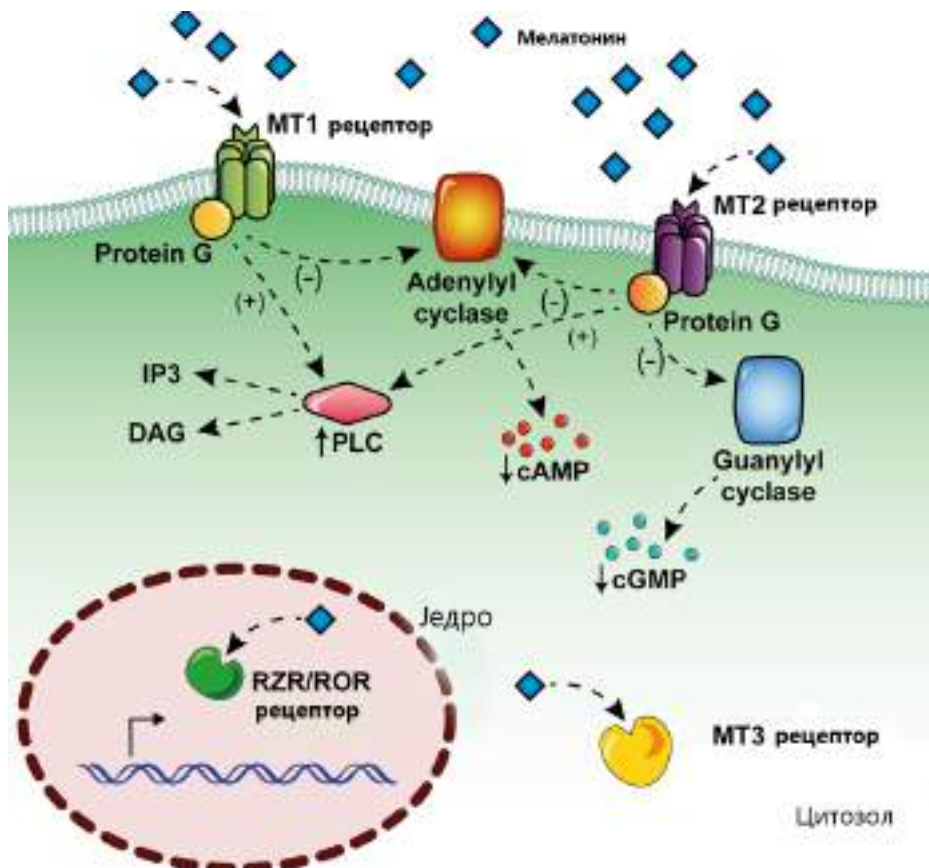
Разградња мелатонина у јетри, одвија се тако што се најпре хидроксилише путем СYP P450 ензима у 6-хидроксимелатонин, затим коњугује са активним сулфатом или глукуронском киселином и излучује урином. Алтернативни пут катаболизма у току кога из мелатонина настају 5-метокси индол-сирћетна киселина и 5-метокситриптофол, као и кинурички пут у току кога настаје N1-ацетил-N2-формил-5-метокси кинурамин (AFMK) су од мањег значаја (Slominski i sar, 2012).

Биосинтеза мелатонина регулисана је механизмом који се налази у супрахиазматском једру хипоталамуса (SCN, енгл. *suprachiasmatic nucleus*) (Perreau-Lenz i sar, 2004), чији неурони испољавају 24-часовну активност која се огледа у ритмичној експресији осцилирајућих гена (Benarroch, 2008). Неурони SCN-а, који примају влакна ретинохипоталамичког пута, инхибирају неуроне паравентрикуларног једра хипоталамуса, чији се аксони спуштају до преганглијских симпатичких неурона смештених у бочном рогу цервикалног сегмента кичмене мождине, а који путем горњих цервикалних ганглија дају инервацију за пинеалну жлезду (Benarroch, 2008). Норадреналин је неуротрансмитер којег ослобађају постганглијска влакна одговорна за инервацију пинеалне жлезде и он остварује инхибиторне ефекте на синтезу мелатонина везујући се за  $\beta$ - и  $\alpha$ -адренергичке рецепторе. Након везивања за  $\beta$ -адренергичке рецепторе, норадреналин, доводи до пораста интрацелуларног cAMP у пинеалцитима и активације cAMP зависне протеин киназе A, која фосфорилише и инхибира главни регулаторни ензим биосинтезе мелатонина N-ацетил трансферазу (Schomerus i sar, 2002). Алфа-1 адренергички рецептори активирани норадреналином, додатно потенцирају  $\beta$ -адренергичку активност порастом интрацелуларне концентрације калцијума и активацијом протеин киназе C. Синтеза мелатонина инхибирана је видљивом светлошћу (таласне дужине од 460 до 480 nm), импулсима који се преносе из супрахиазматског у паравентрикуларно једро хипоталамуса. Смањење изложености светлу доводи до попуштања ове инхибиције, чиме се активира синтеза мелатонина.

### 1.7.2. Ефекти мелатонина

Мелатонин своје ефекате испољава путем две врсте мембранских рецептора, MT1 и MT2 (G протеин везани рецептори) (Слика 20). Мелатонински рецептор 1 (MT1) је интегрални мембрански протеин изграђен од 350 аминокиселина, удружен са  $G_i$  и  $G_q$  субјединицом (Slominski i sar, 2012) и налази се у мозгу, ретини, кардиоваскуларном систему, имуном систему, полним жлездама, надбубрежној жлезди, кожи, дојци, плаценти, бубрегу, јетри, слезини и панкреасу (Pandi-Perumal i sar, 2008).

Мелатонински рецептор 2 (MT2) је интегрални мембрански протеин изграђен од 363 аминокиселине, удружен са  $G_i$  субјединицом и присутан је у мозгу (хипоталамус), хипофизи, ретини, имуном систему, полним жлездама, гастроинтестиналном тракту, масном ткиву и кожи (Slominski i sar, 2012). Мелатонински рецептор 3 (MT3) је заправо ензим хинон редуктаза 2, укључен у заштиту од оксидативног стреса, а налази се у јетри, бубрегу и кардиоваскуларном систему, мрком масном ткиву и мозгу (Слика 20) (Nosjean i sar, 2000).

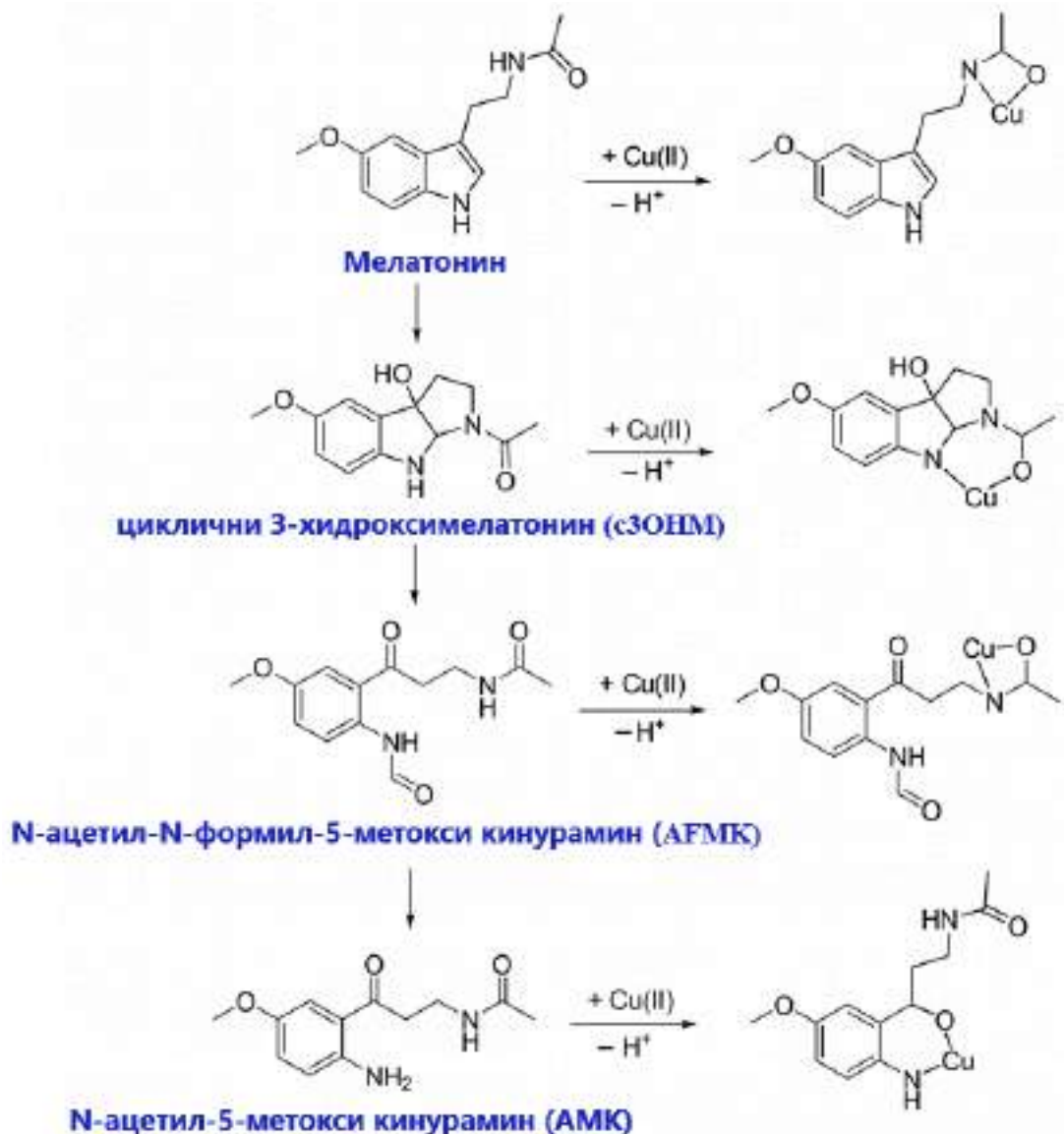


Слика 20. Рецептори мелатонина (MT1, MT2 и MT3) (Tarocco i sar, 2019).

### 1.7.2.1. Антиоксидативни ефекти мелатонина

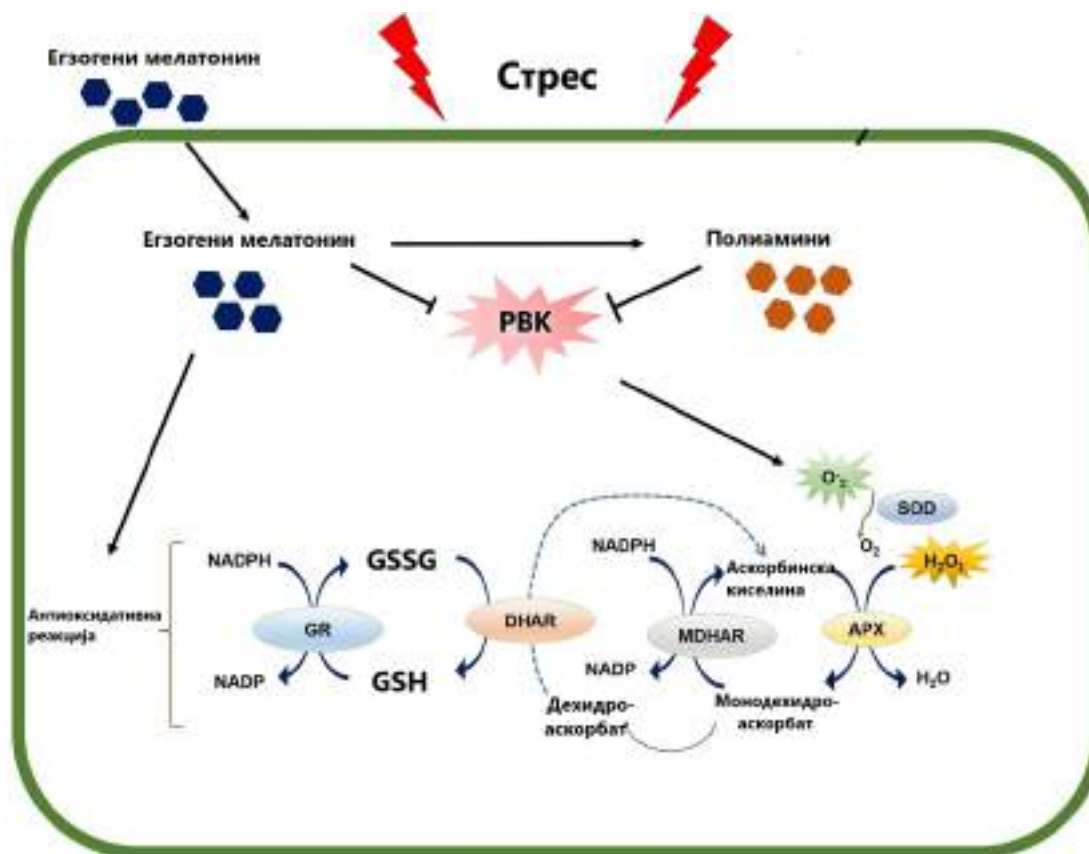
Молекул мелатонина има јако изражене антиоксидативне ефекте. Мелатонин, али и његови матаболити имају способност да директно уклањају слободне радикале. У реакцији мелатонина и два донора електрона, настаје циклични 3-хидроксимелатонин (с3ОНМ), који има антиоксидативне ефекте, као и N1-ацетил-N2-формил-5-метокси кинурамин и N1-ацетил-5-метокси кинурамин (АМК) који чине антиоксидативну каскаду мелатонина, која омогућава једном молекулу мелатонина да неутралише и више од четири молекула слободних радикала (Tan i sar, 2001).

Мелатонин има способност хелатизације алуминијума, олова, кадмијума, бакра, гвожђа и цинка, тако да се његова способност да везује метале са променљивом валенцом (гвожђе и бакар), огледа у спречавању Fentonove и Haber-Weis-ове реакције у којима се ствара хидроксилни радикал (Слика 21).



**Слика 21.** Процес трансформације мелатонина и његових метаболита у уклањању слободних радикала и хелатизацији метала са променљивом валенцом (Reiter i sar, 2016).

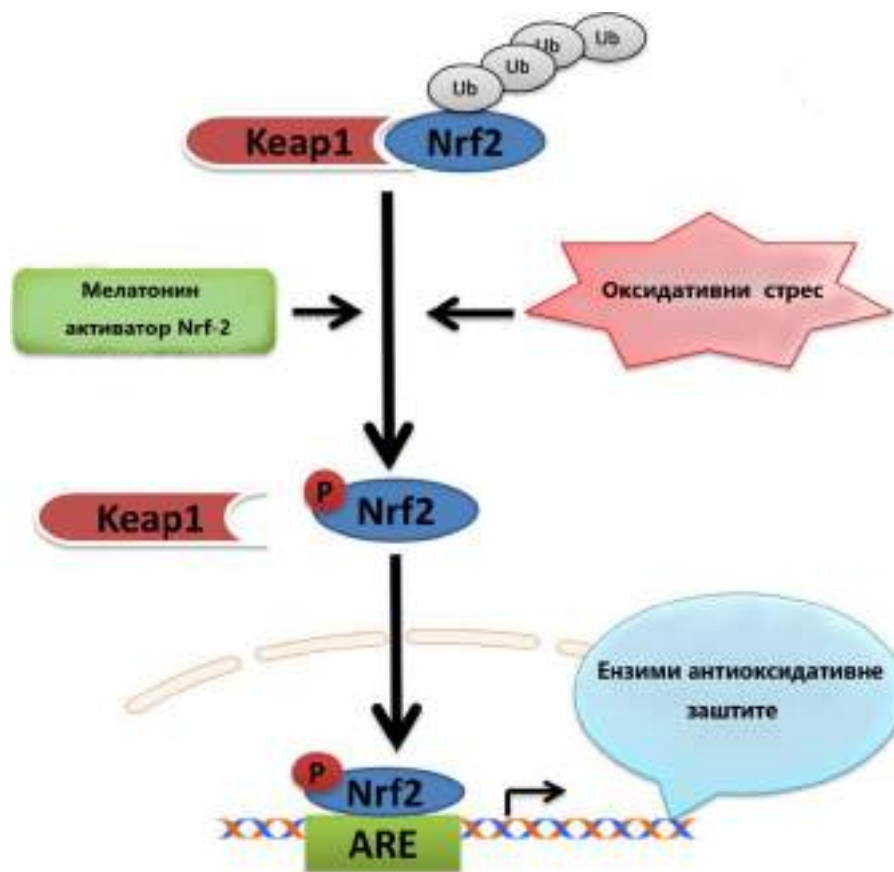
Доказано је да мелатонин пролази мембрану митохондрија и у овој органели повећавајући стабилност респираторног ланца, смањује стварање супероксидног анјона и неутралише штетно дејство слободних радикала на месту њиховог стварања (Reiter i sar, 2016). Мелатонин стимулише синтезу и активност антиоксидативних ензима укључујући GR, GPx, CAT и SOD (Fischer i sar, 2013), а мења и однос редукованог и оксидованог глутатиона (GSH/GSSG) у корист редуковане форме, која има велики значај за антиоксидативну заштиту (Winiarska i sar, 2006).



Слика 22. Антиоксидативни ефекти мелатонина (Tiwari i sar, 2022).

Доказано је да мелатонин смањује интензитет оксидативног оштећења у ткиву јетре, кроз уклањање слободних радикала, инхибицију извора РВК (смањује формирање ONOO<sup>-</sup>), као и кроз стимулисање синтезе антиоксидативних ензима (GPr, GR, глукозо-6-фосфат дехидрогеназе, CAT) (Ničković i sar, 2018). Мелатонин испољава хепатопротективне ефекте у јетри пацова третираних ЛПС-ом, смањењем производње NO, смањењем липидне пероксидације, повећањем активности SOD-а и спречавањем апоптозе хепатоцита (Wang i sar, 2004).

Мелатонин своје антиоксидативне ефекте делимично остварује стимулацијом Nrf-2/ARE сигналног пута (Слика 23), повећавајући синтезу ензима антиоксидативне заштите (Hristova i sar, 2018). Нуклеарни фактор еритроид 2 је редокс сензитивни транскрипциони фактор који интерагује са Kelch ECH асоцираним протеином 1 (Keap1). Он се активира када повећана концентрација слободних радикала доведе до оксидације и ковалентне модификације Кеар1 протеина. Након активације која подразумева одвајање Кеар1 протеина и фосфорилације, Nrf-2 прелази у једро и везује се за елемент антиоксидативног одговора (ARE, енгл. antioxidant response element) који иницира транскрипцију гена укључених у регулацију синтезе ензима антиоксидативне заштите (Deliyanti i sar, 2018).



Слика 23. Nrf-2/ARE сигнални пут (Zhang i sar, 2014).

### 1.7.2.2. Антиапоптоички ефекат мелатонина

Мелатонин директно инхибише експресију ензима iNOS (Camacho i sar, 2012) и изоформе mtIiNOS (Escames i sar, 2006), што би могло бити од користи јер висок ниво NO може бити узрок апоптозе (Lee i sar, 2013). Инхибиција апоптозе је један од механизма помоћу којих мелатонин спречава септички шок и смањује програмирану ћелијску смрт у слезини и јетри (Carrillo-Vico i sar, 2005).

### 1.7.2.3. Антиинфламаторно дејство мелатонина

Мелатонин испољава и значајно антиинфламаторно дејство (Chuffa i sar, 2017). Због својих антиоксидативних својстава, која остварује директно или индиректно стимулацијом Nrf-2/ARE сигналног пута, мелатонин може да смањи оксидативни стрес (због повећаног стварања РВК) и инфламацију која се јавља као последица насталог оксидативног оштећења. Сем овог индиректног антиинфламаторног ефекта, мелатонин модулише NF-κB сигнални пут у инфламацији и на тај начин мења транскрипцију проинфламаторних гена (Mauriz i sar, 2013).

Инхибирајући NF-κB сигнални пут, мелатонин смањује синтезу цитокина (IL-1β и TNF-α) и ензима iNOS, који су укључени у настанак инфламације у ендотоксемији (Jiang i sar, 2016).

Постоји веза између мелатонина и инфламазома NLRP3 (Dong i sar, 2016). Инфламазом NLRP3 је интрацелуларни мултипротеински комплекс који посредује у активацији инфламаторних каспаза-1 и индукује стварање проинфламаторних цитокина, након везивања за DUMPs. DUMPs (гликозилисани протеини, мокраћна киселина, екстрацелуларни АТП, нуклеинске киселине) се везују за рецепторски део овог комплекса и доводе до активације каспазе-1, која врши протеолитичку трансформацију pro-IL1β у IL-1β, који је претходно синтетисан стимулацијом NF-κB сигналног пута.

*In vitro* студије, су доказале да имуномодулаторна активност мелатонина потиче од TLR модулације, смањења експресије NF-κB и снижења интензитета оксидативног стреса (Colunga Biancatelli i sar, 2020). Азот-моноксид је молекул који је повезан са различитим симптомима током сепсе (хипотензијом и вишеорганском инсуфицијенцијом), а потврђено је да давање мелатонина смањује његову концентрацију (Stuehr i Marletta, 1985). Такође је доказано да мелатонин инхибира повишену активност мијелопероксидазе (Zavodnik i sar, 2004), што сугерише да су заштитни ефекти мелатонина делимично повезани са инхибицијом инфилтрације неутрофила, уклањањем реактаната које неутрофили стварају (Sener i sar, 2005).

Познато је да је циркардијална секреција мелатонина смањена код тешких септичних пацијената (Mundigler i sar, 2002). Утврђено је да цитокини IL-1β и TNF-α, драматично делују смањујући садржај серотонина у епифизама или ћелијским културама код новорођенчета (Тау i sar, 2001). Како је серотонин прекурсор у синтези мелатонина, смањење овог амина у епифизи би ограничило стварање мелатонина, а смањење мелатонина може делимично допринети патофизиологији септичког шока (Jiang-Shieh i sar, 2005).



## 2. Циљ истраживања

У овој студији постављени су следећи циљеви:

1. Испитати ефекат мелатонина, током ендотоксемије изазване липополисахаридом на хематолошке параметаре и индексе, као и параметре тежине/интензитета ендотоксемије (тромбоцито-лимфоцитни и неутрофилно-лимфоцитни однос).
2. Анализирати параметаре инфламације у ткиву јетре утврђивањем активности мијелопероксидазе, нивоа NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, као и патохистолошке процене инфилтрације полиморфонуклеарних ћелијских, код животиња са ендотоксемијом, као и ефекте мелатонина на испитиване параметре, а у циљу процене имуномодулаторних ефеката овог неурохормона током изазване ендотоксемије.
3. Утврдити интензитет оксидативног оштећења у јетри животиња са ендотоксемијом, као и антиоксидативни ефекат мелатонина, испитивањем нивоа липидне пероксидације, оксидативне модификације протеина, концентрације редукованог глутатина, као и активности ензима глутатион редуктазе, глутатион С-трансферазе, каталазе и ксантин оксидазе.
4. Анализирати интензитет апоптозе у јетри током ендотоксемије, кроз праћење активности ензима алкалне ДН-азе, киселе ДН-азе и каспазе-3, патохистолошке идентификације и квантификације апоптотских ћелија, као и доказивати потенцијални антиапоптотички ефекат мелатонина.
5. Утврдити садржај Nrf-2 протеина у ткиву јетре, као значајног одбрамбеног механизма против оксидативног стреса и инфламације током ендотоксемије, као и анализирати ефекат мелатонина на ниво овог протеина.
6. Пратити метаболизам L-аргинина (кроз анализирање нивоа L-цитрулина, азот-моноксида, активности iNOS и аргиназе) и катаболизам полиамина (кроз активност полиамин оксидазе и диамин оксидазе) у ткиву јетре током ендотоксемије, као и ефекат мелатонина на ове метаболичке путеве.

## 3. Материјал и методе

### 3.1. Експерименталне животиње

Експеримент је изведен на укупно двадесет осам пацова *Wistar albino* соја, мушког пола, старости седам недеља. Све експерименталне животиње су биле здраве и имале тежину од 150 до 200 грама. Животиње су узгојене у виваријуму Научно-истраживачког центра за биомедицину, Медицинског факултета Универзитета у Нишу.

Пацови су били смештени у пластичним кавезима, у климатизованој просторији са стандардним лабораторијским условима (температура просторије је била у границама од 20° С до 24° С, а релативна влажност ваздуха 55%) и вештачким осветљењем (12-часовни светлост/тама циклус). За време трајања експеримента све експерименталне групе су имале неограничен приступ храни и води за пиће. Експерименталне животиње у свим групама су конзумирале стандардну храну за пацове која је садржала 11 kJ/g метаболичке енергије (20% протеина, 4% масти, 40% угљених хидрата, 8% сирових влакана). У сваком тренутку животиње су имале приступ храни и води, при чему им се 24 h пре почетка експеримента, укидала храна.

### 3.2. Етички принципи у раду са експерименталним животињама

Све експерименталне процедуре са животињама су одобрене од стране Етичког комитета и у складу са: а) европском директивом 2010/63/EU за експерименте на животињама, б) водича за бригу и коришћење лабораторијских животиња НИИ (енгл. national Institute of Health, 1978), као и в) правилника за рад са експерименталним животињама Медицинског факултета, Универзитета у Нишу. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког комитета Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије - Управе за ветерину, број дозволе 323-07-08988/2022-05.

### 3.3. Експериментални модел и експерименталне групе

Животиње су биле подељене у четири експерименталне групе, а сваку групу чинило је по 7 јединки. За прорачун величине узорка узете су просечне вредности и стандардне девијације добијене у пилот студији (N=14), која је претходила описаном истраживању и која је спроведена у циљу припреме концепта предложеног истраживања.

Величина ефекта пилот студије је била  $ES=0,61$ . Израчунавање величине узорка је извршено у софтверском пакету G-Power. За *a priori* прорачун величине узорка одабрано је тестирање нулте хипотезе једноструком анализом варијансе (one way ANOVA) уз прихваћене вредности вероватноће грешке првог типа  $\alpha=0,05$  и снаге студије 0,8. Предвиђена величина укупног узорка предложеног истраживања је приближно 28, односно 7 јединки по групи.

Након периода адаптације од осам дана, свих двадесет осам *Wistar albino* пацова је насумично подељено у четири групе (сваку групу је чинило по седам пацова,  $n=7$ ) на следећи начин:

- *Прва група (Контрола)* - била је контролна група пацова којима је орално апликован 8% етанол у физиолошком раствору, у дози од 10 ml/kg ТТ, путем интрагастичне сонде.
- *Друга група (Мел)* - била је контролна група пацова којима је орално даван мелатонин, у дози од 50 mg/kg ТТ, путем интрагастичне сонде.
- *Трећа група (ЛПС)* - била је експериментална група пацова којима је интраперитонеално апликован ЛПС, у дози од 10 mg/kg ТТ.
- *Четврта група (ЛПС + Мел)* - била је експериментална група пацова којима је најпре орално даван мелатонин, у дози од 50 mg/kg ТТ (путем интрагастичне сонде); а након тога је интраперитонеално апликован ЛПС, у дози од 10 mg/kg ТТ.

Липополисахарид је фенол екстрахован из бактерије *Escherichia coli* серотипа O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Ендотоксемија је код пацова изазвана интраперитонеалном применом ЛПС-а, у појединачној дози од 10 mg/kg ТТ (Gholamnezhad i Hassanabad, 2018).

Раствор мелатонина (Sigma-Aldrich) је припреман свеж (растваран у 8% етанолу који је садржао физиолошки раствор - 0,85% NaCl), и орално даван у дози од 50 mg/kg ТТ (Potic i sar, 2019; Ohta i sar, 2000; Ničković i sar, 2018).

### 3.4. Експериментални протокол

Двадесет сати након третмана, животиње су жртвоване ексангвинацијом након билатералне торакотомије, у дубокој анестезији (интраперитонеално је апликован 10% Ketamidol - Richter Pharma AG, Wels, Аустрија; у дози од 100 mg/kg ТТ).

### 3.5. Припрема узорака

Крв је узоркована терминалном пункцијом срца. Крвни серуми су издвојени центрифугирањем (15 минута на 300 x g) на +4° C у Eppendorf 5415R центрифуги и чувани на -20° C.

Након жртвовања експерименталних животиња, узимано је ткиво јетре, које је затим вишеструко испирано у хладном изотоничном раствору NaCl и подељено на два дела; први део за патохистолошке анализе (фиксација у формалину), а други део за имунолошко-биохемијске анализе (одмах је замрзавано на -80° C и тако чувано до хомогенизовања).

Ткиво јетре (одређено за хомогенизовање) је сечено на ситне комадиће и затим хомогенизовано уз помоћ ткивног хомогенизатора (ИКА® Works de Brasil Ltda Taquara, RJ 22713-00) како би се припремио 10%-ни хомогенат. Хомогенат (10% w/v) је припреман коришћењем ледене дејонизоване воде, а потом центрифугиран, у циљу издвајања супернатанта (20 минута на 3000 x g), на +4° C у Eppendorf 5415R центрифуги. Хомогенати су чувани на -80° C, до обављања имунолошко-биохемијских анализа.

Ткиво јетре (одређено за патохистолошко проучавање) је фиксирано у 10%-тном пуферисаном раствору формалдехида (v/v; pH=7,4) одмах након изоловања у трајању од 24 h.

### 3.6. Имунолошке и биохемијске методе

#### 3.6.1. Хематолошки параметри

Хематолошки параметри и индекси одређивани су на хематолошком анализатору DxH 500 - Beckman Coulter, у Заводу за трансфузију крви Ниш. На овом анализатору одређивана је концентрација хемоглобина (Hb - g/L) и хематокрита (Hct - L/l), затим број еритроцита (RBC -  $\times 10^{12}/L$ ), као и еритроцитни индекси (MCV - fl, MCH - pg, MCHC - g/L, RDW - %). Такође одређиван је и број леукоцита (WBC -  $\times 10^9/L$ ), леукоцитарна формула (број неутрофила, лимфоцита, моноцита, еозинофила и базофила -  $\times 10^9/L$ ), затим број тромбоцита (PLT -  $\times 10^9/L$ ), као и средњи волумен тромбоцита (MPV - fl).

Прерачунавани су индекси за процену тежине (прогнозе) ендотоксемије и то: однос тромбоцита и лимфоцита (PLR) и однос неутрофила и лимфоцита (NLR).

### 3.6.2. Биохемијски параметри у крвном серуму

Биохемијске анализе су одређиване на аутоматском анализатору Olympus AU680 (Chemistry-Immuno Analyzer). У крвном серуму одређиване су активности следећих ензима (у јединицама U/L): аланин-аминотрансферазе (ALT), аспартат-аминотрансферазе (AST),  $\gamma$ -глутамил трансферазе (GGT), амилазе, креатин фосфокиназе (CPK), лактат дехидрогеназе (LDH). Такође су одређиване концентрације: глукозе (mmol/L), укупних протеина (g/L), албумина (g/L), С-реактивног протеина (CRP - mg/L), креатинина ( $\mu$ mol/L), урее (mmol/L), укупног и директног билирубина ( $\mu$ mol/L), холестерола (mmol/L) и триглицерида (mmol/L).

### 3.6.3. Параметари инфламације у хомогенату ткива јетре

#### 3.6.3.1. Одређивање активности мијелопероксидазе (МПО) у хомогенату јетре

Активност ензима мијелопероксидазе је одређена након додавања хомогената ткива јетре у реакциону смешу која је садржала *o*-phenylene diamine (OPD) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (био је растворен у цитратном пуферу) (Bradley i sar, 1982). Активност МПО је изражавана у OD/mg протеина.

#### 3.6.3.2. Одређивање концентрације нуклеарног фактора кара-В (NF- $\kappa$ B), фактора некрозе тумора- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукина-6 (IL-6) у ткиву јетре

За одређивање концентрације NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  и IL-6 у хомогенатима ткива јетре пацова коришћени су комерцијални ELISA китови (Enzyme linked immunosorbent assay) специфични за биолошки материјал пацова. У складу са упутствима произвођача урађени су ELISA тестови и то, NF- $\kappa$ B (Rat Nkap, NF-каппа-B-activating protein ELISA Kit, Wuhan Fine Biotech, Wuhan, China; каталогски број ER0510), TNF- $\alpha$  (Rat TNF alpha ELISA Kit Abcam, Boston, MA, US; каталогски број: ab236712) и IL-6 (Quantikine ELISA Rat IL-6, R&DSystems, Minneapolis, US; каталогски број: R6000B). Абсорбанца је прочитана на ELISA читачу (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska) на 450 nm. На основу абсорбанци стандарда формиране су стандардне криве које су употребљаване за прерачунавање концентрација NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  и IL-6 у pg/ml, а затим су изражене у pg/mg протеина.

### 3.6.4. Параметри интензитета оксидативног оштећења у ткиву јетре

#### 3.6.4.1. Одређивање активности каталазе (CAT) у хомогенату јетре

За одређивање активности ензима САТ коришћена је спектрофотометријска метода по Koroliuk-u i sar. (1988).

Ова метода се заснива на способности  $\text{H}_2\text{O}_2$  да гради жуто обојено једињење у присуству амонијум молибдата. Активност овог ензима је изражена у  $\text{U/g}$  протеина ткива јетре, користећи моларни екстинкциони коефицијент за  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $22,2 \times 10^3 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) (Beers i Seizer, 1952).

#### **3.6.4.2. Одређивање активности ксантин оксидазе (ХО) у хомогенату јетре**

Активност ензима ХО у хомогенату ткива јетре, одређивана је спектрофотометријски, по методи Kazaki i Sakurada (1977). Ова метода је заснивана на разлици у апсорпционом спектру између хипоксантина (ксантина) и мокраћне киселине, у присуству  $\text{O}_2$  као акцептора електрона. Активност ХО је прерачунавана коришћењем моларног екстинкционог коефицијента за мокраћну киселину, који износи  $7,6 \times 10^{-3} \text{M cm}^{-1}$  (Hashimoto, 1974). Активност овог ензима је изражена као  $\text{U/mg}$  протеина хомогената јетре.

#### **3.6.4.3. Одређивање концентрације тиобарбитурат реагујућих супстанци (TBARS) у хомогенату јетре**

Концентрација тиобарбитурат реагујућих супстанци у хомогенату јетре, као показатеља липидне пероксидације, мерена је спектрофотометријском методом по Andreevoj i sar. (1988), која се заснива на реакцији тиобарбитурне киселине (ТВА) са малондиалдехидом (MDA), као крајњим продуктом липидне пероксидације, у киселој средини на температури од  $95^\circ \text{C}$ . Концентрација TBARS је израчуната коришћењем екстинкционог коефицијента ( $1,54 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) и изражава се у  $\text{mmol/ml}$ , а затим је прерачуната на  $\text{mg}$  протеина ткива јетре.

#### **3.6.4.4. Одређивање нивоа карбонилних група (PCC) у хомогенату јетре**

Оксидативна модификација протеина у хомогенату јетре одређивана је садржајем карбонилних група, по методи Tein i sar. (1999). Ово је спектрофотометријска метода која је урађена употребом 2,4-динитрофенилхидразина (DPNH), који је стандардни карбонилни реагенс. За израчунавање нивоа карбонилних група коришћен је моларни екстинкциони коефицијент за DPNH ( $22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ). Ниво PCC изражавана је у  $\text{mmol/g}$  протеина ткивног хомогената јетре.

### 3.6.4.5. Одређивање концентрације редукованог глутатина (GSH) у хомогенату јетре

Концентрације укупног и редукованог глутатиона одређиване су према спектрофотометријској методи Rahman-a i sar. (2006). Реакциона смеша се састојала од хомогената ткива јетре (разблаженог), сулфхидрилног реагенса DTNB (2 mg/3 mL), ензима глутатион редуктазе (10 U/3 mL) и NADPH (2 mg/3 mL). Концентрација GSH је одређивана коришћењем стандардне криве и изражена је у mmol/mg протеина ткивног хомогената јетре.

### 3.6.4.6. Одређивање активности глутатион редуктазе (GR) у хомогенату јетре

Активност ензима GR у ткиву јетре је процењена применом стандардне спектрофотометријске методе. Ова метода је заснивана на катализованом редукцији (зависној од NADPH), оксидованог глутатиона (GSSG) у редуковани глутатион (GSH) (Popović i sar, 2019). Активност ензима GR је изражавана у mmol/mg протеина хомогената јетре.

### 3.6.4.7. Одређивање активности глутатион С-трансферазе (GST) у хомогенату јетре

Активност ензима GST мерена је спектрофотометријски из реакционе смеше која је садржала: калијум фосфатни пуфер, GSH, 4-нитробензил хлорид и разблажени хомогенат јетре (Habig i sar, 1974). Активност овог ензима је изражавана у mmol/mg протеина ткива јетре.

## 3.6.5. Параметри интензитета апоптозе у ткиву јетре

### 3.6.5.1. Мерење активности алкалне и киселе ДН-азе у хомогенату јетре

Активност ДН-азе (алкалне и киселе) одређивана је по спектрофотометријској методи Bartholeynesa i sar. (1975), при чему је као супстрат коришћен ДНК. Активност алкалне ДН-азе одређивана је при оптималном рН=7,4 уз коришћење TRIS-HCl пуфера и додавање  $Mg^{2+}$  (као активатора), а активност киселе ДН-азе уз коришћење ацетатног пуфера рН=5,0. Активност алкалне и киселе ДН-азе изражавана је у U/g протеина ткивног хомогената јетре.

### 3.6.5.2. Одређивање активности каспазе-3 у ткиву јетре

За одређивање активности каспазе-3 у хомогенату ткива коришћен је комерцијални ELISA кит специфичан за биолошки материјал пацова, а у складу са упутствима произвођача (Rat Caspase 3 ELISA Kit, Cusabio, College Park, US; каталогски број CSB-E08857r).

Абсорбанца је очитана на ELISA читачу (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska) на 450 nm, а вредности активности каспазе-3 у хомогенату јетре израчунате су из стандардне криве, а резултати су приказани у ng/mg протеина.

### 3.6.6. Садржај нуклеарног фактора еритроид 2 (Nrf-2) у ткиву јетре

За одређивање концентрације Nrf-2 у хомогенату ткива пацова коришћен је комерцијални ELISA кит специфичан за биолошки материјал пацова, а у складу са упутствима произвођача (Rat respiratory factor 2, NRF2 ELISA Kit, Cusabio, College Park, US; каталошки број CSB-EQ027869 RA). Абсорбанца је очитана на ELISA читачу (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska) на 450 nm, а вредности концентрације Nrf-2 у хомогенату јетре рачунате су из стандардне криве, а резултати су приказани као pg/mg протеина.

### 3.6.7. Параметри метаболизма L-аргинина и полиамина у ткиву јетре

#### 3.6.7.1. Одређивање концентрације L-цитрулина у хомогенату јетре

Концентрација L-цитрулина у хомогенату јетре одређивана је колориметријском методом (Boyd i Rahmatullah, 1980) која је садржала диацетил моноксим и тиосемикарбазид. Реакција је прекинута коришћењем трихлорсирћетне киселине (TCA), а реакциона смеша је након тога кључана - 5 минута. Концентрација L-цитрулина у ткиву јетре је изражавана у  $\mu\text{mol/mg}$  протеина.

#### 3.6.7.2. Одређивање нивоа нитрата/нитрита ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) у хомогенату јетре

У хомогенату ткива јетре, као мера азот-моноксида одређиван је ниво нитрата/нитрита. Најпре је извршена депротеинизација узорака, а нитрати су предходно трансформисани у нитрите, методом редукције кадмијумом. Нитрити су анализирани директно спектрофотометријски, користећи Grisov реагенс (1,5% сулфаниламид у HCl са 0,15% N-1-афтил етилендиамин дихидрохлоридом) (Mladenovic i sar, 2018). Резултати су изажавани као  $\mu\text{mol/mg}$  протеина јетре.



### 3.6.7.3. Одређивање активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе (iNOS) у хомогенату јетре

За одређивање активности iNOS у хомогенату ткива јетре коришћен је ензимски имуноесеј (ELISA), у складу са упутствима произвођача (Rat NOS2/iNOS, Nitric Oxide Synthase 2, Inducible ELISA Kit, Elabscience; каталошки број E-EL-R0520). Абсорбанца је очитана на ELISA читачу (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska) на 450 nm, а вредности активности iNOS у хомогенату јетре рачунате су из стандардне криве, а резултати су приказани у ng/mg протеина.

### 3.6.7.4. Одређивање активности аргиназе у хомогенату ткива јетре

Активност ензима аргиназе, одређивана је спектрофотометријском методом (Porembska i Kedra, 1975). Активност аргиназе је одређивана на основу количине ослобођеног орнитина, који у присуству сирћетне киселине реагује са орнитином и даје обојено једињење. Након инкубирања ензима из ткива јетре са Л-аргинином и  $MnCl_2$  (као активатора), у присуству барбитон пуфера, 30 минута на  $37^\circ C$ , реакција је прекинута 20% ТСА, а исталожени материјал се издвајао центрифугирањем. Количина орнитина је одређивана у супернатанту, у присуству нинхидринског реагенса и концентроване сирћетне киселине на  $95^\circ C$ . Након 30 минута, епрувете су хлађене и одређивана је апсорпција обојеног једињења на 515 nm. Прерачунавање количине орнитина вршила се према стандардној криви. Активност ензима у ткивима јетре је изражавана у mmol/mg протеина.

### 3.6.7.5. Одређивање активности ензима полиамин оксидазе (ПАО) и диамин оксидазе (ДАО) у ткиву јетре

Спектрофотометријско одређивање активности ПАО и ДАО у ткиву јетре је вршено мерењем количине насталог аминок алдехида, а под дејством ових ензима на одговарајући супстрат (Sokolovic i sar, 2010). Као супстрат за ДАО коришћен је путресцин дихидрохлорид (Quash i sar, 1976), а као супстрат за ПАО спермин тетрачлорид (Quash i sar, 1972). Реакција се одвијала у TRIS-HCl пуферу, уз pH=7,2 (за ПАО) и pH=7,7 (за ДАО), као и уз додавање 3-метил-2-бензотиазолон хидразона и  $FeCl_3$  за добијање обојеног једињења. Активност ових ензима је изражавана у U/mg протеина ткива јетре.

### 3.6.8. Одређивање концентрације протеина у хомогенату јетре

Концентрација укупних протеина у хомогенату ткива јетре, одређивана је методом по Лаурију уз употребу говеђег серум албумина као стандарда (Lowry i sar, 1951).

### 3.6.9. Патохистолошке анализе ткива јетре пацова

Узорци ткива јетре пацова за патохистолошко испитивање су фиксирани у пуферисаном раствору формалдехида (10%; v/v), а затим дехидрирани растворима етанола различите концентрације (50-100%; v/v). Исецци дебљине 5 mm су рутински обрађени у аутотехнику (Leica Microsystems, Reuil-Malmaison, Francuska) у Центру за патолошку анатомију, Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Након израде парафинских калупа, на микротому (Leica Biosystems RM2245, Немачка) су добијени исецци дебљине 4  $\mu\text{m}$  који су бојени стандардном хематоксилин и еозин (H&E) техником. Семиквантитативна анализа узорака вршена је на светлосном микроскопу Olympus BKS43 (Olimpus Corporation, Tokio, Јапан) опремљеним дигиталним фотоапаратом Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Немачка) на различитим увећањима. Оцењивани су следећи параметри: инфилтрација полиморфонуклеарних ћелија, хиперезинофилна цитоплазма, везикуларна дегенерација и апоптоза ћелија јетре. Семиквантитативна анализа оштећења ткива јетре извршена је на основу пресека ткива обојених H&E техником, према унапред утврђеној скали бодовања: степен оштећења до 25% (-), од 25 до 50% (+), од 50 до 75% (++) и већи од 75% (+++) (Sokolovic i sar, 2018).

### 3.7. Хемикалије коришћене у истраживању

Хемикалије које су коришћене у нашем истраживању биле су: Melatonin  $\geq$  98% (Sigma-Aldrich); Lipopolysaccharide (from *Escherichia coli* O111:B4; LPS) (Sigma, St. Louis, MO, USA); Ketamidol (Richter Pharma AG); PBS buffer (Sigma-Aldrich);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Alkaloid); Sodium chloride - NaCl, Hydrogen peroxide -  $\text{H}_2\text{O}_2$ , for analysis, 35 wt % solution in water, stabilized (Acros Organic); Trichloroacetic acid -  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA)  $\geq$  99% (Sigma-Aldrich); 2-Thiobarbituric acid-TBA  $\geq$  98% (Sigma-Aldrich); L-Glutathione oxidized (GSSG), 98% (Acros Organic); L-Glutathione reduced (GSH), 98.0% (Sigma-Aldrich); Glutathione reductase (GR) from baker's yeast (Sigma-Aldrich);  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dihydrate (Calbiochem); Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt ( $\text{NADPH-Na}_4$ ), 95% for biochemistry, (CARL ROTH); 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)-DTNB 99% (Acros Organics); N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride  $>$  98% (Sigma-Aldrich); Glacial acetic acid- $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Centrohema); Ninhydrin (Sigma-Aldrich); L-arginine  $\geq$  98% (Sigma-Aldrich); Manganese (II) chloride- $\text{MnCl}_2$   $\geq$  99% (Sigma-Aldrich); Sodium 5,5-diethylbarbiturate (Sigma-Aldrich); 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride hydrate, 97% (Sigma-Aldrich); Thiosemicarbazide  $\geq$  99% (Sigma-

Aldrich); Putrescine dihydrochloride  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich); Spermine  $\geq 97\%$  (Sigma-Aldrich); 2,3-Butanedione monoxime  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich); o-Phenylenediamine  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich); Xanthine  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich); 2,4-Dinitrophenylhydrazine  $\geq 97\%$  (Sigma-Aldrich); Trichloroacetic acid  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich); Lowry Reagent (Merck); Hydrochloric acid (Merck); Deoxyribonucleic Acid  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich); Sulfanilamide  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich); 4-Nitrobenzyl chloride  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich); Ammonium molybdate (Sigma-Aldrich); Diacetyl Monoxime (Sigma-Aldrich); Iron(III) chloride (Sigma-Aldrich); Formaldehyde solution (Sigma-Aldrich); Ethanol (Sigma-Aldrich); Phosphate-Citrate Buffer (Sigma-Aldrich); Potassium Phosphate Monobasic Anhydrous Buffer  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich).

### 3.8. Статистичка обрада података

Сви резултати су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација, а приказани су табеларно и графички. Статистичка обрада података је вршена статистичким програмом GraphPad Prism - верзија 5.03 (GraphPad Software, Inc, CA, USA). Статистички значајне разлике утврђене су једносмерном анализом варијансе (ANOVA) праћеном post hoc тестом (Tukey post-hoc тест) за вишеструка поређења. Ниво значајности за све статистичке тестове био је 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. Резултати рада

### 4.1. Ефекти мелатонина, током ендотоксемије изазване ЛПС-ом, на хематолошке параметре и индексе

Табела 1. Хематолошки параметри и индекси у крви експерименталних животиња.

Хематолошки параметри и индекси	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
<b>Хемоглобин (Hb)</b> (g/L)	141,9±6,2	136,8±1,5	142,1±7,4	137,9±5,1
<b>Хематокрит (Hct)</b> (L/L)	0,42±0,02	0,41±0,01	0,40±0,03	0,39±0,04
<b>Еритроцити (RBC)</b> (x10 <sup>12</sup> /L)	7,53±0,44	7,20±0,2	7,31±0,61	6,97±0,73
<b>MCV (fl)</b>	55,7±1,52	57,6±2,35	55,5±1,98	57,3±1,95
<b>MCH (pg)</b>	18,85±0,41	19,03±0,59	19,23±0,72	19,13±0,48
<b>MCHC (g/L)</b>	338±7,3	330±7,9	347±12,8	334±5,3
<b>RDW (%)</b>	20,9±0,94	20,03±1,15	20,31±0,93	19,66±0,75
<b>Леукоцити (WBC)</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	6,55±3,22	7,94±1,4	3,95±1,73	5,68±1,59
<b>Неутрофили</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,77±0,53	0,67±0,24	1,4±0,84***	1,31±0,45
<b>Лимфоцити</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	4,84±1,83	6,39±0,85*	2,37±0,58*	3,61±0,83 <sup>#</sup>
<b>Моноцити</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,11±0,07	0,17±0,06	0,19±0,06	0,25±0,02 <sup>#</sup>
<b>Еозинофили</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,025±0,018	0,026±0,005	0,041±0,014	0,07±0,064
<b>Базофили</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,041±0,026	0,043±0,005	0,073±0,052	0,075±0,046
<b>Тромбоцити (PLT)</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	313±89	437±159	168±74***	126±21
<b>MPV (fl)</b>	7,98±1,00	8,13±0,61	9,09 ±1,49	10,43±1,37

Вредности приказују средњу вредност ± стандардну девијацију (n=7). **Контрола** - контролна група здравих животиња, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи показују статистички значајну разлику хематолошких параметара и индекса у крви пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001, \*\*\*p<0,05 у поређењу са Контролом; <sup>#</sup>p<0,001 у поређењу са ЛПС групом.

Резултати приказани у табели 1 показују да је у крви пацова са ендотоксемијом дошло до значајног повишења броја неутрофила у односу на контролну групу ( $p < 0,05$ ). Уочава се значајно повишење броја лимфоцита у Мел групи у односу на контролну групу ( $p < 0,001$ ), снижења броја лимфоцита у ЛПС групи у односу на Контролу ( $p < 0,001$ ), као и повећања броја лимфоцита у ЛПС+Мел групи у односу на ЛПС групу ( $p < 0,001$ ). Такође у овој табели се примећује да у је у крви пацова у ЛПС+Мел групи дошло до повишења броја моноцита у односу на ЛПС групу ( $p < 0,001$ ). Запажа се снижења броја тромбоцита у крви пацова са ендотоксемијом (ЛПС група) у односу на Контролу ( $p < 0,05$ ).

**Табела 2.** Тромбоцито-лимфоцитни (PLR) и неутрофилно-лимфоцитни (NLR) однос у крви пацова.

Хематолошки индекси	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
<b>PLR</b>	72,17±49,84	73,24±49,92	77,37±45	39,43±11,69 <sup>#</sup>
<b>NLR</b>	0,15±0,07	0,11±0,04	0,59±0,32*	0,35±0,07 <sup>###</sup>

Вредности приказују средњу вредност ± стандардну девијацију ( $n=7$ ). **Контрола** - контролна група здравих животиња, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи показују статистички значајну разлику хематолошких индекса (PLR и NLR односа) у крви пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \* $p < 0,001$  у поређењу са Контролом и Мел; <sup>#</sup> $p < 0,001$ , <sup>###</sup> $p < 0,05$  у поређењу са ЛПС групом.

Резултати приказани у табели 2 показују да је у крви пацова са ендотоксемијом изазваном липополисахаридом дошло до значајног повишења неутрофилно-лимфоцитног (NLR) односа, у односу на Контролу и Мел групу ( $p < 0,001$ ); док је у ЛПС+Мел групи дошло до снижења овог односа у односу на ЛПС групу ( $p < 0,05$ ). Из табеле 2 се такође примећује да је у ЛПС+Мел групи дошло до статистички значајног снижења тромбоцито-лимфоцитног (PLR) односа, у односу на ЛПС групу ( $p < 0,001$ ).

## 4.2. Ефекат мелатонина на биохемијске параметаре у серуму пацова, током ендотоксемије

Табела 3. Активности ензима ALT, AST, GGT, амилазе, СРК и LDH у серуму пацова.

Активност ензима у серуму	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
ALT (U/L)	56±8,4	55,8±1,3	268,8±96,4*	122±34,1 <sup>#</sup>
AST (U/L)	159±20,8	169±29,1	641±125,3*	554±204
GGT (U/L)	2,49±0,12	2,32±0,21	3,14±0,194	3,16±1,11
Амилаза (U/L)	1325±130	1388±245	1360±458	1205±249
СРК (U/L)	1214±48	1570±499	2355±1534***	2784±480
LDH (U/L)	2308±114	2004±298	2477±446	2171±445

Вредности приказују средњу вредност ± стандардну девијацију (n=7). **Контрола** - контролна група здравих животиња, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи показују статистички значајну разлику у активности различитих ензима у серуму пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001, \*\*\*p<0,05 у поређењу са Контролом и Мел; <sup>#</sup>p<0,001 у поређењу са ЛПС групом.

Резултати приказани у табели 3 показују да су у серуму пацова којима је апликован липополисахарид, активности ензима маркера оштећења јетре (ALT и AST) су значајно повишене, у односу на Контролу (p<0,001), док је давање мелатонина животињама са ендотоксемијом довело до снижења активности ензима ALT у односу на ЛПС групу (p<0,001). Такође у серуму пацова ЛПС групе, активност ензима СРК је статистички значајно повишена у односу на Контролу (p<0,05).

На табели 4 се види да је у серуму пацова са ендотоксемијом изазваном липополисахаридом (ЛПС група) дошло до значајног повишења нивоа СРП-а, креатинина, урее и триглицерида, у односу на контролну групу (p<0,05). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом довело до значајног снижења нивоа креатинина и урее, у односу на ЛПС групу (p<0,05).

Табела 4. Концентрације биохемијских параметара у серуму експерименталних животиња.

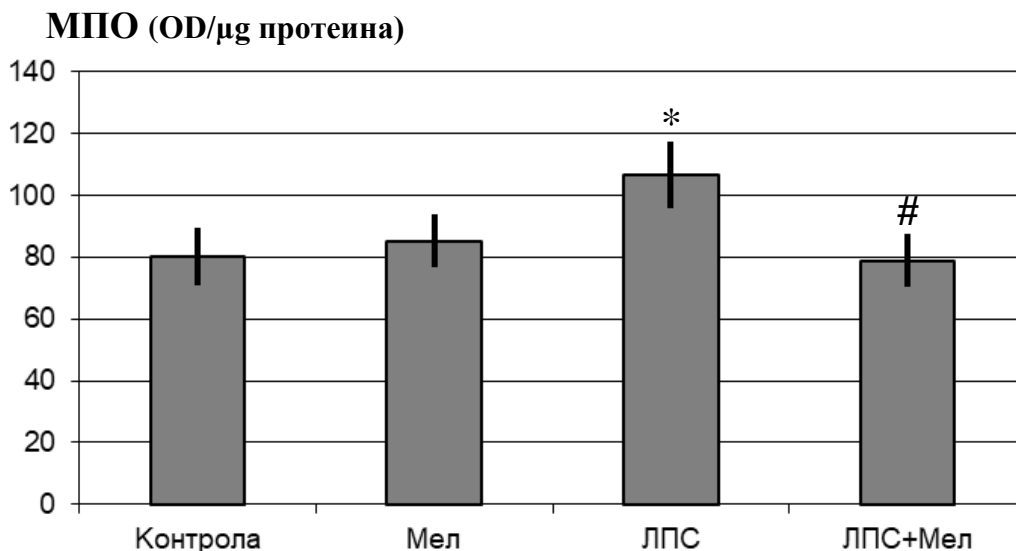
Биохемијски параметри у серуму	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
Глукоза (mmol/L)	6,82±0,71	6,98±0,34	7,11±0,30	6,60±0,92
Укупни протеини (g/L)	57,66±6,65	57,36±4,13	58,33±6,02	57,26±3,45
Албумини (g/L)	29,1±0,2	31,3±1,2	28,2±0,2	29,3±0,8
CRP (mg/L)	0,1±0,06	0,13±0,05	0,18±0,07***	0,15±0,05
Креатинин (μmol/L)	8,16±1,43	37,17±1,51	55,15±2,87***	45,60±2,80###
Уреа (mmol/L)	7,83±0,99	8,12±0,82	14,31±1,76***	11,95±2,61###
Укупни билир. (μmol/L)	1,18±0,25	1,86±0,56	1,93±0,55	2,21±0,64
Директни билир. (μmol/L)	0,53±0,09	0,35±0,08	0,38±0,14	0,56±0,23
Холестерол (mmol/L)	1,35±0,21	1,32±0,18	1,70±0,74	1,88±0,38
Триглицериди (mmol/L)	0,55±0,11	0,66±0,15	0,98±0,40***	1,03±0,34

Вредности приказују средњу вредност ± стандардну девијацију (n=7). **Контрола** - контролна група здравих животиња, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи показују статистички значајну разлику биохемијских параметара у крви пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*\*\*p<0,05 у поређењу са Контролом; ###p<0,05 у поређењу са ЛПС.

### 4.3. Имуномодулаторни ефекати мелатонина током ендотоксемије

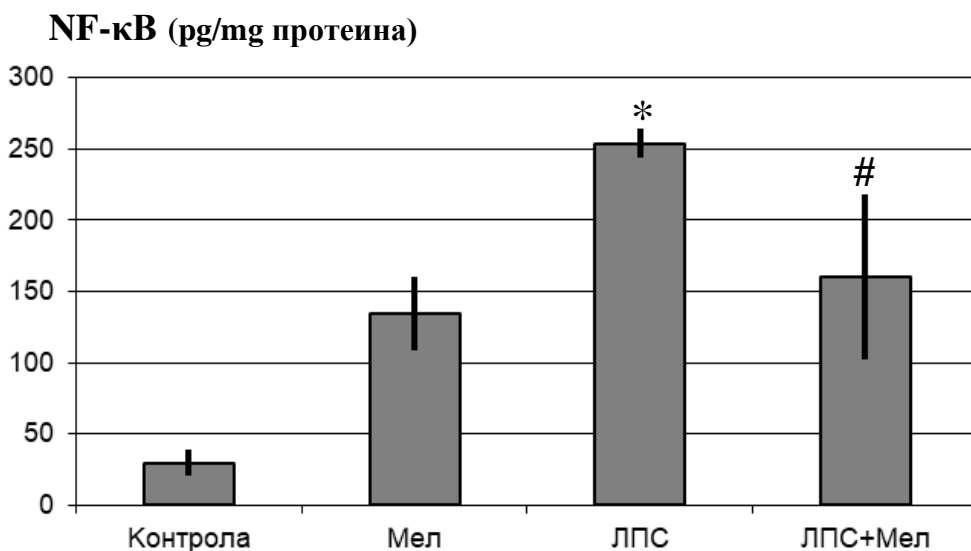
Праћење имуномодулаторних ефеката мелатонина током ендотоксемије у ткиву јетре експерименталних животиња, анализиран је кроз активност ензима мијелопероксидазе, концентрацију NF-κB, као и нивое цитокина (TNF-α и IL-6). Добијени резултати су приказани на графиконима 1, 2, 3 и 4.

На графикону 1 се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом (ЛПС група) дошло до значајног повишења активности ензима МПО у поређењу са Контролом (106,7±10,9 у поређењу са 80,3±9,4 OD/μg протеина; p<0,001). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом (ЛПС+Мел група) довело је до снижења активности овог ензима, у односу на ЛПС групу (78,9±8,5 у поређењу са 106,7±10,9 OD/μg протеина; p<0,001).



**Графикон 1.** Активност мијелопероксидазе у јетри пацова (OD/ $\mu$ г протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи)  $\pm$  стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група здравих пацова, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи изнад стубова показују статистички значајну разлику у активности МПО у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001 у поређењу са Контролом; #p<0,001 у поређењу са ЛПС групом.



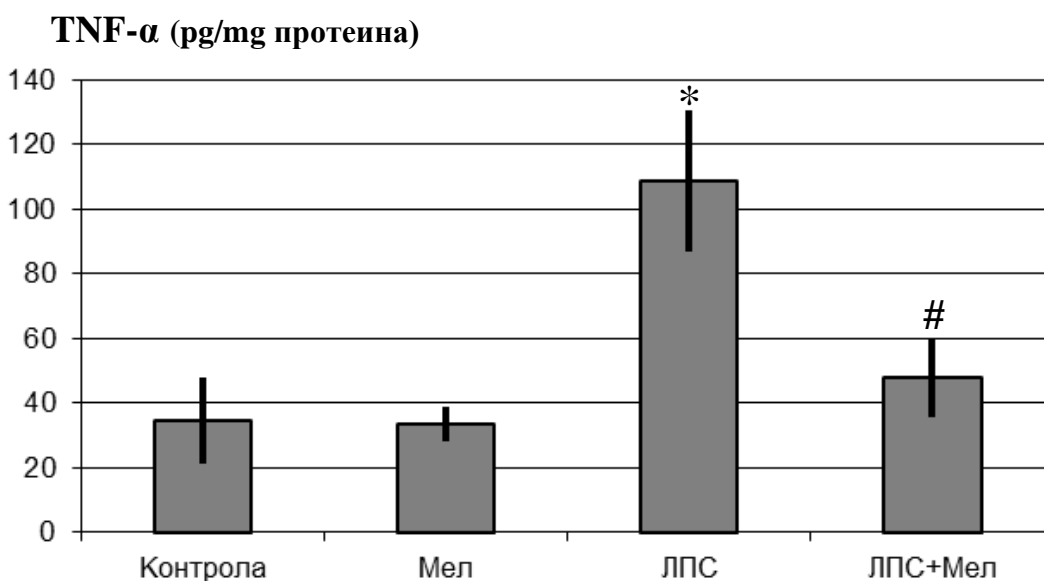
**Графикон 2.** Ниво нуклеарног фактора кара-В у ткиву јетре лабораторијских животиња (pg/mg протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи)  $\pm$  стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група, **Мел** - група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом којима је даван мелатонин. Различити симболи изнад стубова показују статистички значајну разлику у нивоу NF- $\kappa$ B у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001 у поређењу са Контролом; #p<0,001 у поређењу са ЛПС групом.



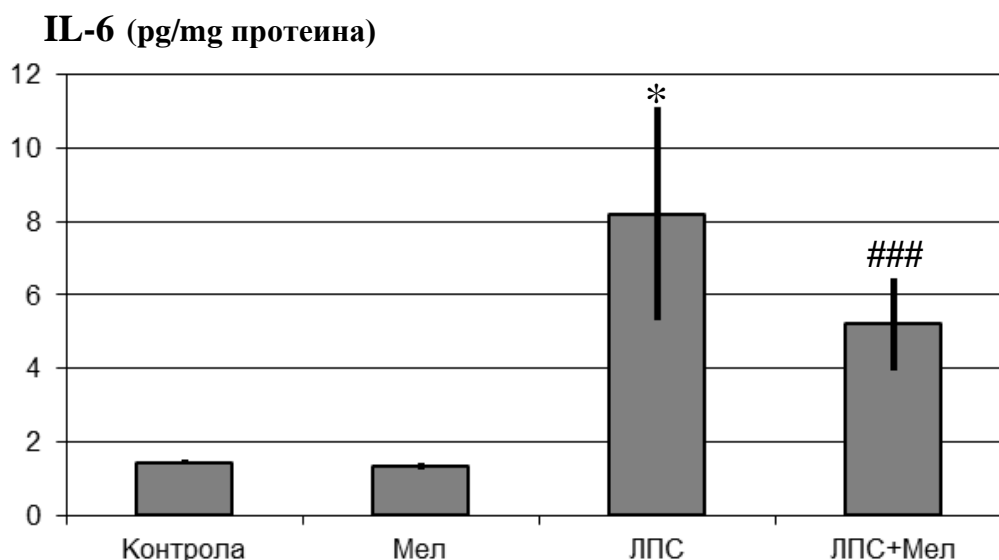
На графикону 2 се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом дошло до значајног повишења нивоа NF-κB, у поређењу са Контролом ( $254,00 \pm 10,52$  у поређењу са  $29,82 \pm 9,30$  pg/mg протеина;  $p < 0,001$ ). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом довело је до значајног снижења нивоа NF-κB, у односу на ЛПС групу ( $160,16 \pm 57,56$  у поређењу са  $254,00 \pm 10,52$  pg/mg протеина;  $p < 0,001$ ).

На графикону 3 се уочава да је у ткиву јетре пацова са ендотоксемијом дошло до значајног повишења концентрације фактора некрозе тумора-α, у поређењу са Контролом ( $108,64 \pm 21,70$  у поређењу са  $34,39 \pm 13,34$  pg/mg протеина;  $p < 0,001$ ). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом довело је до значајног снижења нивоа TNF-α, у односу на ЛПС групу ( $47,83 \pm 12,12$  у поређењу са  $108,64 \pm 21,70$  pg/mg протеина;  $p < 0,001$ ).



**Графикон 3.** Концентрација фактора некрозе тумора-α у ткиву јетре експерименталних животиња (pg/mg протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи) ± стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група здравих пацова, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи изнад стубова показују статистички значајну разлику у концентрацији TNF-α у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \* $p < 0,001$  у поређењу са Контролом; # $p < 0,001$  у поређењу са ЛПС групом.



**Графикон 4.** Концентрација интерлеукина-6 у ткиву јетре експерименталних животиња (pg/mg протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи) ± стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група здравих пацова, **Мел** - контролна група третирана мелатоном (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи изнад стубова показују статистички значајну разлику у концентрацији IL-6 у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001 у поређењу са Контролом; ###p<0,05 у поређењу са ЛПС групом.

На графикону 4 се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом дошло до значајног повишења нивоа интерлеукина-6, у поређењу са Контролом (8,19±2,90 у поређењу са 1,44±0,07 pg/mg протеина; p<0,001). Апликовање мелатонина пацовима са ендотоксемијом довело је до значајног снижења нивоа IL-6, у односу на ЛПС групу (5,19±1,26 у поређењу са 8,19±2,90 pg/mg протеина; p<0,05).

#### **4.4. Испитивање антиоксидативних ефеката мелатонина током ендотоксемије изазване липополисахаридом**

Праћење антиоксидативних ефеката мелатонина током ендотоксемије у ткиву јетре експерименталних животиња, анализиран је кроз активности ензима каталазе, ксантин оксидазе, глутатион редуктазе и глутатион С-трансферазе, као и нивое тиобарбитурат реагујућих супстанци, карбонилних група и редукованог глутатина. Добијени резултати су приказани на табелама 5 и 6.

Табела 5. Параметри оксидативног оштећења у јетри експерименталних животиња.

Параметри оксидативног стреса	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
<b>САТ</b> (U/g прот.)	5,83±0,33	5,82±0,56	4,78±1,28***	5,57±0,46
<b>ХО</b> (U/mg прот.)	0,77±0,17	0,66±0,39	1,90±0,25*	1,33±0,37##
<b>ТВАРС</b> (μmol/mg прот.)	0,71±0,13	0,79±0,07	1,25±0,19*	0,89±0,22##
<b>РСС</b> (μmol/mg прот.)	7,21±2,68	8,42±2,24	32,29±7,34	17,28±3,19#

Вредности приказују средњу вредност ± стандардну девијацију (n=7). **Контрола** - контролна група здравих животиња, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg.) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи показују статистички значајну разлику параметара (активности САТ и ХО, као и нивоа ТВАРС и РСС) у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001, \*\*\*p<0,05 у поређењу са Контролом; #p<0,001, ##p<0,01 у поређењу са ЛПС групом.

Резултати приказани у табели 5 показују да је у јетри пацова са ендотоксемијом дошло до значајног снижења активности САТ у односу на Контролу (p<0,05). У ткиву јетре животиња са ендотоксемијом изазваном липополисахаридом, уочено је значајно повишење активности ХО у односу на контролну групу (p<0,001), док је у ЛПС+Мел групи дошло до снижења активности овог ензима у односу на ЛПС групу (p<0,01). На табели 5 се види да у је у ткиву јетре са ендотоксемијом дошло до повишења нивоа тиобарбитурат реагујућих супстанци у поређењу са контролном групом (p<0,001), док је орално давање мелатонина пацовима са ЛПС-ом довело до статистички значајног снижења нивоа ТВАРС у односу на ЛПС групу (p<0,01). Такође на табели 5 се запажа да је у јетри пацова са ендотоксемијом дошло до повишења нивоа карбонилних група у односу на Контролу (ова промена није била статистички значајна, p=нс), док је у ЛПС+Мел групи дошло до статистички значајног снижења нивоа РСС у односу на ЛПС групу (p<0,001).

**Табела 6.** Концентрација редукованог глутатина (GSH), као и активност глутатион редуктазе (GR) и глутатион С-трансферазе (GST) у јетри пацова.

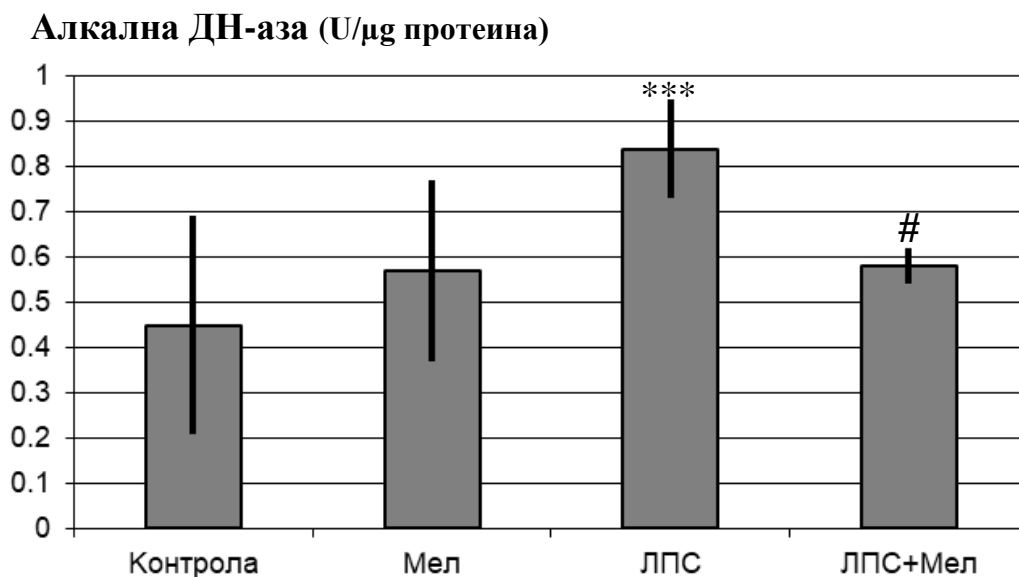
Параметри везани за глутатион	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
<b>GSH</b> ( $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ прот.)	149,6 $\pm$ 4,7	137,1 $\pm$ 8,6	95,0 $\pm$ 4,6*	152,7 $\pm$ 20,9 <sup>#</sup>
<b>GR</b> ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ прот.)	11,0 $\pm$ 2,14	12,8 $\pm$ 0,6	20,83 $\pm$ 3,6*	15,56 $\pm$ 4,0 <sup>###</sup>
<b>GST</b> ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ прот.)	25,22 $\pm$ 1,37	21,92 $\pm$ 2,29	11,99 $\pm$ 6,5*	13,5 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>

Вредности приказују средњу вредност  $\pm$  стандардну девијацију (n=7). **Контрола** - контролна група, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи показују статистички значајну разлику параметара (нивоа GSH, као и активности GR и GST) у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001 у поређењу са Контролом; #p<0,001, ###p<0,05 у поређењу са ЛПС групом.

На табели 6 се запажа да је у ткиву јетре пацова са ендотоксемијом дошло до значајног снижења концентрације редукованог глутатина, у односу на контролну групу (p<0,001), док је у ЛПС+Мел групи дошло до значајног повишења нивоа истог параметара, у односу на ЛПС групу (p<0,001). Такође на истој табели се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом дошло до повишења активности глутатион редуктазе у поређењу са контролном групом (p<0,001), док је орално давање мелатонина пацовима са ЛПС-ом довело до статистички значајног снижења активности овог ензима у односу на ЛПС групу (p<0,05). У јетри пацова са ендотоксемијом дошло је до снижења активности ензима глутатион С-трансферазе у односу на Контролу (p<0,001), док је у ЛПС+Мел групи дошло до статистички значајног повишења активности овог ензима, у односу на ЛПС групу (p<0,001).

#### 4.5. Испитивање антиапоптотичких ефеката мелатонина током ендотоксемије

Праћење ефеката ендотоксемије изазване липополисахаридом на апоптотичке процесе у ткиву јетре, као и утицај мелатонина на ове процесе, анализиран је кроз активности ензима алкалне ДН-азе, киселе ДН-азе и каспазе-3. Добијени резултати су приказани на графиконима 5, 6 и 7.

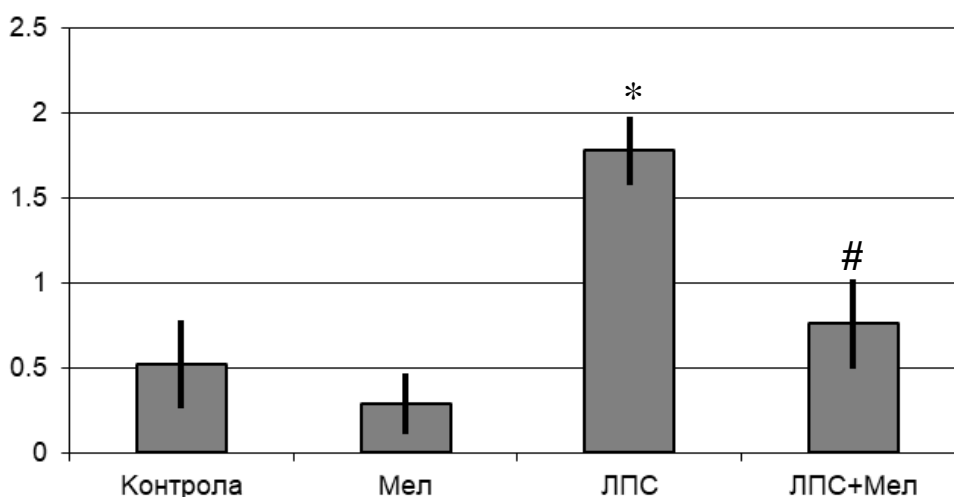


**Графикон 5.** Активност алкалне ДН-азе у ткиву јетре експерименталних животиња (U/ $\mu$ г протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи)  $\pm$  стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група здравих пацова, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи изнад стубова показују статистички значајну разлику у активности алкалне ДН-азе у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*\*\*p<0,05 у поређењу са Контролом; #p<0,001 у поређењу са ЛПС групом.

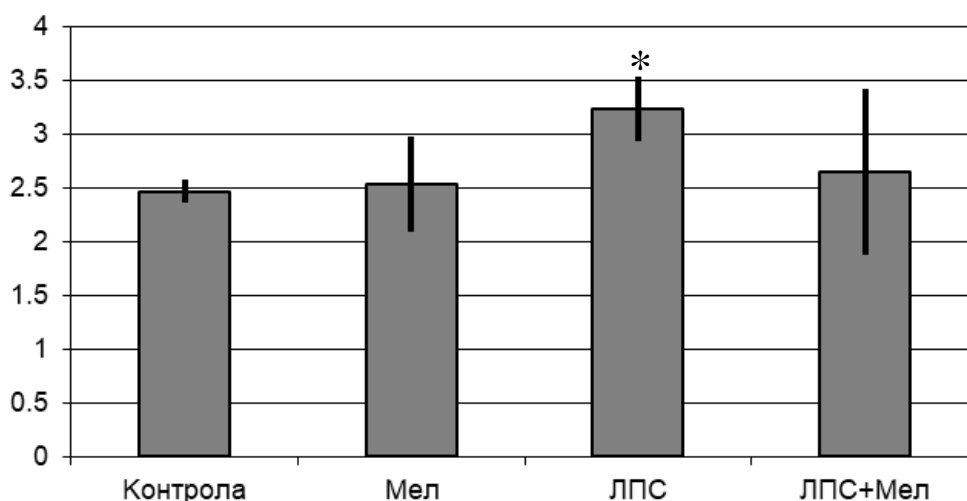
У ткиву јетре животиња са ендотоксемијом, уочава се значајно повишење активности алкалне ДН-азе у односу на контролну групу (0,84 $\pm$ 0,11 у поређењу са 0,45 $\pm$ 0,24 U/ $\mu$ г протеина, p<0,05), док је у ЛПС+Мел групи дошло до значајног снижења активности овог ензима у односу на ЛПС групу (0,58 $\pm$ 0,04 у поређењу са 0,84 $\pm$ 0,11 U/ $\mu$ г протеина, p<0,001) (Графикон 5).

На графикону 6 се види да у ткиву јетре са ендотоксемијом (ЛПС група) дошло до значајног повишења активности киселе ДН-азе у поређењу са Контролом (1,78 $\pm$ 0,20 у поређењу са 0,52 $\pm$ 0,26 U/ $\mu$ г протеина; p<0,001). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом довело је до снижења активности овог ензима у односу на ЛПС групу (0,76 $\pm$ 0,26 у поређењу са 1,78 $\pm$ 0,20 U/ $\mu$ г протеина; p<0,001).

**Кисела ДН-аза (U/ $\mu$ g протеина)**

**Графикон 6.** Активност киселе ДН-азе у ткиву јетре експерименталних животиња (U/ $\mu$ g протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи)  $\pm$  стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група здравих пацова, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи изнад стубова показују статистички значајну разлику у активности киселе ДН-азе у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001 у поређењу са Контролом; #p<0,001 у поређењу са ЛПС групом.

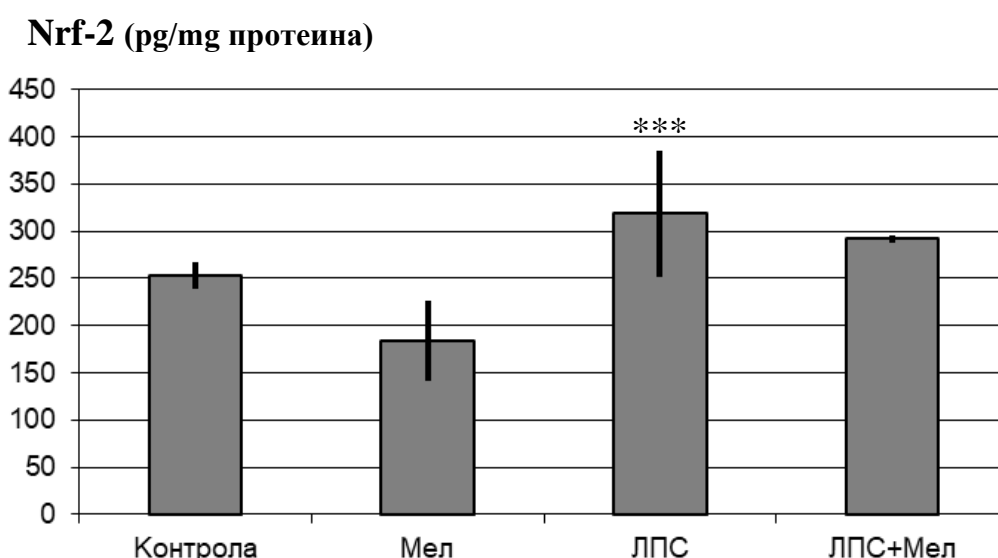
**Каспаза-3 (ng/mg протеина)**

**Графикон 7.** Активност каспазе-3 у ткиву јетре пацова (ng/mg протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи)  $\pm$  стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Симбол изнад стубова показује статистички значајну разлику у активности каспазе-3 у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001 у поређењу са Контролом.

На графикону 7 се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом изазваном липополисахаридом, дошло до значајног повишења активности ензима каспазе-3 у поређењу са Контролом ( $3,24 \pm 0,30$  у поређењу са  $2,47 \pm 0,11$  ng/mg протеина;  $p < 0,001$ ). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом довело је до снижења активности овог ензима у односу на ЛПС групу, која није била статистички значајна ( $2,65 \pm 0,77$  у поређењу са  $3,24 \pm 0,30$  ng/mg протеина;  $p = 0,100$ ).

#### 4.6. Садржај нуклеарног фактора еритроид 2 (Nrf-2) у ткиву јетре током ендотоксемије



**Графикон 8.** Ниво нуклеарног фактора еритроид 2 у ткиву јетре експерименталних животиња (pg/mg протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи)  $\pm$  стандардну девијацију (вертикалне црне линије) ( $n=7$ ). **Контрола** - контролна група здравих пацова, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Символ изнад стуба показује статистички значајну разлику у нивоу Nrf-2 у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*\*\* $p < 0,005$  у поређењу са Контролом.

На графикону 8 се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом дошло до значајног повишења садржаја Nrf-2 протеина, у поређењу са Контролом ( $319,01 \pm 66,87$  у поређењу са  $253,39 \pm 13,98$  pg/mg протеина;  $p < 0,05$ ). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом, није довело до значајне промене нивоа Nrf-2, у односу на ЛПС групу.

#### 4.7. Метаболизам Л-аргинина и катаболизам полиамина у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом

Праћење метаболизма Л-аргинина и катаболизма полиамина у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом, као и ефекта мелатонина на ове метаболичке путеве, анализиран је кроз нивое цитрулина, нитрата/нитрита (као меру азот-моноксида), активност ензима iNOS, аргиназе, као и ензима катаболизма полиамина (ПАО и ДАО). Добијени резултати су приказани на табели 7 и графикону 9 (А и Б).

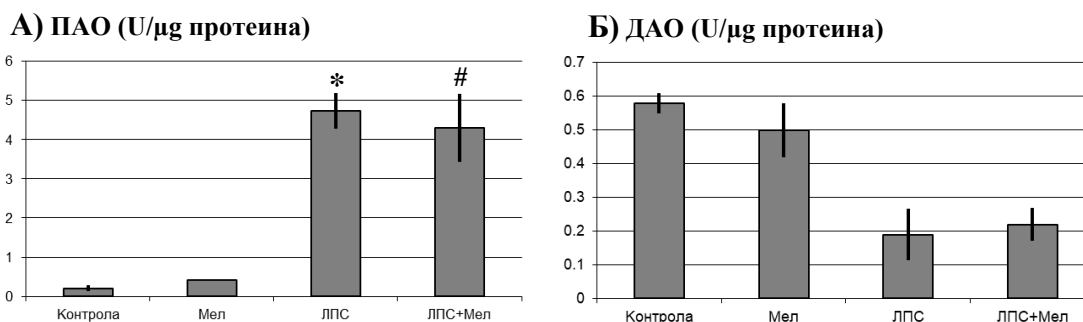
**Табела 7.** Параметри метаболизма Л-аргинина у јетри експерименталних животиња.

Параметри метаболизма Л-аргинина	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
<b>Цитрулин</b> ( $\mu\text{mol/mg}$ прот.)	0,34 $\pm$ 0,10	0,41 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,13	0,46 $\pm$ 0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> ( $\mu\text{mol/mg}$ прот.)	5,1 $\pm$ 0,9	6,3 $\pm$ 1,1	11,3 $\pm$ 1,8*	2,5 $\pm$ 0,8 <sup>#</sup>
<b>iNOS</b> (ng/mg прот.)	2,99 $\pm$ 0,34	2,98 $\pm$ 0,39	4,44 $\pm$ 0,69*	3,24 $\pm$ 0,82 <sup>###</sup>
<b>Аргиназа</b> (U/ $\mu\text{g}$ прот.)	10,1 $\pm$ 0,1	11,4 $\pm$ 0,8	6,6 $\pm$ 2,3*	7,6 $\pm$ 0,9 <sup>##</sup>

Вредности приказују средњу вредност  $\pm$  стандардну девијацију (n=7). **Контрола** - контролна група здравих животиња, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи показују статистички значајну разлику параметара метаболизма Л-аргинина у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001, \*\*p<0,01 у поређењу са Контролом; #p<0,001, ##p<0,01, ###p<0,05 у поређењу са ЛПС групом.

На табели 7 се уочава да у јетри пацова са ендотоксемијом, није запажена статистички значајна промена нивоа цитрулина. Такође на истој табели се види да је у јетри пацова са ендотоксемијом дошло до повишења концентрације нитрата/нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) у односу на Контролу (p<0,001), а у ЛПС+Мел групи дошло до значајног снижења нивоа овог параметра у односу на ЛПС групу (p<0,001). У ткиву јетре животиња са ендотоксемијом изазваном липополисахаридом, уочено је значајно повишење активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе у односу на Контролу (p<0,001), док је у ЛПС+Мел групи дошло до снижења активности iNOS у односу на ЛПС групу (p<0,05). На табели 7 се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом дошло до снижења активности аргиназе, у поређењу са контролном групом (p<0,001), док је орално давање мелатонина пацовима са ЛПС-ом довело до статистички значајног повишења активности овог ензима (p<0,01).





**Графикон 9 (А и Б).** Активност ензима полиамин оксидазе (ПАО) и диамин оксидазе (ДАО) у ткиву јетре експерименталних животиња (U/μg протеина).

Вредности приказују средњу вредност (сиви стубићи) ± стандардну девијацију (вертикалне црне линије) (n=7). **Контрола** - контролна група здравих пацова, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** - пацови са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Различити симболи изнад стубова показују статистички значајну разлику у активности ПАО у јетри пацова између група, одређивану једноструким ANOVA тестом (Tukey post-hoc тест). \*p<0,001 у поређењу са Контролом; #p<0,001 у поређењу са ЛПС групом.

На графикону 9 (А) се види да је у ткиву јетре са ендотоксемијом (ЛПС група) дошло до повишења активности ензима ПАО у поређењу са Контролом ( $4,73 \pm 0,45$  у поређењу са  $0,21 \pm 0,07$  U/μg протеина;  $p < 0,001$ ). Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом довело је до снижења активности ПАО у односу на ЛПС групу ( $4,3 \pm 0,87$  у поређењу са  $4,73 \pm 0,45$  U/μg протеина;  $p < 0,001$ ).

Активност ензима ДАО која катаболише путресцин, код пацова са ендотоксемијом, није се статистички значајно променила у ткиву јетре (Графикон 9Б).

#### 4.8. Хистопатолошке анализе ткива јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом

У табели 8 приказан је степен оштећења ткива јетре код експерименталних животиња различитих група по унапред утврђеној скали: до 25% (-), од 25 до 50 % (+), од 50 до 75 % (++) и већи од 75% (+++). У ткиву јетре пацова контролне и Мел групе уочава се нормална ћелијска морфологија, без патолошких промена у ћелијама и везивном ткиву (Табела 8, Слика 24 и 25).

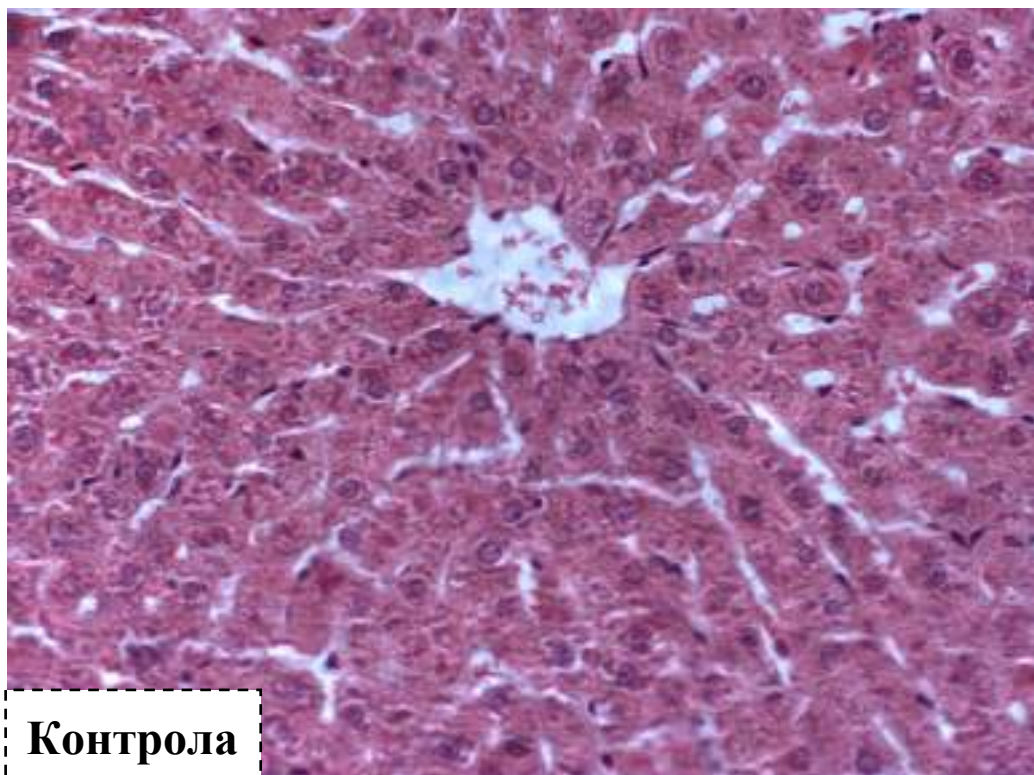
У јетри пацова изложених ЛПС-у уочава се значајна инфилтрација полиморфонуклеарних ћелија од којих доминирају неутрофили. У одређеним деловима ткива присутне су, ћелије са хиперезинофилном цитоплазмом или са везикулама, као и са малим и фрагментованим једрима (Табела 8, Слика 26). На основу микроскопске анализе одсуство ћелија у оквиру Ремаркових гредица, као и ћелије са фрагментованим и пикнотичким једрима могу се сматрати да су подлегле процесу апоптозе.

Истовремена примена мелатонина и липополисахарида је у извесној мери спречила поремећај морфологије ткива јетре (Табела 8), иако су уочене промене у овој групи скоро сличне као и у ЛПС групи, само значајно блажег интензитета (Слика 27).

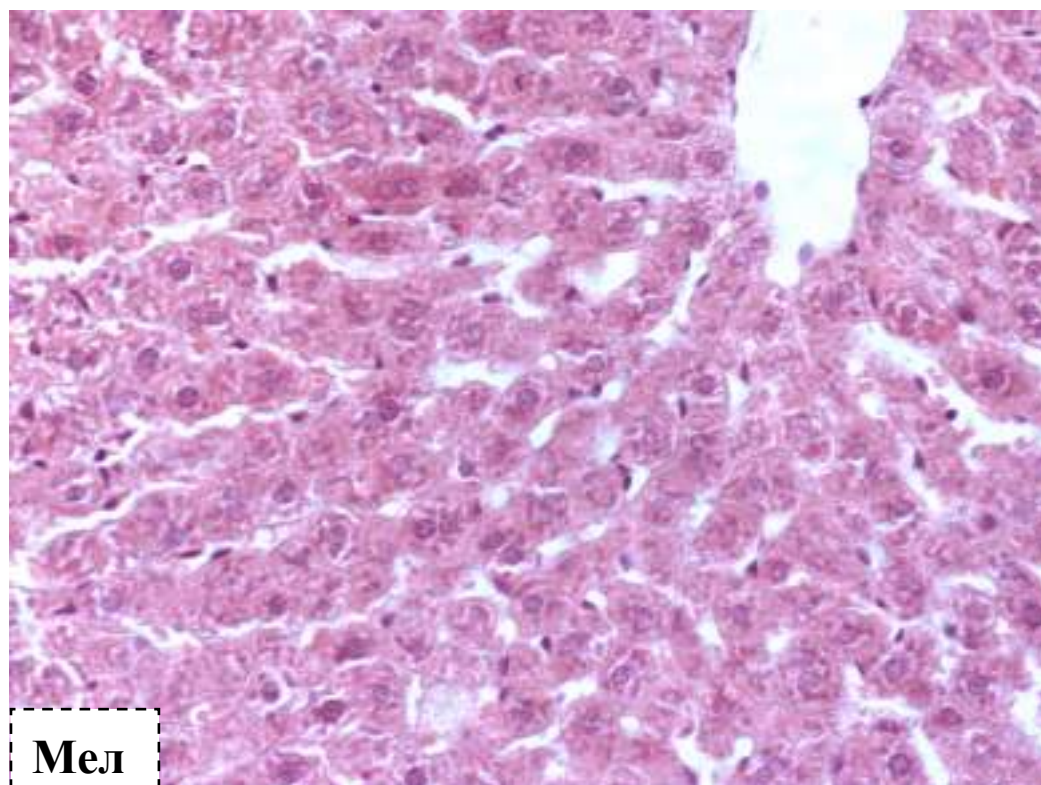
**Табела 8.** Хистоморфолошке промене у ткиву јетре пацова.

Морфолошки параметри у јетри	Контрола	Мел	ЛПС	ЛПС+Мел
Инфилтрација полиморфонуклеарних ћелија	-	-	+++	+
Хипереозинофилна цитоплазма	-	-	++	+
Везикуларна дегенерација	-	-	+	+
Апоптоичне ћелије	-	-	++	+

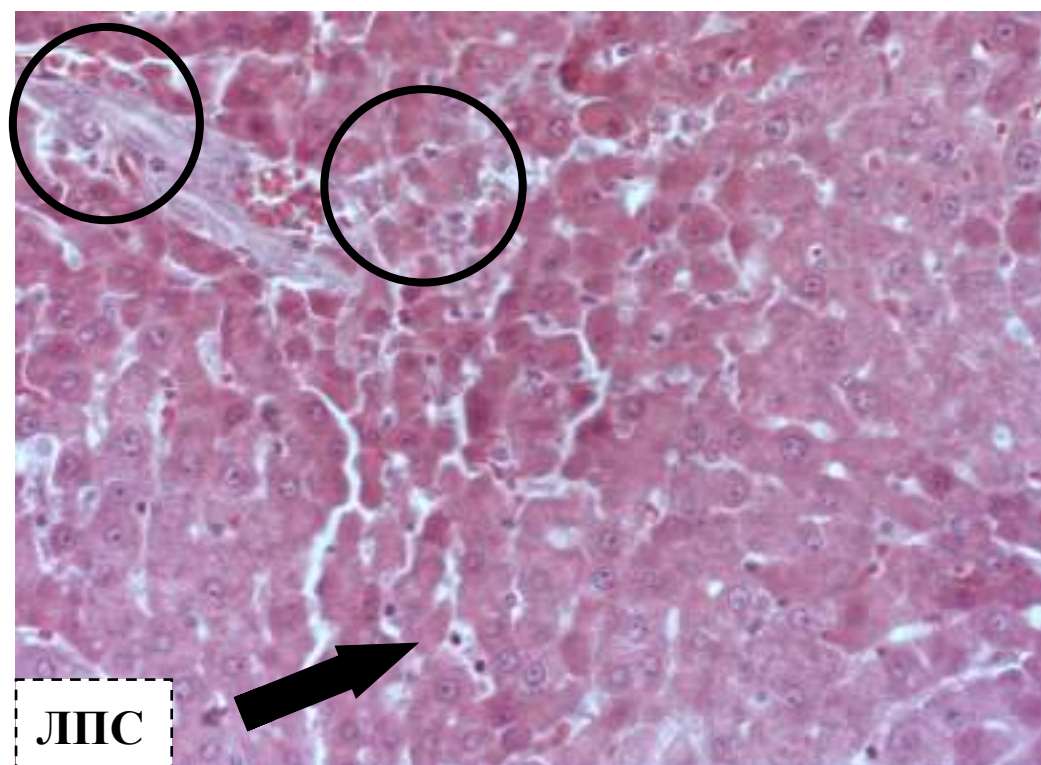
**Контрола** - контролна група здравих животиња, **Мел** - контролна група третирана мелатонином (50 mg/kg), **ЛПС** - животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (10 mg/kg), **ЛПС+Мел** – животиње са ендотоксемијом изазваном ЛПС-ом (10 mg/kg) којима је даван мелатонин (50 mg/kg). Степен оштећења је приказан до 25% (-), од 25 до 50 % (+), од 50 до 75 % (++) и већи од 75% (+++).



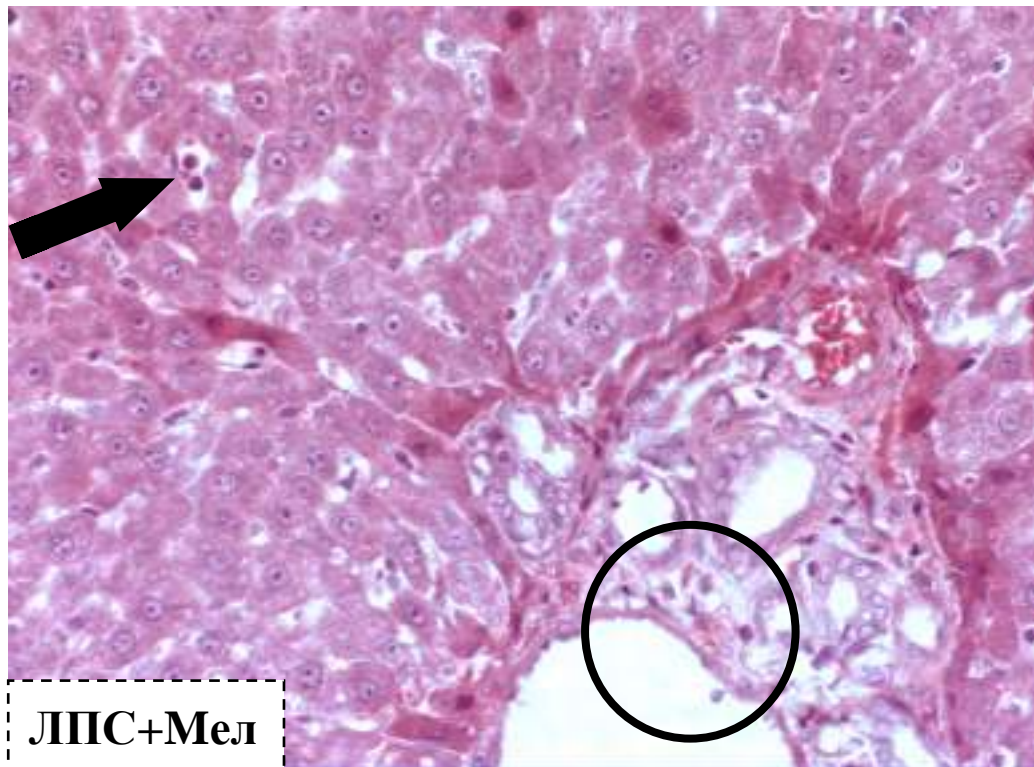
**Слика 24.** Хистоморфолошке промене у ткиву јетре контролних животиња (H&E, 200X).



Слика 25. Хистоморфолошке промене у ткиву јетре контролних животиња третираних мелатонином (H&E, 200X).



Слика 26. Хистоморфолошке промене у ткиву јетре животиње код којих је изазвана ендотоксемија липополисахаридом (H&E, 200X).



Слика 27. Хистоморфолошке промене у ткиву јетре животиње код којих је изазвана ендотоксемија ЛПС-ом и којима је даван мелатонин (H&E, 200X)

## 5. Дискусија

Сепса је са својим компликацијама и даље велики изазов у савременој медицини. У зависности од стандарда медицинске неге, широм света стопа морталитета пацијената са сепсом се креће од од 30% до 70% (Angus i sar, 2001). Упркос више од двадесет година опсежног истраживања и развоја бројних терапијских приступа који се користе у клиничким условима, инциденца сепсе и број смртних случајева повезаних са сепсом су у порасту.

Дуго се веровало да је сепса узрокована смањеним имуним одговором пацијента на инвазију микроорганизама, али се само код 50% пацијената који показују симптоме сепсе открила бактеријемја (Riedemann i Ward, 2003). Ово је узето у обзир када је 1992. установљен термин синдром системског инфламаторног одговора (SIRS), који описује хиперинфламаторно стање имунолошко/инфламаторног система, представљено повишеним нивоима проинфламаторних медијатора, са развојем синдрома мултиорганске дисфункције и мултиорганске инсуфицијенције. Развијено је неколико различитих експерименталних модела сепсе, код којих је локална интраабдоминална инфекција изазвала покретање системске упале. Уобичајени експериментални модели који се користе у истраживању сепсе имају два различита правца: 1) септички фокус који потиче од убацивања фецеса у перитонеалну шупљину или 2) убризгавање бактерија или њихових микробних компоненти (нпр. ЛПС-а) у абдоминалну шупљину или крвоток. Ови експериментални приступи покушавају да опонашају патофизиолошке промене које се обично примећују код пацијената са сепсом, у распону од бактеријемје, SIRS-а, септичког шока, вишеструких дисфункција органа и последичне смрти. Бројни терапијски покушаји су били усмерени на проинфламаторне медијаторе и имали су обећавајуће ефекте када се користе у животињским моделима сепсе, али практично нису успели да покажу значајну и примењиву клиничку ефикасност на људима (Riedemann i Ward, 2003).

Системски инфламаторни одговор се дефинише комбинацијом типичних клиничких симптома у присуству (сепсе) или одсуства микробне (бактеријске, гљивичне или паразитске) инфекције: хипо/хипертермија ( $< 36^{\circ} \text{C}$  или  $> 38^{\circ} \text{C}$ ), тахикардија ( $> 90$  срчаних откуцаја у минути), тахипнеја ( $> 20$  удисаја у минути или  $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ ) и леукоцитоза/леукопенија (број леукоцита  $> 12,000/\text{mm}^3$  или  $< 4000/\text{mm}^3$  или присуство  $> 10\%$  незрелих облика).

Најчешћи извори инфекције су плућа, јетра, абдомен и уринарни тракт, али се код само 40-60% пацијената са сепсом јавља бактеријемија. Првобитно се сматрало да је водећи узрок септичког шока инфекција грам-негативним бактеријама, али су грам-позитивне инфекције у сепси тренутно учестале или чешће од грам-негативних инфекција, а затим гљивице и паразити као узрочници сепсе (Astiz i Raskow, 1998). Просечна старост пацијената са сепсом или септичким шоком креће се од 60 до 65 година. Поред тога, разне основне болести, као и присуство дисфункције органа и генетска предиспозиција могу повећати ризик од SIRS-а и сепсе (Levy i sar, 2003). Иницијална инфекција може довести до огромне реакције урођеног имуног система са активацијом проинфламаторних каскада (нпр. система комплемента) и појавом различитих медијатора запаљења (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, C5a), што резултира SIRS-ом и прогресивном дисфункцијом различитих органа (Bone, 1991).

Системска примена ендотоксина као експериментални модел сепсе лежи у основи идеје да је одговор домаћина тај који узрокује клиничке карактеристике сепсе, а не интактни патоген сам по себи. Ендотоксин је део спољашње мембране ћелијског омотача грам-негативне бактерије. Термин ендотоксин се често користи уместо ЛПС-а, пошто ЛПС представља главну биолошки активну компонента ендотоксина. У нашем истраживању експерименталним животињама је изазвана ендотоксемија, интраперитонеалном апликацијом липополисахарида (екстрахован из бактерије *Escherichia coli* серотипа O111:B4) у дози од 10 mg/kg ТТ (Gholamnezhad i Hassanabad, 2018). Доказано је да интраперитонеално давање ЛПС-а индукује повећање проинфламаторних цитокина у серуму (Michie i sar, 1988), што је још једна паралела са септичним пацијентима, чији је повишен ниво цитокина у корелацији са тежином болести (Waage i sar, 1987). Докази да TNF- $\alpha$  и IL-1 играју кључну улогу у развоју одговора на ендотоксемију изазвану ЛПС-ом, постали су мете терапијских интервенција код пацијената са сепсом (Carswell i sar, 1975). Као резултат ових запажања, ЛПС модел ендотоксемије и сепсе представља валидан (не и стопостотни) модел за симулацију сепсе, и може се користити за утврђивање имунолошких, биохемијских и патофизиолошких промена у организму.

### **5.1. Модулаторно дејство мелатонина на хематолошке и биохемијске параметре током ендотоксемије изазване липополисахаридом**

У току сепсе се јавља акутна дисфункција органа, као и генерализовани инфламаторни и прокоагулантни одговор на инфекцију, укључујући ослобађање цитокина, активација каскадних система протеина крвне плазме, микроваскуларна коагулација и активација неутрофила и моноцита (Rigato i sar, 2001).

Неутрофили се активирају и повећава им се број у циљу контроле инфекције, али са друге стране могу бити и штетни за ткиво током сепсе. Због ове двоструке улоге, терапијски циљеви током сепсе (ендотоксемије) могу укључивати инхибицију или појачавање функције неутрофила (Karzai i Reinhart, 2000). У нашем истраживању, ендотоксемија изазвана липополисахаридом је изазвала изразито повишење броја неутрофила (Табела 1). Такође, након патохистолошке претраге, уочава се да код животиња са сепсом постоји значајна инфилтрација полиморфонуклеарних ћелија у ткиву јетре, од којих доминирају неутрофили (Табела 8 и Слика 26). Неутрофили, као главни циркулишући фагоцити, су први и најзаступљенији леукоцити који долазе у жариште инфекције током сепсе. Они су погодни за елиминацију патогених бактерија због великог садржаја протеолитичких ензима и брзе производње реактивних врста кисеоника и азота. Због тога није изненађење да ове ћелије имају кључну улогу у одбрани од бактеријских инфекција, укључујући сепсу. Доказано је да сепса нарушава имунолошку функцију изазивајући смањење урођеног имуног одговора (Cohen, 2002). Неутрофили су главни леукоцити који брзо одлазе у жаришта запаљења, као одговор на инфекцију. Миграција неутрофила из интраваскуларног у екстраваскуларни простор се претежно дешава у посткапиларним венулама, што је посредовано комбинацијом механичких, хемијских и молекуларних процеса (Seely i sar, 2003).

Први корак је "маргинација" или померање неутрофила од централног ка периферном делу крвног суда. Овај догађај омогућава молекуларну интеракцију између површине неутрофила и ендотелних ћелија, што резултира "котрљањем" неутрофила низ површину ендотела. "Котрљање" зависи и од физичких и од молекуларних сила, и оно је посредовано селектинима (Е-селектин се налази на ендотелним ћелијама, а Л-селектин на леукоцитима) (Kansas, 1996). Неутрофили се везују за адхезивне молекуле ендотела венула у одговору на хемоатрактанте, које продукују ћелије ткива у одговору на инфекцију. Адхезивна интеракција између неутрофила и ендотелних ћелија, је посредована посебним скупом молекула адхезије леукоцита (интегрини).

Интегрини, који су најважнији за адхезију неутрофила, су породица  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -интегрини,  $\alpha_L \beta 2$ -интегрин (CD11a/CD18), и рецептор макрофага 1, познат као  $\alpha M \beta 2$ -интегрин (CD11b/CD18) (Huttenlocher i sar, 1995). Након активације преко хемокинских рецептора, интегрини леукоцита се везују за чланове суперфамилије имуноглобулина присутних на мембранама ендотелних ћелија, као што су молекул интерцелуларне адхезије 1 (ICAM-1) и адхезиони молекул васкуларних ћелија 1 (Laudanna i sar, 2002).

Након адхеренције, леукоцитима је потребан градијент хемоатрактанта да би се завршио процес трансмиграције. Хемоатрактанти служе не само за усмеравање леукоцита у специфична подручија запаљења, већ и за регрутовање специфичних субпопулација леукоцита у инфицирано ткиво, као што су неутрофили - одговор на бактеријску инфекцију (Muller, 2003). Многи класични хемотактички фактори као што су фактор комплемента 5а, леукотриен Б4, фактор активације тромбоцита и бактеријски формил-пептиди нису специфични за одређене подгрупе леукоцита. Међутим, одређене врсте леукоцита могу бити привучене хемотактичким цитокинима или хемокинима. Чланови породице хемокина су класификовани према положају два цистеинска остатка присутна у њиховој примарној структури. Подкласа хемокина  $ELR^+$  CXС, односно IL-8 (или CKSCL-8), привлаче углавном неутрофиле, док су хемокини C-C, као што је моноцитни хемотактички протеин 1, хемотактични за разне леукоците (Moser i sar, 2004). Као резултат ове интеракције, леукоцити почињу да мигрирају између ендотелних ћелија кроз зид крвног суда, у смеру растућег градијента концентрације ових хемоатрактаната према месту инфекције.

Миграција неутрофила је смањена помоћу широког спектра инфламаторних медијатора, који укључују липоксине, цитокине (IL-10) и NO. Азот-моноксид је важан модулатор миграције неутрофила (Alderton i sar, 2001). Као што је раније поменуто, неутрофили су важне компоненте урођеног имунолошког одговора на било коју инфекцију. Пацијенти са ниским нивоом неутрофила имају повећан ризик од бактеријских и гљивичних инфекција (Lekstrom-Himes i Gallin, 2000).

У току ендотоксемије изазване липополисахаридом, састојак спољашње мембране грам-негативних бактерија, може покренути каскаду инфламаторних медијатора који могу довести до системске инфламације. Неутрофили играју кључну улогу у оштећењу ткива током системске инфламације (Fujishima i Aikawa, 1995). Активацију неутрофила помоћу ЛПС-а посредује CD14, 55-kDa гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-везани површински рецептор ћелије који се налази на моноцитима/макрофагима и неутрофилима. Липополисахарид везујући протеин се везује за токсични липидни А део бактеријских липополисахарида и значајно олакшава ефекат ЛПС-а на леукоците. Недавно је откривено да Toll-like рецептор-4 посредује у интрацелуларној сигнализацији након везивања ЛПС-а за CD14 (Beutler i sar, 2003).

Резултати нашег истраживања показују да ендотоксемија доводи до значајног снижења броја лимфоцита у крвној плазми (Табела 1). Многе експерименталне студије у различитим моделима сепсе, као и код пацијената који су умрли од сепсе са вишеструким оштећењем органа, показали су да она индукује велики губитак лимфоцита путем апоптозе.



Апоптоза лимфоцита, која доводи до пада њиховог броја, игра улогу потенцијалног фактора укљученог у имуносупресији и морталитету током сепсе. Доказана је повећана апоптоза Т и Б лимфоцита код пацијената који су умрли од сепсе (Hotchkiss i sar, 1999). Упркос чињеници да смрт ћелија имуног система може бити корисна јер ограничава инфламаторну реакцију повезану са сепсом, интензивна апоптоза лимфоцита доводи до смањене способности борбе организма против бактеријског патогена. Чини се да апоптоза лимфоцита може довести до слабљења имуног одговора и предиспозиције за септички шок и смрт. Ову сугестију потврђују резултати студија на трансгеним мишевима, код којих је доказана повећана експресија анти-апоптотичког Bcl-2 протеина. Ово сугерише да апоптоза лимфоцита игра важну улогу у развоју сепсе, што може утицати на њен нежељени ток. Доказано је да превенирање апоптозе лимфоцита, прекомерном експресијом антиапоптотичког протеина Bcl-2 или применом лекова који спречавају активацију каспаза, побољшавају преживљавање у сепси изазваној ендотоксином (Hotchkiss i sar, 1999).

Добијени резултати у току наше студије показују да апликавање мелатонина пацовима са ендотоксемијом, доводи до повишења броја лимфоцита (Табела 1), у односу на ЛПС групу где је овај параметар био снижен. Доказано је да мелатонин појачава имуни одговор и супротставља се стањима имунодефицијенције која су резултат акутног стреса, вирусне и бактеријске инфекције, старења или лечења токсичним лековима (Maestroni i Conti, 1993; Ben-Nathan i sar, 1996). Мелатонин као неуроендокрини медијатор, испољава неуро-имуне ефекате. Мелатонински рецептори се експримирају на лимфним ћелијама и налазе се у лимфним ткивима целог организма (Cardinali i sar, 1997). У *in vivo* студији је доказано да суплементација мелатонина поништава имуносупресију изазвану стресом и глукокортикоидима (Maestroni i sar, 1988) и подстиче пролиферацију лимфоцита и производњу антитела (Pioli i sar, 1993).

Такође доказано је да мелатонин повећава пролиферацију Б ћелија и Th1 одговор (производњу IL-2 и IFN- $\gamma$ ) и смањује Th2 цитокине као што је IL-10 (Insera i sar, 1998). Ране *in vitro* студије сугеришу да мелатонин има про-Th1 ефекте.

Субстимулисане РВМС - мононуклеалне ћелије периферне крви (енгл. Peripheral Blood Mononuclear Cells) показале су повећану производњу Th1 цитокина, као што су IL-2 и IFN- $\gamma$ , након *in vitro* третмана мелатонином (Garcia-Maurino i sar, 1999). Супротно томе, мелатонин је значајно смањио популацију CD19<sup>+</sup>Б-ћелија слезине, код мишева са експерименталном мембранском нефропатијом, и смањио прекомерну експресију TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$  (Wu i sar, 2012).

У нашем истраживању доказано је да ендотоксемија изазвана липополисахаридом доводи до снижења броја тромбоцита, у крви експерименталних животиња (Табела 1). У ЛПС+Мел групи не долази до значајне промене броја тромбоцита у крви, у односу на ЛПС групу (Табела 1). Већина клиничара потврђује да су тромбоцити укључени у патогенезу сепсе, и то због чињенице да је изражена тромбоцитопенија уобичајена карактеристика сепсе. Инциденца тромбоцитопеније (број тромбоцита  $< 150 \times 10^9/L$ ) код критично болесних пацијената са сепсом је 35-44% (Strauss i sar, 2002). Број тромбоцита  $< 100 \times 10^9/L$  се примећује код 20-25% пацијената са сепсом, док 12-15% пацијената има број тромбоцита  $< 50 \times 10^9/L$ . Потврђено је да се број тромбоцита код пацијената са сепсом смањује током прва 4 дана, у јединицама интензивне неге (Акса i sar, 2002). Сепса је фактор ризика за тромбоцитопенију код критично болесних пацијената, а тежина сепсе је у корелацији са смањењем броја тромбоцита (Mavrommatis i sar, 2000). Механизам који доводи до тромбоцитопеније код сепсе, није потпуно јасан. Смањена производња тромбоцита унутар коштане сржи може изгледати контрадикторно високим нивоима проинфламаторних цитокина који стимулишу производњу тромбоцита (TNF $\alpha$  и IL-6), и високом концентрацијом циркулишућег тромбопоетина код септичних пацијената. Ови цитокини и фактори раста би теоретски требало да стимулишу мегакариопоезу у коштаном сржи. Међутим, код значајног броја пацијената са сепсом може доћи до изражене хемофагоцитозе, која се састоји од активне фагоцитозе мегакариоцита и других хематопоетских ћелија моноцита и макрофага, хипотетички због стимулације високим нивоом фактора стимулације колонија макрофага (M-CSF) у сепси (Francois i sar, 1997). Повећана потрошња тромбоцита се јавља код пацијената са сепсом, због континуираног стварања тромбина (који је *in vivo* најмоћнији активатор тромбоцита). Пре више од 30 година идентификовано је учешће тромбоцита у коагулопатији повезаној са сепсом, фокусирајући се на интеракцији тромбоцита са ендотоксином.

У окружењу активације коагулације изазване инфламацијом, тромбоцити се могу активирати директно ендотоксином (Zielinski i sar, 2002) или проинфламаторним медијаторима, као што је фактор активирања тромбоцита (Zimmerman i sar, 2002). Ослобађање инфламаторних медијатора и фактора раста може бити још једна веза између активације коагулације и инфламације.

Резултати нашег истраживања показују да ендотоксемија код експерименталних животиња није довела до значајне промене тромбоцито-лимфоцитног (PLR) односа, али је изазвала значајно повишења неутрофилно-лимфоцитног (NLR) односа, у односу на контролну групу (Табела 2).

У последње време септична стања се прате PLR и NLR индексима, који представљају најновије маркере одговора организма на инфламацију и предвиђају прогнозу болести (Farkas, 2020).

Због повећања броја неутрофила и смањења броја лимфоцита, повећање NLR индекса указује на лоше здравствено стање пацијената са сепсом, који су најчешће смештени у јединицама интензивне неге. Такође NLR индекс је поуздани маркер раног септичког шока, служи за праћење терапије и корелира са порастом нивоа прокалцитонина (PCT) (Ljungström i sar, 2017). Генерално, број неутрофила и NLR у крви се повећава са напредовањем сепсе. Неутрофилно-лимфоцитни однос се једноставано израчунава, лако се добија, и зато представља одличан показатељ прогнозе пацијената са сепсом.

De Jager i sar. (2010) су истраживали да ли реципрочни однос броја неутрофила и лимфоцита може боље предвидети бактеријемiju од стандардних маркера инфекције у јединици хитне медицинске помоћи (истраживање је било спроведено код 92 пацијената). Закључили су да су у условима хитне медицинске помоћи, лимфоцитопенија и NLR индекс бољи предиктори бактеријемije од рутинских параметара (CRP-а и броја неутрофила) (De Jager i sar, 2010). Доказано је да је однос броја неутрофила и лимфоцита био лако мерљив параметар за одређивање прогнозе током праћења пацијената у јединици интензивне неге и да се може рутински користити у свакодневной клиничкој пракси (Zahores, 2001).

NLR индекс има време индукције од 6 сати те обзиром да расте брже након наступа акутног физиолошког стреса од броја леукоцита или појаве скретања у лево, може се закључити да је поузданији маркер раног септичког шока у односу на остале биомаркере сепсе. Овај индекс има релативно високу осетљивост, али ниску специфичност, и најбоље корелира са порастом PCT-а (Vincent i sar, 2018). Осим за постављање дијагнозе тешке сепсе и септичког шока, неутрофилно-лимфоцитни однос се може користити и за праћење успеха терапије. Доказано је да код пацијената који добро реагују на терапију и опорављају се од сепсе, NLR индекс почиње да пада кроз неколико дана после терапије (Vincent i sar, 2006).

PLR индекс се често користи у дијагнози и прогнози сепсе код новорођенчади и одраслих. Доказано је да је висок PLR је значајно повезан са повећаним морталитетом пацијената са сепсом (Shen i sar, 2019). Међутим нека истраживања су показала не тако значајне резултате везане за употребу PLR индекса као показатеља исхода сепсе (Bharadwaj i sar, 2018). Резултати у нашем истраживању су показали да ендотоксемија није довела до значајних промена тромбоцитно-лимфоцитног односа (Табела 2).

Трансаминазе (ALT и AST) су ензими присутни у многим ткивима, али њима је најбогатија јетра. Јетра је нешто богатија AST-ом него ALT-ом, али се ALT ипак сматра специфичнијим ензимом јетре. ALT је цитозоларни ензим хепатоцита, тако да и код мањих оштећења ткива јетре излази у циркулацију, јер је довољно да се само промени пропустљивост ћелијске мембране да би ензим из цитоплазме могао прећи у ванћелијску течност. AST је присутна у митохондријама (mAST, 60-70%) и цитозолу (cAST, 30-40%) хепатоцита. Познато је да при релативно малим оштећењима ћелија јетре, услед нарушавања функционалног интегритета ћелијске мембране, због своје цитоплазматске локализације ALT излази у екстрацелуларну течност. Код тежих оштећења јетре (некрози хепатоцита) у крв се поред ALT-а ослобађа и митохондријална AST.

У нашем истраживању, ендотоксемија изазвана липополисахаридом је довела до значајног повишења активности ензима маркера оштећења јетре (ALT и AST) (Табела 3). Трансаминазе, као класични маркери оштећења јетре, ослобађају се из цитоплазме и митохондрија хепатоцита у међућелијски простор, као резултат оштећења ћелија јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом. Добијени резултати указују на то да у условима ендотоксемије, РВК створене у Kupffer-овим ћелијама оштећују хепатоцелуларну мембрану хепатоцита и доводе до изласка ALT-а у циркулацију (Schmucker i sar, 1990). Такође, долази и до оштећења митохондрија хепатоцита, повећавањем нивоа оксидативног стреса, липидне пероксидације и иницирањем апоптозе, што може довести и до ослобађања митохондријалне AST у циркулацију. Доказан је велики број случајева сепсе које изазивају грам-негативне бактерије (*Escherichia coli*), који је повезана са холестазом, у којима долази до значајног повећања активности трансаминаза у крвној плазми (Zimmerman i sar, 1979).

У нашем истраживању, орално давање мелатонина животињама са ендотоксемијом довело је у серуму до снижења активности ензима ALT, у односу на ЛПС групу у којој је активност овог ензима повишена (Табела 3). Ово је доказ да је апликовање мелатонина делимично спречио оштећење јетре током ендотоксемије. Акутно оштећење јетре је озбиљна компликација сепсе, која доводи до коагулопатије, поремећене метаболичке хомеостазе, измењеног менталног статуса и смрти. Доказано је значајно хепатопротективно дејство мелатонина код хроничног оштећења јетре (Mortezaee i Khanlarkhani, 2018). Мелатонин штити ткиво јетре, током ендотоксемије, јер смањује производњу азот-моноксида (Crespo i sar, 1999). Његова антиоксидативна својства се огледају у смањењу липидне пероксидације и повећању активности антиоксидативних ензима (највише SOD), у јетри пацова третираних липополисахаридом (Wang i sar, 2004).

Током инсуфицијенције јетре која се јавља у експерименталном моделу сепсе код пацова, долази до поремећаја метаболизма глукозе, повећања активности трансаминаза и нивоа IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6, док давање мелатонина пацовима са сепсом доводи до нормализације ових параметара (Chen *et al.*, 2019).

Резултати у нашем експерименталном истраживању показују да ендотоксемија доводи до значајног повишења активности ензима СРК (Табела 3). У ЛПС+Мел групи не долази до значајне промене активности овог ензима, у односу на ЛПС групу (Табела 3). Доказано је да се јавља дисфункција митохондрија, упркос стабилној оксигенацији ткива током сепсе (Crouser, 2004). Дакле, бактеријска сепса и медијатори синдрома сепсе су способни да изазову митохондријалну дисфункцију која је доказана у јетри (Crouser *et al.*, 2004; Zapelini *et al.*, 2008), срцу (Joshi *et al.*, 2006), скелетним мишићима (Protti *et al.*, 2007) и илеуму (Crouser *et al.*, 2004). У овом контексту, Mesaris *et al.* (2004) су доказали апоптозу у мозданом ткиву, посредовану митохондријама у раној фази сепсе. Доказано је да је повећање активности ензима СРК и оксидативно оштећење митохондрија настало када су животиње показивале знаке дисфункције ЦНС-а. Инхибиција митохондријалне функције може смањити производњу АТП-а. Доказано је повећање активности СРК у малом мозгу, хипокампусу, кортексу и стријатуму, 6 сати након појаве сепсе. Повећани капацитет регенерације АТП-а преко реакције СРК може бити повезан са кашњењем у исцрпљивању АТП-а и на тај начин, за заштиту мозга од оштећења. Ензим креатин фосфокиназа игра централну улогу у метаболизму ткива која троше високу енергију, као што је мозак. Овај ензим катализује реверзибилни трансфер фосфатне групе са креатин-фосфата на АДП, регенеришући АТП. У овом контексту, широко је показано да је смањење активности СРК повезано са неуродегенеративним оштећењима који доводи до губитка неурона (Brustovetski *et al.*, 2001). Претпоставља се да је у нашем истраживању, повећање активности СРК током ендотоксемије, могао бити акутни одговор на дисфункцију мозга изазвану липополисахаридом.

Акутна бубрежна инсуфицијенција (АВІ) је велика опасност за здравље људи, која штетно утиче на здравље пацијената и годишње доводи до око 1,4 милиона смртних случајева у свету (Jiang *et al.*, 2018). Она је врло честа компликација ендотоксемије узроковане липополисахаридом (Schrier *et al.*, 2004). Током ендотоксемије настају хемодинамске промене које мењају бубрежни проток крви и брзину гломеруларне филтрације (Millar *et al.*, 1997). Тешка септична стања су клинички праћена азотемијом и олигуријом, а само бубрежно оштећење може варирати од минималне протеинурије до АВІ.

Смањена диуреза у току сепсе најчешће је последица хипотензије, а најчешћи патогенетски механизми акутног бубрежног оштећења су хиповолемија и ренална вазоконстрикција. Осим што се најчешће карактерише олигуријом и азотемијом, АВІ је праћена хиперкалијемиијом и ацидозом, сниженим садржајем натријума у урину, повишеним нивоима урее и креатинина уколико се примарно ради о пререналном оштећењу, а уколико је у питању акутна тубуларна некроза очекује се и повећање активности ензима СРК и присуство тубуларних цилиндра (Gholamnezhad i Hassanabad, 2018). Липополисахарид је важан проинфламаторни фактор, који је у стању да изазове ендотоксемију са сепсом, као и вишеструку дисфункцију бубрега. Неколико модела АВІ и сепсе код експерименталних животиња је успешно успостављено интраперитонеалном или интравенозном апликацијом ЛПС-а. Наша истраживања су доказала да је у серуму пацова са ендотоксемијом дошло до повишења нивоа урее и креатинина (Табела 4). Доказано је да липополисахарид изазива велики поремећај бубрежне кортикалне перитубуларне перфузије, апоптозу бубрежних ћелија, као и бубрежну инсуфицијенцију. Код АВІ изазване ЛПС-ом, повреда васкуларних ендотелних ћелија (Kamal i sar, 2018), миграција неутрофила (Lee i sar, 2005) или интраваскуларна коагулација (Gunnnett i sar, 1998) играју значајну улогу у механичкој опструкцији малих крвних судова у бубрегу и доприносе бубрежној инсуфицијенцији. Концентрација урее и креатинина у серуму су важни индикатори оштећења бубрега (Cunningham i sar, 2002). У нашем истраживању, значајно повећање нивоа урее и креатинина у серуму код пацова третираних ЛПС-ом указује на оштећење структуре нефроцита и бубрежну дисфункцију (Schrier i Wang, 2004).

Из табеле 4 се примећује да апликовање мелатонина пацовима са ендотоксемијом доводи до снижења концентрације урее и креатинина у серуму експерименталних животиња, у односу на ЛПС групу. Наши резултати указују да предтретман мелатонина животињама са ендотоксемијом, значајно смањује нивое непротеинских азотних једињења у серуму, вероватно због одржавања интегритета мембране ћелија бубрега (Doi i sar, 2009). Неурохормон мелатонин је пружио значајну заштиту бубрега, у нашем експерименталном истраживању. Он има способност да се широко дистрибуира у организам и да продире у сваки субћелијски одељак бубрега, као и да инактивира слободне радикале на свом путу деловања. Доказано је да мелатонин неутралише токсичне ефекте слободних радикала у ткиву бубрега (хидроксилни радикал,  $H_2O_2$ , липидни пероксид и пероксинитрит) и стимулише активност антиоксидативних ензима (SOD и GPx) (Reiter i sar, 2000).

Неколико експерименталних истраживања је показало да мелатонин испољава нефропротективно дејство, тако што повећава концентрацију GSH у ткиву бубрега. Показало се да мелатонин смањује тубуларну некрозу и спречава оштећење бубрежне функције, у моделу оштећења тубула бубрега посредованог РВК (Ferraz i sar, 2002).

Из табеле 4 се примећује да је у серуму пацова са ендотоксемијом долази до значајног повишења нивоа триглицерида. Доказано је да када су животиње или људи изложени инфективним агенсима или ендотоксином, долази до значајних промена у дистрибуцији циркулишућих липопротеина. Ова "липемичка сепса" је првобитно описана крајем 1950. године, када је примећено да пацијенти са колером имају изразито липемичну крв и висок ниво триглицерида у серуму (Banerjee i Bhaduri, 1959). Експерименталне студије су показале да је "липемичка сепса" првенствено последица акумулације VLDL липопротеина, као и повећања нивоа глицерола, триглицерида и масних киселина (Samra i sar, 1996). ЛПС и цитокини повећавају активност ензима ацил КоА синтетазе у митохондријама, што доводи до повећане естерификације слободних масних киселина и повећане производње триглицерида (Nonogaki i sar, 1994).

## **5.2. Модулаторно дејство мелатонина на имунолошке параметре у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом**

Липополисахарид је одговоран за буран имуни одговор домаћина који резултира септичким шоком. ЛПС утиче на ћелије јетре и других ткива да производе велику количину про-инфламаторних медијатора (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), активирањем неколико типова транскрипционих фактора. Једна од главних мета ЛПС сигнализације је нуклеарни фактор кара-В, кључни регулатор имуних и инфламаторних одговора (Ghosh i sar, 1998).

Јетра испољава значајну имунолошку улогу против системских и цревних патогена (који се до ње преносе порталним системом), па је у том смислу утврђено да је концентрација ендотоксина у порталној циркулацији већа од концентрације у периферној крви (Kubes i Jenne, 2018). Ћелије јетре учествују у мрежном систему дизајнираном да открију, ухвате и активирају адекватни имуни одговор против циркулишућих микроорганизама. У ту сврху заједно са хепатоцитима, велика популација макрофага, неутрофили, уређеноубилачке (NK) ћелије, лимфоцити, дендритске ћелије, Б ћелије, звездасте ћелије јетре (HSC) и синусоидне ендотелне ћелије јетре (LSEC) доприносе имунолошком одговору јетре током сепсе (Yan i sar, 2014; Strnad i sar, 2017).

Доказано је да је клиренс бактерија из јетре важан за смањење нивоа ЛПС-а у плазми, што снижава тежину имуног одговора и побољшава исход пацијената са сепсом (Deng i sar, 2013).

Дистрибуција Toll-like рецептора 4, као главног посредника ЛПС ефекта у јетри, је најизраженија у Kupffer-овим ћелијама (КС) и синусоидним ендотелним ћелијама јетре, а слабије изражена у хепатоцитима (Gaitantzi i sar, 2020). У *in vivo* истраживањима је доказано да ЛПС прво ступа у реакцију са КС и LSEC у синусоидима, а на крају и са звездастим ћелијама у Дисеевим просторима јетре. Доказано је да је TLR-4 примарни сигнални рецептор за ЛПС, у присуству CD14 и LBP молекула (Akashi i sar, 2000).

Резултати овог истраживања показују да ендотоксемија изазвана липополисахаридом код експерименталних животиња, доводи до значајног повишења нивоа С-реактивног протеина у серуму (Табела 4). С-реактивни протеин је серумски протеин акутне фазе (Volanakis, 2001). Његов ниво се повећава у крви, као одговор на упалу, трауму или инфекцију. Протеини акутне фазе се првенствено производе у јетри као одговор на цитокине које производе макрофаги, укључујући IL-1 и IL-6. Ови протеини играју важну улогу у заштити од инфекције, уклањању оштећеног ткива, превенцији аутоимунизације и регулацији инфламаторног одговора. CRP се сматра прототипским реактантом акутне фазе код човека јер се његова концентрација у крви повећава са  $< 1 \text{ mg/ml}$  на неколико стотина  $\text{mg/ml}$ , у првих 24-48 h акутног одговора.

Доказано је да CRP има и проинфламаторне и антиинфламаторне ефекте, *in vitro* и *in vivo*. *In vitro*, CRP индукује производњу IL-1 и TNF, од стране хуманих моноцита и макрофага (Galve-de Rochemonteix i sar, 1993). У другим студијама, повећани нивои CRP-а су деловали антиинфламаторно, а тако високе концентрације CRP-а такође инхибирају хемотаксију неутрофила (Zhong i sar, 1998). Доказано је да CRP испољава јаку антиинфламаторну активност која штити мишеве од смрти, услед ЛПС оштећења (Xia i Samols, 1997).

Код трансгених мишева, индукција синтезе CRP-а исхраном повећала је отпорност од оштећења деловањем ЛПС-а. Недавни налаз да CRP ступа у интеракцију са ћелијама преко FcγR сугерише могући механизам заштите посредоване CRP-ом (Bharadwaj i sar, 1999).

Доказано је да IgG комплекси или IgE обложен IgG могу индуковати производњу антиинфламаторних цитокина, IL-10 и смањити производњу проинфламаторног цитокина, IL-12. Стога смо претпоставили да би CRP могао деловати на сличан начин као IgG да ограничи упалу током одговора акутне фазе.



Међу најистакнутијим и најбоље разјашњеним процесима током ендотосемије је активација NF- $\kappa$ B, који игра централну улогу у регулацији инфламаторних и имуних одговора. У нашем истраживању, примећује се да је у ткиву јетре са ендотоксемијом дошло до значајног повишења нивоа NF- $\kappa$ B (Графикон 2). Доказано је да у нормалним стањима (условима мировања), NF- $\kappa$ B се секвестрира у цитозол као неактивни хомо- или хетеродимерни облик, који нековалентно реагује са својим инхибиторним протеинима познатим као I $\kappa$ Bs. После стимулације одговарајућим агонистима, I $\kappa$ B је фосфорилисан, убиквитиниран и деградиран. NF- $\kappa$ B се затим ослобађа, транслоцира у језгро и покреће експресију различитих гена. Гени на које делује NF- $\kappa$ B укључују оне који кодирају синтезу различитих проинфламаторних цитокина (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), хемокина, молекуле адхезије, протеине акутне фазе (CRP), антимикробне пептиде, ензиме iNOS и циклооксигеназу 2 (COX-2). Заједно обезбеђују тренутну заштиту домаћина од инфекције и промовишу развој адаптивних имуних одговора. Као што је горе наведено, Toll-like рецептор 4 је примарни трансмембрански сигнални рецептор за ЛПС. Након везивања ЛПС за CD14, ЛПС се може пренети на TLR-4, што доводи до хомодимеризације TLR-4 и конформационе промене у цитоплазматском домену. Након тога, адаптерски протеин MyD88 се регрутује у рецептор, након чега следи интеракција са IL-1R (IRAK)-1, -2 или -M. IRAK се затим одваја од комплекса рецептора и стимулише фактор 6 повезан са TNF рецептором (TRAF6), што на крају резултира активацијом IKK $\alpha$ /b/g комплекса и накнадном фосфорилацијом и деградацијом I $\kappa$ B и нуклеарном транслокацијом NF- $\kappa$ B (Ghosh *et al.*, 1998; May *et al.*, 1998).

У нашем истраживању, давање мелатонина животињама са ендотоксемијом довело је до снижења нивоа NF- $\kappa$ B, у односу на ЛПС групу у којој је њихова концентрација значајно повишена (Графикон 2). 1995. године први пут је описано да мелатонин блокира синтезу NF- $\kappa$ B у HELA ћелијама, стимулацијом проинфламаторног цитокина - TNF- $\alpha$  (Mohan *et al.*, 1995). Такође је доказано, да мелатонин снижава ниво NF- $\kappa$ B, који је повишен у стањима са интензивним оксидативним стресом или PAMP-овима. Доказано је да мелатонин смањује активацију NF- $\kappa$ B у макрофагима (Gilad *et al.*, 1998), T ћелијама, ћелијама јетре и бубрега (Bruck *et al.*, 2004). Мелатонин спречава транслокацију NF- $\kappa$ B у једро и његово везивање за ДНК молекуле, и тако умањује инфламаторни одговор јетре на примену липолисахарида, смањујући регулацију различитих проинфламаторних цитокина и адхезионих молекула. Мелатонин испољава значајне антиинфламаторне ефекте, инхибирањем NF- $\kappa$ B и сродних медијатора, који учествују у инфламацији, и тако смањује испољавање системског инфламаторног одговора (Srinivasan *et al.*, 2012).

Резултати овог истраживања показују да ендотоксемија изазвана липополисахаридом, доводи до значајног повишења нивоа цитокина TNF- $\alpha$  и IL-6 у ткиву јетре (Графикони 3 и 4). Доказано је да проинфаматорни цитокини и то TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6, ослобођени из активираних Kupffer-ових ћелија представљају моћне стимулансе, који индукују експресију NGAL-а (Lipocalin-2) из оштећених хепатоцита. Ослобођени NGAL индукује Kupffer-ове ћелије да ослобађају различите хемокине (хемотаксичне цитокине), који привлаче неутрофиле и моноците из крви на место инфекције и додатно повећавају запаљење и оштећење ткива јетре. Привучени неутрофили из својих гранула ослобађају РВК, протеазе, МПО који додатно погоршавају оштећење и изазивају некрозу хепатоцита (Dong i sar, 2019).

Током ендотоксемије, Kupffer-ове ћелије јетре ослобађају различите хемотаксичне цитокине који привлаче моноците из крви у екстраваскуларне просторе ткива јетре, а који се затим диференцирају у макрофаге (Kupffer-ове ћелије). TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  имају такође системски ефекат, индукујући грозницу дејством на хипоталамус, а ови цитокини заједно са IL-6 стимулишу ћелије јетре да производе различите протеине у реакцији акутне фазе, као што су CRP и фибриноген, који доприносе убијању микроорганизама и ограничавају места инфекције. У великим концентрацијама TNF- $\alpha$  поспешује формирање тромба на ендотелу и смањује крвни притисак услед смањења контрактилности миокарда, ширења крвних судова и повећања њихове пропустљивости. Тешке, дисеминоване бактеријске инфекције понекад изазивају потенцијално смртоносни клинички синдром назван септични шок, за који је карактеристичан низак крвни притисак, ДИК и метаболички поремећаји. Такође је доказано је да су IL-6 и TNF- $\alpha$  главни фактори раста и пролиферације хепатоцита. Они делује на суседне хепатоците и сигналном трансдукцијом активирају гене за транскрипциони протеин 3 и покрећу пролиферацију хепатоцита. Такође се показало да IL-6 преокреће регенерацију јетре током њене исхемије, и повећава експресију нуклеарног антигена пролиферирајућих ћелија (PCNA) у стеатотичној јетри након великог губитка ткива (Selzner i Clavien, 2000).

Доказано је да су IL-6 и активатор транскрипционог протеина 3 укључени у опоравак органа након трансплантације јетре (Debonera i sar, 2001). Тако да се повишење нивоа цитокина TNF- $\alpha$  и IL-6 у ткиву јетре током ендотоксемије може објаснити тежњом хепатоцита за растом и пролиферацијом, током њиховог оштећења.

IL-18 кога производе Kupffer-ове ћелије, главни је фактор који изазива оштећење јетре, стимулисањем лучења интерферон-гама (IFN- $\gamma$ ) - који доводи до апоптоте хепатоцита. Такође синусоидне ендотелне ћелије јетре производе NO, који индукује лучење ендотелина-1 (ET-1) - укљученог у инфламаторни одговор (Woznica i sar, 2018).

Такође, хепатоцити реагују на TNF- $\alpha$ /IL-6 сигнал који производе КС и LSEC, стварајући инфламаторне APP и то: CRP, sCD14, LBP, фибриноген, протромбин, хаптоглобин и  $\alpha$ -1 антитрипсин.

Истраживања су показала да мелатонин инхибира ЛПС-стимулисану производњу TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и IL-10 у ћелијама, кроз механизам који укључује смањење нивоа NF- $\kappa$ B (Xia i sar, 2012). Такође, мелатонин смањује синтезу IL-6 и NO, током ендотоксемије изазване липополисахаридом, блокирањем NF- $\kappa$ B сигналног пута, односно блокирањем његове једарне транслокације и везивање за ДНК субјединице NF- $\kappa$ B p50 и супресије STAT-1 сигнализације (Choi i sar, 2011). Поред тога, мелатонин смањује експресију TNF- $\alpha$  и iNOS посредовану TLR-3, инхибицијом активације NF- $\kappa$ B у макрофагалним ћелијама raw 264.7, инфицираним респираторним вирусом (Huang i sar, 2008). Доказано је да мелатонин смањује повећње нивоа TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6, изазвано метамфетаминем у НАPI глијалним ћелијама пацова (Tocharus i sar, 2010) и прекомерну производњу TNF- $\alpha$  и IL-6 изазвану амилоидом-бета (Norpe i sar, 2010). Резултати нашег истраживања, показују да давање мелатонина животињама са ендотоксемијом доводи до снижења нивоа цитокина TNF- $\alpha$  и IL-6 у ткиву јетре, у односу на ЛПС групу у којој је њихова концентрација значајно повишена (Графикони 3 и 4) и они су у складу са резултатима предходно поменутих истраживања. Такође у ранијим истраживањима је доказано да мелатонин блокира прекомерну производњу проинфламаторних цитокина, посебно TNF- $\alpha$ , и повећава ниво IL-10 (Carrillo-Vico i sar, 2005). Поред тога, потврђено је да мелатонин повећава тежину слезине током ендотоксемије (Reynolds i sar, 2003) и снижава интензитет апоптозе ћелија слезине током сепсе. Штавише, мелатонин је неутралисао инфламаторну инфилтрацију у различитим ткивима животиња са сепсом (Wu i sar, 2008).

Добијени резултати у току наше студије показују да у ткиву јетре са ендотоксемијом долази до значајног повишења активности МПО, док орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом (ЛПС+Мел група) доводи до снижења активности овог ензима (Графикон 1). Ензим МПО је хем пероксидаза и један је од најзаступљенијих протеина у неутрофилним леукоцитима (Nicholls i Hazen, 2005), чинећи приближно 5% укупних неутрофилних протеина (Klebanoff i sar, 2013). Данас је познато да се МПО налази углавном у азурофилним гранулама леукоцита, а у мањој мери и у примарним лизозомима моноцита (Aratami, 2018).

Мијелопероксидаза има значајну бактерицидну улогу, тако када фагоцитују бактерије, неутрофили подлежу респираторној експлозији, коју покреће комплекс NADPH-оксидазе, који се нагомилава на мембрани фагозома. Водоник-пероксид неопходан за ову реакцију добија се дисмутацијом супероксид анјон радикала, под каталитичким дејством SOD (Klebanoff i sar, 2013).

Мијелопероксидаза катализује реакцију халогена ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  и  $\text{I}^-$ ) и псеудохалоген (тиоцијанат -  $\text{SCN}^-$ ) јона са  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при чему настају хипохлорна ( $\text{HOCl}$ ), хипобромна ( $\text{HOBr}$ ) и хипотиоцијанатна ( $\text{HOSCN}$ ) киселина. Због велике концентрације  $\text{Cl}^-$  у ћелијама јетре и других органа, најзначајнији производ је  $\text{HOCl}$ , који је потентнији оксиданс и има јаче цитотоксично дејство од супероксид анјона и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Мијелопероксидаза је једини ензим у организму сисара способан да катализује ову реакцију, а  $\text{HOCl}$  је доминантан за лизу микроорганизама која се одвија у неутрофилним фагозомима. Мијелопероксидаза је ензим који повезује оксидативни стрес и инфламацију. Поред бактерицидног дејства, познато је да МПО може довести до оксидативних или хемијских модификација липопотеина (Nicholls i Hazen, 2009). Пошто МПО генерише формирање реактивних радикала као што су:  $\text{HOCl}$ , хлорамин, тирозил радикале, азот-диоксид, који су способни да покрену процес пероксидације липида и протеина, то може довести до поремећаја ћелијских функција и доприноси оштећењу ткива јетре (Zhang i sar, 2002; Winterbourn i sar, 2016; Aratami, 2018).

Мијелопероксидаза је ензим који катализује стварање моћних оксиданата, који су укључени у патогенезу различитих болести укључујући сепсу, атеросклерозу, бронхиалну астму, артритис и тумор. Липидна пероксидација посредована МПО, игра кључну улогу у патогенези многих поремећаја укључујући артритис и болести плућа, срца и јетре. МПО је ензим/протеин молекулске масе 150-165 kDa синтетисан током мијелоидне диференцијације и чини главну компоненту неутрофилних азурофилних гранула. МПО показује способност да катализује  $\text{H}_2\text{O}_2$  зависну пероксидацију халида и псеудохалида (Nauseef i Malech, 1986).

Томом ендотоксемије, неутрофили играју кључну улогу у инфламаторном одговору, тако да они лако одлазе на места запаљења, где препознају и фагоцитирају патогене. Убијајућа активност неутрофила подржава мултиензимски комплекс  $\text{NADPH}$  оксидазе, који производи супероксид анјон, а водоник-пероксид настаје дисмутацијом супероксид анјона (Segal, 1988). Мијелопероксидаза катализује формирање  $\text{HOCl}$  кроз циклус који укључује оксидацију МПО помоћу  $\text{H}_2\text{O}_2$  у једињење I (активни облик ензима), након чега следи реакција једињења I са  $\text{Cl}^-$  (Hampton i sar, 1998). Иако је формирање  $\text{HOCl}$  важно за микробиоцидну активност неутрофила, МПО такође катализује и друге реакције. Тренутно је познато да МПО катализује оксидацију супстрата кроз циклус природног ензима-једињење I/једињење II (Hampton i sar, 1998) или хидроксилацију која укључује МПО једињење III (Kettle i Winterbourn, 1994). Може се рећи да МПО игра улогу у варењу протеина, липидној пероксидацији и имуномодулацији (Lefkowitz i sar, 1992).

Неутрофили оксидују мелатонин у N1-ацетил-N2-формил-5-метокси кинурамин, у реакцији коју катализује мијелопероксидаза. Производња AFМК-а је у великој мери зависила од супероксида, али не и од водоник-пероксида. Мијелопероксидаза има снажно антимикробно дејство због своје способности да генерише хипохлорну киселину. Доказано је да мијелопероксидаза производи хипохлорну киселину унутар фагозома где реагује и убија бактерије.

Мелатонин је снажан инхибитор МПО у условима сличним физиолошким. У присуству Cl<sup>-</sup> мелатонин инактивира МПО, у класичном циклусу пероксидазе кроз везивање за МПО да би се формирао неактивни комплекс - мелатонин-МПО-Cl и МПО једињења II - неактивни облик МПО. Инактивација МПО се огледа у директној конверзији МПО-Fe(III) у МПО једињење II, без икаквих знакова акумулације једињења I. Ово указује да везивање мелатонина модулира формирање МПО интермедијера и њихове стопе распада. Присуство Cl<sup>-</sup> повећава афинитет МПО према мелатонину, који мења активност ензима са пероксидације на активност сличну каталази.

### **5.3. Ефекти примене мелатонина на параметре оксидативног оштећења у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом**

Раније је у бројним *in vivo* истраживањима доказано да је мелатонин један од најмоћнијих антиоксиданаса, јер поседује велики антиоксидативни капацитет, који је већи скоро 2 пута од Л-аскорбинске киселине и токоферола, као и 3 пута од редукованог глутатиона, и има посебано протективни значај у стањима повишеног оксидативног стреса након ендотоксемије.

Tan i sar. (1993) су доказали да је мелатонин моћан "чистач" хидроксилних радикала, и указали да су метокси групе у положају 5 у индол језгру и ацетил група у бочном ланцу битни за смањење активности хидроксилних радикала. Мелатонин даје један електрон хидроксилном радикалу и прелази у индоксил катјон радикал, који даље неутралише супероксид анјон радикал и настаје N1-ацетил-N2-формил-5-метокси кинурамин. Метаболити мелатонина, као што су N1-ацетил-N2-формил-5-метокси кинурамин и N-ацетил-5-метокси кинурамин су такође моћни антиоксиданси (Tan i sar, 2001). Уклањајћи врло токсичан <sup>•</sup>ОН, мелатонин смањује интензитет липидне пероксидације (концентрацију TBARS-а) и спречава атак слободних кисеоничних радикала на цитозоларне протеине и ДНК молекуле (Reiter i sar, 1995).

Способност мелатонина да неутралише високо токсични  $\cdot\text{OH}$  била је скоро случајно откривена и пратила је хипотезу да су неки од ефеката мелатонина независни од рецептора. Константа брзине уклањања  $\cdot\text{OH}$  мелатонином је реда величине  $2,7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Okatani i sar, 1998). Поред тога, мелатонин може да делује синергистички и са другим антиоксидансима у детоксикацији  $\cdot\text{OH}$  и других реактивних интермедијера. Итеракцијом мелатонина са два  $\cdot\text{OH}$ , настаје нови метаболит, циклични 3-хидроксимелатонин (3-ОНМ) (Tan i sar, 1998). Важно је да се циклични 3-ОНМ излучује урином, при чему излучена количина варира у зависности од количине ендогено произведеног или егзогеног давања мелатонина, као и од оксидативног статуса организма (Tan i sar, 1998). Пошто количина цикличног 3-ОНМ у урину варира са тренутним интензитетом оксидативног стреса, овај метаболит може бити важан биомаркер *in vivo* стварања  $\cdot\text{OH}$  и може бити користан као клинички индекс оксидативног статуса појединца или присуства болести узроковане РВК. Мелатонин такође неутралише водоник-пероксид и друге оксиданте укључујући  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$  и производа интеракције  $\cdot\text{O}_2^-$  и  $\cdot\text{NO}$  ( $\text{ONOO}^-$ ) и/или његових метаболита. Овај последњи агенс испољава веома високу токсичност и такође се разграђује у производ који је по реактивности еквивалентан  $\cdot\text{OH}$  (Pryor i Squadrito, 1995). Све у свему, мелатонин је свакако способан да директно неутралише различите слободне радикале и/или њихове реактивне интермедијере и на тај начин смањи молекуларно уништење ћелија.

Доказано је да је мелатонин најмоћнији "scavengers" слободних радикала у неутралисању пероксил радикала. Он стимулише активност антиоксидативних ензима (SOD, GPx) и потпомаже разградњу  $\text{H}_2\text{O}_2$  у ткиву јетре. Доказано је да се у ткивима сисара, егзогено апликован или ендогено синтетисан мелатонин, значајно више налази у једру него у цитозолу ћелије (Menendez-Pelaez i Reiter, 1993). Доказано је да мелатонин, унутар једра ћелије, штити молекуле ДНК од деловања РВК (Lai i Singh, 1997). Bhatia i Manda (2004) су доказали да, мелатонин повећава активност антиоксидативног ензима - SOD, који врши дизмутацију  $\cdot\text{O}_2^-$  формирајући  $\text{H}_2\text{O}_2$ , који се разграђује активношћу CAT или GPx. Повећање активности SOD-а у серуму пацова током ендотоксемије, а третираних мелатонином, доводи до детоксикације супероксидног аниона који се ствара у већој количини. Овај ефекат је присутан у многим ткивима захваљујући особини егзогено апликованог мелатонина да пролази кроз ћелијске мембране (Oktem i sar, 2005).

Резултати представљени у оквиру ове докторске дисертације (Табеле 5 и 7) показују да је у јетри пацова са ендотоксемијом дошло до значајног снижења активности CAT, повишења активности XO, као и пораста концентрације TBARS-а и нитрата/нитрита (као меру NO).

Такође на табели 5 се запажа да је у јетри пацова са ендотоксемијом дошло до повишења нивоа карбонилних група, али ова промена није била статистички значајна.

Добро је познато да је поремећена активност антиоксидативних ензима, као и модулација нивоа "чистача" слободних радикала, уско повезана са многобројним патолошким стањима. Добијени резултати у нашој студији показују да је активност каталазе значајно снижена у ткиву јетре, што указује на смањену разградњу токсичног водоник-пероксида, који се нагомилава у ткиву јетре током ендотоксемије (Табела 5). Повећана концентрација  $H_2O_2$  може резултирати појачаном конверзијом у токсичне хидроксилне радикале, што на крају доводи до интензивирања оксидативног стреса (Kaushik i sar, 2003).

Ксантин оксидоредуктаза представља ензим који катализује конверзију хипоксантина и ксантина у мокраћну киселину, у каснијим фазама катаболизма пурина. Код сисара, ксантин оксидоредуктаза се јавља у два интерконвертибилна облика, ксантин дехидрогеназу и ксантин оксидазу. У физиолошким условима, егсистрира ксантин дехидрогеназа, која не поседује способност продукције слободних радикала. Међутим, резултати истраживања су показали да ХО (делује доминантно у екстрацелуларним просторима, укључујући серум) поседује способност катализовања редукције кисеоника у патолошким условима, што доводи до формирања супероксидног анјона и водоник-пероксида. Ова реакција се сматра да игра круцијални улогу у механизму оксидативног оштећења (Warner i sar, 2004). У многим експерименталним моделима ендотоксемије, ксантин оксидаза је уз остале ткивне оксидазе (на пример ПАО) примарни извор токсичних РВК (Phan i sar, 2004). У последњој деценији, велико интересовање је било усмерено на улози ХО у иницирању и модулацији имуног и метаболичког одговора код инфекције ендотоксином (Harrison, 2002). Ксантин оксидаза је укључена у производњи молекуларних реактанта повезаних са кисеоником ( $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ), који могу иницирати оксидативно оштећење ћелија јетре и других органа, и у стварању и метаболичкој судбини NO - важне компоненте и регулатора имуног одговора на инфекцију (Godber i sar, 2000).

Доказано је да ХО поседује способност катализовања редукције кисеоника у условима ендотоксемије, што доводи до формирања супероксидног анјона и токсичног водоник-пероксида. Ова реакција се сматра да игра круцијални улогу у механизму оксидативног оштећења ћелија јетре (Warner i sar, 2004). Апликовани мелатонин снижава активност ХО током ендотоксемије у нашем истраживању (Табела 5) и тако смањује стварање токсичних  $\cdot O_2^-$  и  $H_2O_2$  у ткиву јетре, које на тај начин штити од оксидативног оштећења.

Оштећење јетре је често изазвано ендотоксином грам-негативних бактерија. С обзиром на то да се грам-негативне бактерије најчешће налазе у дебелом цреву, организам је развио јаке одбрамбене механизме који чврсто регулишу улазак и обраду ЛПС-а (Su, 2002). Јетра игра централну улогу у овом процесу захваљујући својој двострукој способности не само да елиминише ЛПС, већ и да енергично реагује са ЛПС-ом (Hines i Wheeler, 2004). Токсичност ЛПС-а, како у јетри тако и у системској циркулацији, повезана је са ослобађањем проинфламаторних цитокина (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и РВК (Luster i sar, 1994). Повећање липидне пероксидације, изазване ЛПС-ом (представља индекс оксидативног стреса), описано је у неколико студија и зависи од времена и од дозе. Доказана је интензивнија липидна пероксидација код пацова, 45 минута након инфузије ЛПС-ом (100 mg/kg ТТ) у многим ткивима, укључујући јетру, танко црево, желудац и абдоминалну аорту. Доказано је да је ниво MDA у јетри повећан пет пута за 16 сати након примене ЛПС-а (у дози од 15 mg/kg ТТ), као и 3-4 пута, 8 сати након примене ЛПС-а у дози од 30 mg/kg ТТ (Sugino i sar, 1987). Резултати наших истраживања су у складу са предходно наведеним истраживања, где је доказан повећан интензитет липидне пероксидације (мерен TBARS-ом), током ендотоксемије у ткиву јетре (Табела 5). Ендогени антиоксидативни системи као што су GSH, SOD и CAT раде у синергији са "хватачима" слободних радикала како би заштитили хепатоците од штетних ефеката РВК. Наши резултати имплицирају да оштећење јетре изазвано ЛПС-ом изазива оксидативни стрес у ткиву јетре и производи редокс неравнотежу, што резултира смањем нивоа GSH и активности CAT, заједно са измењеним хепатоцелуларним редокс статусом. Ове промене изазивају иницирање и пропацију липидне пероксидације (повишењем нивоа TBARS-а), погоршавајући оксидативно оштећење и дисфункцију ткива јетре. Повишени нивои РВК изазвани липополисахаридом, индукују стварање цитотоксичног MDA који погоршава оштећење јетре (Halliwell, 1994).

У нашем истраживању, давање мелатонина животињама са ендотоксемијом доводи до снижења концентрације TBARS-а у ткиву јетре, у односу на ЛПС групу у којој је овај параметар оксидативног оштећења био значајно повишен (Табела 5). Sewerynek-a i sar. (1995) су показали да мелатонин смањује интензитет оксидативног стреса, у јетри пацова оштећеној давањем бактеријског липополисахарида, док су Bruck i sar. (2004) доказали да овај неуроухормон смањује ниво липидне пероксидације у ткиву јетре. Механизам овог протективног деловања не лежи само у редукацији интензивног оксидативног стреса, већ и у спречавању транслокације NF- $\kappa$ B у једро и његовог везивања за ДНК. На овај начин се смањује инфламаторни одговор хепатоцита и редукује експресија бројних проинфламаторних цитокина (посебно TNF- $\alpha$ ) и адхезионих молекула (ICAM-1) (Bruck i sar, 2004).



ЛПС је снажан стимулатор синтезе азот-моноксида (Hayashi i sar, 2005). Доказано је да ендотоксемија, током 6 сати, доводи до повећања (4,5 пута) нивоа нитрита у серуму, крајњег продукта метаболизма NO. Повећани нивои NO након ендотоксемије могу да реагују са  $\cdot\text{O}_2^-$  што доводи до формирања пероксинитрит анјона који оксидише сулфхидрилне групе и генерише хидроксилни радикал. Показано је да ЛПС изазива повећану експресију iNOS у Kupffer-овим ћелијама и хепатоцитима (Duval i sar, 1996; Roland i sar, 1996). Сходно томе, постоји потенцијал за стварање великих количина NO у јетри током сепсе, што може оштетити функцију јетре директним оштећењем хепатоцита (Billiar i sar, 1989). Доказано је да L-NIL (N6-(1-iminoethyl)-l-lysine), селективни инхибитор ензима iNOS, штити ЛПС-индуковану дисфункцију јетре (Zhang i sar, 2000). Ови резултати потврђују добијене резултате у току наше студије, јер је у ткиву јетре током ендотоксемије доказано повишење концентрације нитрата/нитрита (мера NO) (Табела 7). Велике количине азот-моноксида произведене ЛПС стимулацијом, могу имати веома важну улогу у оштећењу ткива изазваном ЛПС-ом. Доказано је да повећана производња NO, испољава једну од најважнијих улога у оштећењу јетре, у моделу експерименталног ендотоксичног шока (Morikawa i sar, 1999).

ЛПС активира серију MAP киназа и индукује синтези NO, кроз повећану експресију ензима iNOS-а у ћелијским линијама мишићних макрофага RAW 264.7. Доказно је да MAP киназе, Erk1/2, p38 и JAK/SAPK играју важну улогу у ЛПС-индукованој производњи NO у макрофагима (Morikawa i sar, 1999; Chakravortty i sar, 2001). NO и супероксид реагују спонтано и формирају моћан оксидант ONOO<sup>-</sup> који може да реагује са липидима, протеинима и ДНК молекулом, изазивајући њихово оштећење.

Резултати у овом истраживању су показали да је у ЛПС+Мел групи дошло до значајног снижења нивоа нитрата/нитрита у ткиву јетре, у односу на ЛПС групу (Табела 7). Многобројне студије су доказале да мелатонин смањује продукцију азот-моноксида. Студија Reiter-a i sar. (2001) је доказала да мелатонин инхибира активност ензима NOS и смањује оштећење ткива, изазвано пероксинитритом и његовим метаболитима. Доказано је да физиолошка концентрација мелатонина смањује активност iNOS и продукцију NO, а такође да је мелатонин "scavenger" NO при чему се ствара N-нитрозомелатонин (Turjanski i sar, 2001; Blanchard i sar, 2000).

Неколико студија је показало да апликовање ЛПС-а може изазвати исцрпљивање ендогених антиоксиданата у јетри као што је GSH, на начин који зависи од дозе ендотоксина (Jaeschke i sar, 1993).

У јетри су Kupffer-ове ћелије главне мете ЛПС-а, које производе прекомерну количину  $\cdot\text{O}_2^-$  (Bautista i sar, 1990). Поред тога, ЛПС индукује миграцију активираних полиморфонуклеара у јетру који представљају још један извор слободних радикала (Levi i Ruebner, 1967). Дакле, доказано је да ЛПС изазива интензиван оксидативни стрес у ткиву јетре. Антиоксидативни систем глутатиона хепатоцита штити од оксидативних повреда и обухвата ензимске (GPk и GST) и неензимске (GSH) системе (Chen i sar, 2021). Глутатион пероксидаза катализује реакцију у којој се GSH разлаже у  $\text{H}_2\text{O}_2$  или липидни пероксиди у  $\text{H}_2\text{O}$ , а у тој реакцији се GSH оксидише у GSSG. Глутатион редуктаза је NADPH зависна оксидоредуктаза која контролише ниво GSSG у митохондријима, претварањем GSSG у GSH. Глутатион С-трансфераза је важан детоксикациони ензим, који катализује коњугацију GSH и РВК, као и разних токсичних супстанци у мање токсичне и реактивније компоненте. GSH је неензимски антиоксиданс који игра доминантну улогу у заштити ћелија од оксидативног стреса, неутралисању слободних радикала и хидропероксида, као и детоксикацији многих ксенобиотика (Porovic i sar, 2019).

Добијени резултати у току наше студије показују да у ткиву јетре са ендотоксемијом (ЛПС група), долази до значајног снижења концентрације GSH и активности GST, као и повишења активности GR (Табела 6). Докази сугеришу да је смањење GSH резултат оксидације mtDNK изазване ЛПС-ом и дисфункције митохондријалне мембране (Suliman i sar, 2003). Овај ендогени антиоксидант се нормално транспортује из цитозола у митохондријални матрикс, помоћу носача који се налазе у унутрашњој мембрани митохондрија (Ribas i sar, 2014). Дакле, дисфункција мембране утиче на GSH транспортни систем (Ribas i sar, 2014). Такође, смањење GSH током оксидативног стреса је резултат његове појачане интеракције са слободним радикалима, а затим и формирања коњугата глутатиона, који се могу елиминисати.

Из табеле 6 се примећује да апликовање мелатонина пацовима са ендотоксемијом доводи до нормализовања концентрације редукованог глутатина (повишењем његовог нивоа), и активности глутатион С-трансферазе (повишењем активности) и глутатион редуктазе (снижење активности), у односу на ЛПС групу у којој је њихова концентрација/активност била значајно промењена. Доказано је да мелатонин смањује ниво митохондријалног хидропероксида и стимулише активност два ензима укључена у GSH/GSSG равнотежи: GPk и GR. Swiderska-Kolacz i sar. (2006) су доказали да мелатонин изазва повећање нивоа GSH, регулацијом активности ензима GPk и GST у јетри мишева. Доказано је да мелатонин доводи до NADPH-зависног смањења нивоа GSSG, као и до повећања концентрације GSH (Baeza i sar, 2010).

У многим студијама је доказано да мелатонин регулише активност антиоксидативних ензима, и тиме штити ткиво јетре од интензивног оксидативног стреса. Доказано је да мелатонин повећава активност GPK и истовремено смањује токсично деловање водоник-пероксида и PPK у мозгу и јетри пацова третираних липополисахаридом (Sewerynek i sar, 1995). Давање мелатонина (4 mg/kg TT) пацовима третираним ЛПС-ом довео је до повећања укупног глутатиона, док је ниво GSSG био снижен.

Мелатонин има важне улоге у митохондријалној хомеостази ћелија. Прво, митохондрије производе велике количине PPK и PBA, друго оне преузимају GSH из цитоплазме ћелије, иако имају GPK и GR за одржавање редокс циклуса GSH. Дакле, антиоксидативни ефекат мелатонина и његова способност повећања нивоа GSH може бити од великог значаја за физиологију митохондрије и саме ћелије (Urata i sar, 1999). Такође мелатонин повећава производњу GSH стимулишући ензим  $\gamma$ -глутамилцистеин синтетазу, која учествује у његовој синтези.

#### **5.4. Модулаторно дејство мелатонина на параметре апоптозе у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом**

Апоптоза је процес који игра важну улогу у патофизиологији сепсе. Доказано је да давање ЛПС-а изазива апоптозу хепатоцита, смањењем експресије Bcl-2 протеина (Haendeler i sar, 1996). Ранија истраживања су показала да интравенска апликација велике концентрације ЛПС-а, изазива апоптозу ћелија јетре у експерименталним моделима изазивања септичког шока (Leist i sar, 1995; Bohlinger i sar, 1996). Доказано је да је систем Fas-Fas лиганда укључен у оштећење хепатоцита изазваног липополисахаридом, а TNF- $\alpha$  који се ствара у Kupffer-овим ћелијама помоћу ЛПС-а подстиче апоптозу хепатоцита и индукује оштећење јетре (Whiting i sar, 1995). Фактор некрозе тумора- $\alpha$  повећава пермеабилност митохондријалне мембране, изазива ослобађање цитохрома c, активира каспазу 3 и на крају изазива апоптозу ћелија јетре.

Доказано је да TNF рецептори играју кључну улогу у ћелијској смрти и пролиферацији, како у физиолошким тако и у патолошким стањима. TNF- $\alpha$  има два различита рецептора везана за мембрану (TNFR1 и TNFR2), а TNFR1 углавном функционише као фактор смрти (Vandenabeele i sar, 1995). TNFR1 учествује у главном апоптотичком сигналном путу, док је дефинисано неколико протеина који садрже домен смрти нисходно од TNFR1 и FAS. Између ових протеина који садрже домен смрти и фрагментације ДНК молекула или апоптозе, постоји активација неколико каспаза, укључујући каспазу-3.

Истраживања су показала да ендотоксин активира каспазу-1, каспазу-3, каспазу-6 и каспазу-8. Активација каспазе-8 иницира протеолитичку каскаду која доводи до активације нисходних ефекторских каспаза и све то изазива апоптозу. Кључна мета каспазе-8 је прокапаза-3, тако да је створена активна каспаза-3 одговорна за већи део протеолизе повезане са апоптозом (Hirata *et al.*, 1998). Ефекти активације каспазе изазване ЛПС-ом, доводе до цепања структурних и једарних нуклеарних протеина. У *in vivo* истраживању Alikhani *et al.* (2004) доказано је да ЛПС значајно повећава активност каспазе-8 и каспазе-3 која је зависна од TNF рецепторске сигнализације. У нашем истраживању, ендотоксемија изазвана липополисахаридом је довела до значајног повишења активности ензима каспазе-3, што је у складу са горе наведеним студијама и истраживањима (Графикон 7).

Програмирана ћелијска смрт у јетри је процес који је посредован различитим интраћелијским ензимима, међу којима важно место заузимају ендонуклеазе, ензими који катализују интернуклеозомалну фрагментацију ДНК молекула (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie, 1980). Фрагментација ДНК молекула током апоптозе је вишестепени процес. Оваква фрагментација је есенцијална за наставак апоптозе (Mogil *et al.*, 1994). У каснијем стадијуму, апоптоза је удружена са интернуклеозомалном разградњом ДНК молекула, која се карактерише стварањем стандардних фрагмената - "laddera". Активност ДН-аза у ткиву јетре представља маркер процеса апоптозе, будући да су ови ензими одговорни за хидролитичку интернуклеозомалну фрагментацију ДНК молекула. Активност алкалне и киселе ДН-азе, терминалних егзекутора процеса апоптозе, сагледавана је у јетрином ткиву експерименталних животиња, током ендотоксемије. Резултати нашег истраживања показују да током ендотоксемије у ткиву јетре долази до значајног повишења активности ових ензима (Графикон 5 и 6).

Нивои активности ДН-аза у ткиву јетре представљају биомаркере програмиране ћелијске смрти. Активност ДН-азе I или алкалне ДН-азе, која припада групи  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  зависних ДН-аза, је статистички значајно повишена у ткиву јетре у току ендотоксемије. Да је активност алкалне ДН-азе повезана са апоптотичком фрагментацијом ДНК говоре истраживања Giannakisa *et al.* (1991), која су показала да након индукције апоптозе колхицином у леукемијским ћелијама долази до шестоструког пораста активности  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  зависне ендонуклеазе и да је овај пораст активности у вези са доказаном ДНК фрагментацијом. Такође доказана је веза између апоптозе индуковане Fas лигандом и последичне активације алкалне ДН-азе (Enari *et al.*, 1998). Према томе, алкална ДН-аза је главна за једрану ДНК фрагментацију у ткивима која се припремају за апоптозу (Liu *et al.*, 1998).

Бројне студије су потврдиле улогу и киселе ДН-азе у процесу апоптозе (Сао i sar, 2001; Tsukada i sar, 2001). Иначе кисела ДН-аза хидролизује нативне и денатуриране ДНК молекуле, разарајући везу између угљеника у положају 5'-пентозе и фосфора образујући при томе 3'-нуклеотиде. Потврђено је њено присуство у једру, цитозолу и лизозомима. Овај ензим раскида мањи број међунуклеотидних веза него алкална ДН-аза (Bernardi, 1996).

У нашем истраживању хистопатолошком анализом ткива јетре, уочава се да код експерименталних животиња изложених ЛПС-у постоје ћелије са хипереозинофилном цитоплазмом или са везикулама, као и са малим и фрагментованим једрима. На основу микроскопске анализе доказано је одсуство ћелија у оквиру Ремаркових гредица, као и ћелије са фрагментованим и пикнотичким једрима које су подлегле процесу апоптозе (Табела 8 и Слика 26).

У нашем истраживању, орално апликовање мелатонина животињама са ендотоксемијом доводи до благог снижења активности ензима каспазе-3 (ова вредност није била статистички значајна), у односу на ЛПС групу у којој је активност овог ензима повишена (Графикон 7). Међутим на графиконима 5 и 6 се примећује да апликовање мелатонина пацовима са ендотоксемијом доводи до статистички значајног снижавања (скоро нормализовања) активности ендонуклеаза (алкалне и киселе ДН-азе), у односу на ЛПС групу. Добијени резултати могу се протумачити тако да мелатонин испољава антиапоптотичко дејство, спречавањем ДНК фрагментације. У последње време бројне експерименталне студије указују на протективну улогу мелатонина на процес апоптозе. Доказано је да мелатонин инхибира процес апоптозе у имуним ћелијама, јетри, мозданом ткиву и туморским ћелијама (Sainz i sar, 2003). Студија Molpeceres i sar. (2001) је доказала да мелатонин смањује иницијацију апоптозе у јетри пацова у експерименталном моделу старења, спречавајући излазак цитохрома ц и Вах протеина из митохондрија у цитоплазму хепатоцита остарелих пацова.

Спречавајући стварање РВК у митохондријама, мелатонин лимитира продукцију  $H_2O_2$ , улазак  $Ca^{2+}$  у митохондрије, деполаризацију митохондријалне мембране и отварање МПТ (енгл. mitochondrial permeability transition). Као резултат овог деловања мелатонин је блокирао МПТ зависно ослобађање цитохрома ц, успорио активацију каспазе-3, смањио кондензацију и кариорексу једра и инхибирао апоптотичку фрагментацију једарне ДНК (Germaine i sar, 2006).

## 5.5. Анализа ефеката ендотоксемије на садржај нуклеарног фактора еритроид 2 у ткиву јетре

Међу антиоксидативним параметрима, нуклеарни фактор еритроид 2 је кључни фактор транскрипције који је неопходан за ублажавање различитих болести повезаних са интензивним оксидативним стресом и инфламацијом. У нормалним условима (условима без стреса) Nrf-2 се повезује са цитоплазматским репресором и његовим главни антагонистом - Keap1 протеином и пролази кроз деградацију зависну од протеазома. Ковалентна или оксидативна модификација цистеин сулфхидрил група протеина Keap1, под дејством реактивних врста кисеоника, доводи до конформационих промена Keap1, што резултира транслокацијом Nrf-2 у једро. Улазак Nrf-2 у јетро је појачано фосфорилацијом Nrf-2 протеин киназама.

Оксидативни стрес модификује Keap1 протеин и стабилизује Nrf-2, блокирајући његову деградацију. Изнова синтетисани Nrf-2 протеин, који није одређен за деградацију, транспортује се у једро где се везује за специфичну секвенцу ДНК молекула, која се назива - елемент антиоксидативног одговора (ARE), који је присутан у промоторском региону (Kobayashi i sar, 2006).

Поред тога, фосфорилација Nrf-2 регулише његову субћелијску локализацију и активност. Фосфорилација серина 40 преко протеин киназе Ц појачава његову активност, док фосфорилација тирозина 568 у једру преко гликоген синтазе киназе-3б доводи до његовог излаза из једра (Kaspar i sar, 2009). Доказано је да након интензивног оксидативног стреса, током ендотоксемије, Nrf-2 се одваја од Keap1, транслоцира у једро и покреће (регулише) експресију гена за различите антиоксидативне и детоксикационе ензиме, и то хем оксигеназу-1 (ХО-1), SOD, субјединице глутамат-цистеин лигазе и индукују рецептор за елиминацију CD36 (Kensler i sar, 2007; Ishii i sar, 2004).

Индукција и повећање нивоа Nrf-2 у ћелијама, не само да превенира оксидативно оштећење, већ има и заштитни ефекат против инфламације у патогенези оштећења јетре липополисахаридом. Резултати овог истраживања показују да ендотоксемија код експерименталних животиња, доводи до значајног повишења садржаја Nrf-2 у ткиву јетре (Графикон 8). Током ендотоксемије деградација Nrf-2 је инхибирана, под дејством интензивног оксидативног стреса и РВК. Орално давање мелатонина пацовима са ендотоксемијом, у нашем истраживању, није довело до значајне промене нивоа Nrf-2 у односу на ЛПС групу (Графикон 8). *In vivo* студије су показале да смањење нивоа Keap1, може побољшати исход лечења мишева са сепсом, кроз стимулацију транскрипционе активности и антиоксидативног капацитета Nrf-2 (Kong i sar, 2011).

Код оштећења јетре, водоник-сулфид ублажава оштећење јетре путем сигнализације S-сулфхидратисаног-Keap1/Nrf-2, док недостатак Nrf-2 може смањити заштитне ефекте, што указује на незаменљиву улогу Nrf-2 сигнализације за одржавање хомеостазе и спречавање оштећења јетре.

## **5.6. Анализа ефеката примене мелатонина на метаболизма L-аргинина и полиамина у ткиву јетре током ендотоксемије изазване липополисахаридом**

Будући да L-аргинин може бити супстрат ензима аргиназе и iNOS, може се предпоставити да би активност једног од ових ензима могла имати регулаторне ефекте на други ензим. Wu и Moris (1998) су доказали да аргиназа може смањити доступност аргинина за синтезу NO и цитрулина, све у зависности од локалне концентрације аргинина. Ову хипотезу потврдили су Gotoh и Mori (1999), указујући да је аргиназа укључена у нисходну регулацију продукције NO, преко смањења доступности аргинина и смањења активности iNOS-а.

Доказано је да аргиназу инхибира  $N^G$ -хидрокси-L-аргинин, интермедијарни продукт реакције катализоване са iNOS, који се у значајној мери ослобађа из активног центра азот-моноксид-синтазе. У неким случајевима су аргиназа и NOS коиндуковани, док они у другим стањима подлежу супротној регулацији.

Добијени резултати у току наше студије показују да у ткиву јетре са ендотоксемијом, долази до повишења концентрације  $NO_2^-/NO_3^-$  и активности ензима iNOS, као и снижења активности аргиназе (Табела 7). Ендотоксемија је у ткиву јетре експерименталних животиња довела до значајне промене у метаболизму аргинина, тиме што је редуковала катаболички пут аргинина према орнитину и полиаминима (снижавањем активности аргиназе), а потенцирала је превођење ове аминокиселине у NO, повећавајући активност ензима iNOS. Доказано је да у реакцији са молекулским кисеоником NO се конвертује у азот-диоксид ( $NO_2$ ). Ипак, NO чешће реагује са супероксид анион радикалом, који се ствара у интрацелуларном и екстрацелуларном простору, стварајући снажни оксидант пероксинитрит (Almeida и Bolanos, 2001). Брзина ове реакције је три пута већа од оне којом SOD катализује дизмутацију  $\cdot O_2^-$  у  $H_2O_2$  и лимитирана је само коефицијентом дифузије NO. Створени пероксинитрит реагује са бројним биомолекулима, делујући као селективни оксидант и нитрозилишући агенс. Функција SOD је да лимитира реакцију NO са  $\cdot O_2^-$ .

У условима смањене концентрације аргинина и пораста активности iNOS интензивирано је стварање  $\cdot\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , чиме се отвара могућност да пораст оксидативног стреса није само поседица директног деловања липополисахарида на антиоксидативну заштиту већ и последица промена у метаболизму аргинина (Xia i sar, 1998). Доказано је да је ендотоксемија повезана са повећањем активности индуцибилне ендотелне азот-моноксид-синтазе. Истраживања на крвним судовима су показала да током ендотоксемије прекомерна експресија iNOS доприноси развоју ендотелне дисфункције, преко смањене активности ендотелне изоформе NOS (Gunneth i sar, 2005). Повећана експресија iNOS, може довести до микроваскуларне дисфункције јетре, током ендотоксемије. Микроваскуларна дисфункција јетре има снажан утицај на виталност паренхимских и непаренхимских ћелија јетре.

Насупрот базалној производњи NO у физиолошким условима путем eNOS (локализованог у синусоидалним ендотелијалним ћелијама циркулације јетре), у неким патолошким стањима јетре долази до повећаног стварања NO путем iNOS. Индуцибилна азот-моноксид-синтаза се синтетише у макрофагима, васкуларним глатко-мишићним ћелијама, хепатичким стелатним ћелијама и хепатоцитима након индукције од стране ЛПС-а и проинфламаторних цитокина (најчешће TNF- $\alpha$ ). Активирана iNOS синтетише велику количину NO током дугог временског периода независно од хемодинамичких или механичких стимулуса. Производња NO је одређена не само количином iNOS већ и каталитичком активношћу овог ензима која је регулисана кроз динамичке интеракције са инхибиторним протеином кавеолином-1 и стимулаторним протеином калмодулином зависним од  $\text{Ca}^{2+}$  (Fiorucci i sar, 2003). Утврђено је да азот-моноксид, као ћелијски сигнални агенс и биолошки реактивни слободни радикал, или подстиче или спречава апоптозу хепатоцита. Стварање NO путем индукције iNOS (најчешће цитокинима), може изазвати ослобађање цитохрома c из митохондрија и поспешити апоптозу хепатоцита. Створени NO може да делује и као антиапоптотички фактор или фактор ћелијског преживљавања нарочито током апоптозе хепатоцита зависне од TNF- $\alpha$  или Fas рецептора смрти. Механизми антиапоптотичког деловања NO укључује повећану производњу cGMP, инхибицију активности каспазе (нитрозилацијом сулфхидрилних група), инхибицију премештања проапоптотичких Bid протеина у митохондрије и инхибицију МПТ (Gumprich i sar, 2002).

У овом истраживању, давање мелатонина животињама које су излагане липополисахариду, изазвало је изразито повишење активности аргиназе, као и снижење концентрације  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  и активности iNOS, у односу на ЛПС групу у којој је њихова концентрација и активност била значајно промењена (Табела 7).



Ови резултати указује да апликовање мелатонина усмерава катаболизам аргинина ка биосинтези полиамина, али не и према стварању NO. Ово се може тумачити као хепатопротективни ефекат мелатонина којим се онемогућава смањење нивоа полиамина и нагомилавање NO (који може испољавати токсичне ефекте, најчешће преко пероксинитрита) у ткиву јетре.

Доказано је да је метаболит мелатонина, N-ацетил-5-метокси кинурамин, потентан инхибитор прооксидативног ензима азот-моноксид-синтазе (Reiter i sar, 2002; Silva i sar, 2004). Одвијање нормалних физиолошких функција јетре је повезано са одржавањем ниских нивоа NO (Rodriguez-Reynoso i sar, 2001). Пораст концентрације NO има штетан ефекат јер он реагује са супероксидним анион радикалом и ствара ONOO<sup>-</sup>, који је један од најпотентнијих мембранских оксиданса (Busse i sar, 1995). NO такође инхибира и ензимске системе који учествују у ћелијском дисању у митохондријама. Доказано је да бројни хепатоксични агенси доводе до пораста концентрације NO, при чему је главни механизам пораст активности iNOS (Hayashi i sar, 2001).

Основни хепатопротективни ефекат мелатонина огледа се у његовој способности да спречи активацију промотора и иРНК транскрипцију гена одговорног за продукцију iNOS (Rodriguez-Reynoso i sar, 2001). Ово је у складу са налазима добијеним у ткиву јетре животиња излаганих ЛПС-у, а којима апликовање поменутог неурохормона доводи до значајне редукције нивоа NO (Табела 7). Студија Bauera i sar. (2001) је експериментално демонстрирала да азот-моноксид може да инхибира ензим ODC, директно S-нитрозилацијом SH групе цистеина овог регулаторног ензима у метаболизму полиамина. На основу тога може се закључити да снижавање продукције NO у ћелијама јетре применом мелатонина, током ендотоксемије (Табела 7), може спречити инхибицију синтезе полиамина - који су веома важни у организму јер испољавају антиоксидативни и антиапоптоички потенцијал (Tadolini, 1988).

Ниво полиамина у јетри регулисан је комплексним циклусом њихове биосинтезе и разградње (Vjelaković i sar, 2003). Доказано је да ткиво јетре младих пацова узраста од три месеца садржи највећу количину полиамина од свих ткива (спермидин/спермин >1). У току раста и старења, садржај спермидина у јетри пацова прогресивно опада, док садржај спермина показује блажи пад, тако да је код адултних животиња однос спермидин/спермин  $\leq 1$  (Janne i sar, 1964). Такође је доказано да је у јетри млађих пацова активност ензима ODC-а знатно већа него у јетри адултних животиња, а све ово сугерише да у јетри младих пацова биосинтеза полиамина има примат над активношћу ацетилаза/оксидазног пута у одржавању хомеостазе у метаболизму полиамина (Eguchi i sar, 1992).

Метаболизам полиамина у јетри је значајан не само за хепатичну синтезу ДНК, РНК, протеина, процес пролиферације и регенерације хепатоцита, већ и за синтетске функције јетре, као што је синтеза албумина крвне плазме. Студија Schubera (1989) је указала да полиамини из јетре због свог позитивног наелектрисања показују високи афинитет за анионе фосфолипида и протеина ћелијских мембрана, и остварују ефекат у њиховој стабилизацији. Сваки пад нивоа полиамина у ћелијама јетре, било које етиологије, доводи до смањене стабилизације мембране хепатоцита. Бројне студије говоре о антиоксидативној активности полиамина, који реагују са реактивним врстама кисеоника насталим у току различитих ћелијских збивања (Pavlović, 1991; Tadolini, 1988). На *i sar.* (1998) су доказали да спермин делује као јак антиоксиданс, те његово смањење у јетри током различитих патолошких стања доводи до снижења антиоксидативне моћи хепатоцита.

У доступној литератури не постоје тако бројни подаци о катаболизму полиамина у ткиву јетре током ендотоксемије. Резултати представљени у оквиру ове докторске дисертације (Графикон 9) показују да је у јетри пацова са ендотоксемијом дошло до значајног повишења активности ензима ПАО, док је активност ензима ДАО, која катаболише путресцин, остала непромењена. Значајан пораст активности ПАО, могао би се објаснити интензивирањем процеса интерконверзије спермина и спермидина у путресцин. Разградњом спермина и спермидина настају 3-аминопропионалдехид (из кога се може створити MDA) и водоник-пероксид (Quash i Taylor, 1970). Водоник-пероксид и аминоксиди настали током катаболизма спермина и спермидина активношћу ПАО, имају цитотоксична својства и могу учествовати у покретању апоптозе (Pachment i Pierce, 1989). Удружено деловање SSAT и ПАО у ацетилацији и оксидацији полиамина доводи до продукције  $H_2O_2$  који делује као индуктор ензима SSAT и процеса апоптозе. Такође настали  $H_2O_2$  у процесу катаболизма полиамина због способности интеракције са  $\cdot O_2^-$ , или даље разградње у присуству слободног гвожђа може довести до продукције  $\cdot OH$  радикала (иницијатора липидне пероксидације) и даљег увећања овог процеса. Резултати студије Tadolini-a (1988) указују на могућност учешћа полиамина као модулятора оштећења ћелија слободним кисеоничним радикалима, при чему се антиоксидативно дејство полиамина приписује стварању комплекса између  $Fe^{2+}$ /спермина/фосфолипида, чиме се лимитира могућност настанка Фентон-ове реакције и стварање  $\cdot OH$ .

У ткиву јетре пацова током ендотоксемије, утврђено је снижење активности ензима ДАО који катаболише путресцин, али ово снижење није статистички значајно (Графикон 9 Б).

Ово снижење активности ДАО у јетри пацова, иако није статистички значајно, може да укаже на тенденцију смањења катаболизма путресцина у условима оштећења хепатоцита током ендотоксемије изазване ЛПС-ом. Овај резултат се може објаснити тежњом хепатоцита за очувањем концентрације путресцина, за које је доказано да има значајно хепатопротективно дејство у стањима оштећења. Студија Tzirogiannis-a i sar. (2004) потврђује протективно дејство путресцина на оштећено ткиво јетре и он учествује у регенеративним, репаративним и пролиферативним процесима, као и у стабилизацији ћелијске мембране хепатоцита (Gaboriau i sar, 2005).

Доказано је да полиамини и ензим SSAT учествују у процесима имунолошког одговора. Недавно је доказано да TNF- $\alpha$  индукује експресију ензима SSAT преко NF- $\kappa$ B, уобичајеног посредника различитих ћелијских процеса укључујући имуни одговор (Babbar i sar, 2006). Повећана експресија ензима SSAT-а изазвана NF- $\kappa$ B, доводи до појачаног катаболизма полиамина са различитим последицама, као што су смањена стопа раста ћелија и повећана апоптоза, што може бити корисно током инфламаторног стреса (Babbar i sar, 2007). Поред тога, неке различите функције SSAT-а, као што су учешће у миграцији ћелија и регулацији експресије гена изазваног хипоксијом, такође утичу на компоненте укључене у имуни одговор (De Hart i sar, 2008; Baek i sar, 2007).

Доказано је да је полиамин - спермин укључен као инхибитор инфламаторних одговора, јер инхибира синтезу проинфламаторних цитокина (Zhang i sar, 1997). Код мишева, примена спермина делимично штити од сепсе изазване пункцијом цекума (Zhu i sar, 2009). Доказано је да током ендотоксемије изазване ЛПС-ом, у ткиву бубрега и јетре се јавља повећана акумулација путресцина. Ови резултати су плод повећане биосинтезе полиамина, пошто је апликовање ЛПС-а повећао експресију ензима ODC-а (Soulet i Rivest; 2003).

У нашем истраживању, апликовање мелатонина животињама са ендотоксемијом доводи до снижења активности ензима ПАО, у односу на ЛПС групу у којој је активност овог ензима повишена (Графикон 9 А). Ово снижење активности ензима веома важног у катаболизму спермина и спермидина, се може објаснити тежњом ћелија јетре за очувањем њихових концентрација у ткиву јетре, за које је доказано да имају значајна хепатопротективна дејства. Већ смо напоменули да полиамини учествују у процесима раста, деобе и диференцијације ћелија, а тиме и у регенеративним, репаративним и пролиферативним процесима, затим у стабилизацији ћелијске мембране, испољавању антиоксидативне и антиапоптотичке активности (Tadolini, 1988; Hu i Pegg, 1997). Смањење активности ПАО има за циљ пораст пулова полиамина и очување регенеративне и пролиферативне способности хепатоцита, што је показано у овом истраживању.

## 6. Закључак

Анализом добијених експерименталних резултата могу се извести следећи закључци:

1. У току експерименталне ендотоксемије изазване липополисахаридом дошло је до повећања броја неутрофила, смањења броја лимфоцита (због њихове масовне апоптозе), повећања неутрофилно-лимфоцитног индекса и тромбоцитопеније (због повећане потрошње тромбоцита), што све указује на стање сепсе. Давање мелатонина током ендотоксемије, нормализује број лимфоцита, као и однос неутрофила и лимфоцита.
2. Ендотоксемија у ткиву јетре довела је до повишења нивоа NF- $\kappa$ B и проинфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$  и IL-6), интензивнијег оксидативног оштећења (повећањем липидне пероксидације, снижењем нивоа GSH и активности ензима антиоксидативне заштите), повишења садржаја Nrf-2 протеина, као и интензивније апоптозе хепатоцита (повишењем активности алкалне/киселе ДН-азе и каспазе-3).
3. Током ендотоксемије изазване липополисахаридом у јетри је дошло до повећања нивоа азот-моноксида (повећањем активности iNOS и смањењем активности аргиназе) и интензивирања катаболизма полиамина (повећањем активности ПАО).
4. Неурохормон мелатонин је у ткиву јетре испољио значајне имономодулаторне ефекате, снижавањем активности ензима мијелопероксидазе (инхибицијом инфилтрације неутрофила), нивоа проинфламаторних цитокина и NO, чиме је значајно превенирао експериментално изазвано стање сепсе.
5. Мелатонин је у јетри пацова са ендотоксемијом, смањио интензитет оксидативног оштећења (снижавањем активности ксантин оксидазе и глутатион редуктазе, и нивоа TBARS-а, као и повишењем концентрације редукованог глутатиона) и показао значајан антиапоптотички ефекат (нормализовањем активности ендонуклеаза).
6. У ткиву јетре током ендотоксемије апликовање мелатонина је преусмерио метаболизам L-аргинина ка биосинтези полиамина (повишењем активности аргиназе) и смањењем њиховог катаболизма (снижавањем активности ПАО).

## 7. Литература

- Abe K, Abe Y, Saito M. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res* 2000;872:141-8.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002;9(2):423-32.
- Ahmadi Z, Ashrafzadeh M. Melatonin as a potential modulator of Nrf2. *Fundam Clin Pharmacol* 2020;34:11-19.
- Akarsu ES, Mamuk S. Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:1846-50.
- Akashi S, Ogata H, Kirikae F, Kirikae T, Kawasaki K, Nishijima M, Shimazu R, Nagai Y, Fukudome K, Kimoto M, Miyake K. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via Toll-like receptor 4- MD-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:172-7.
- Akca S, Haji Michael P, de Medonca A, Suter PM, Levi M, Vincent JL. The time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002;30:753-6.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
- Al-Dossari MH, Fadda LM, Attia HA, Hasan IH, Mahmoud AM. Curcumin and selenium prevent lipopolysaccharide/diclofenac-induced liver injury by suppressing inflammation and oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 2020;196:173-83.
- Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT. Apoptotic effects of LPS on fibroblasts are indirectly mediated through TNFR1. *J Dent Res* 2004;83:671-6.
- Almeida A, Bolaños JP. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2001;77(2):676-90.
- Andreeva I, Kožemjakin A, Kiškun A. [Modification of the method of measurement of lipid peroxides in test with thiobarbituric acid]. *Lab Delo* 1988;11:41-3.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-10.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013;369:840-51.
- Aratami Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 2018;640:47-52.
- Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet* 1998;351:1501-5.
- Babbar N, Hacker A, Huang Y, Casero RA Jr. Tumor necrosis factor alpha induces spermidine/spermine N1-acetyltransferase through nuclear factor kappaB in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281:24182-92.
- Babbar N, Murray-Stewart T, Casero RA Jr. Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly. *Biochem Soc Trans* 2007;35:300-4.

- Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Zhang H, Semenza GL. Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1alpha. *J Biol Chem* 2007;282:33358-66.
- Baeza I, Fernandez-Tresguerres J, Ariznavarreta C, De la Fuente M. Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 2010;11:687-701.
- Banerjee S, Bhaduri J. Serum protein-bound carbohydrates and lipids in cholera. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;101:340-1.
- Barnato AE, Alexander SL, Linde-Zwirble WT, Angus DC. Racial variation in the incidence, care, and outcomes of severe sepsis: Analysis of population, patient, and hospital characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(3):279-84.
- Bartholeyns J, Peeters-Joris C, Reychler H, Baudhuin P. Hepatic Nucleases. Methods for the specific determination and characterization in rat liver. *Eur J Biochem* 1975;57:205-11.
- Bauer M, Gerlach H, Vogelmann T, Preissing F, Stiefel J, Adam D. Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2020;24(1):239.
- Bauer PM, Buga GM, Fukuto JM, Pegg AE, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibites ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* 2001;276(37):34458-64.
- Bautista AP, Meszaros K, Bojta J, Spitzer JJ. Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. *J Leukocyte Biol* 1990;48:123-8.
- Beckaman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, the ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-37.
- Beers RF, Seizer JW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195:133-40.
- Beesley SJ, Weber G, Sarge T, Nikravan S, Grissom CK, Lanspa MJ, Shahul S, Brown M. Septic Cardiomyopathy. *Crit Care Med* 2018;46(4):625-34.
- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, Bagshaw SM, Glassford NJ, Lankadeva Y, Vaara ST, Schneider A. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med* 2017;43(6):816-28.
- Benarroch EE. Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations. *Neurology* 2008;71(8):594-8.
- Ben-Nathan D, Maestroni GJM, Lustig S, Conti A. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. *Arch Virol* 1996;140:223-30.
- Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, Muehleisen B, Muto J, Borkowski AW, Martinez L, Greidinger EL, Yu BD, Gallo RL. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* 2012;18(8):1286-90.
- Bernardi G, Griffe M. Studies on acid deoxyribonuclease II. Isolation and characterization of spleen-acid deoxyribonuclease. *Biochemistry* 1964;3:1419-26.
- Bernardi P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:5-9.
- Beutler B, Du Hobe KX, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003;74:479-85.

- Bharadwaj N, Singh HB, Anjum S, Tadury A. Does the platelet to neutrophil ratio and platelet to lymphocyte ratio predict newborn sepsis? a case control study. *Paripex Indian J Res* 2018;7:192-3.
- Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is FcγRII. *J Exp Med* 1999;190:585.
- Bhatia AL, Manda K. Study on pre-treatment of melatonin against radiation-induced oxidative stress in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2004;18:13-20.
- Biehl M, Takahashi PY, Cha SS, Chaudhry R, Gajic O, Thorsteinsdottir B. Prediction of critical illness in elderly outpatients using elder risk assessment: A population-based study. *Clin Interv Aging* 2016;11:829-34.
- Billiar TR, Curran RD, West MA, Hofmann K, Simmons RL. Kupffer cell cytotoxicity to hepatocytes in coculture requires l-arginine. *Arch Surg* 1989;124:1416-20.
- Bjelaković G, Beninati S, Pavlović D, Sokolović D, Stojanović I, Jevtović T, Bjelaković GB, Nikolić J, Basić J. Selenomethionine induces polyamine biosynthesis in regenerating rat liver tissue. *Amino Acids* 2007;33(3):525-9.
- Bjelakovic G, Kocic G, Pavlovic D, Nikolic J, Stojanovic I, Bjelakovic GB, Jevtovic T, Sokolovic D. Effects of folic acid on polyamine concentrations and polyamine oxidase activity in regenerating rat liver. *Pteridines* 2003;14:109-13.
- Bjelaković G, Pavlović D, Jovanović G. The effect of glucocorticoids on the activity of diamine oxidase and polyamine oxidase in the guinea pig liver during sensitization. *Yugoslav Physiol Pharmacol Acta* 1987;23:39-46.
- Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res* 2000;29(3):184-92.
- Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 2004;304:1014-8.
- Blasius AL, Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 2010;32(3):305-15.
- Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermuller S, Tiegs G, Wendel A. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol* 1996;149:1381-93.
- Bolkenius NF, Seiler N. Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism *Int J Biochem* 1981;13:287-92.
- Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-69.
- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA* 2011;306(23):2594-605.
- Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* 2013;34(3):129-36.
- Botos I, Segal DM, Davies DR. The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure* 2011;19(4):447-59.
- Boyde TRC, Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem* 1980;107:424-31.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206-9.
- Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *Journal of Hepatology* 2004;40:86-93.

- Brustovetsky N, Brustovetsky T, Dubinsky JM. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem* 2001;76:425-34.
- Burgdorff AM, Bucher M, Schumann J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. *J Int Med Res* 2018;46(4):1303-10.
- Burkovskiy I, Sardinha J, Zhou J, Lehmann C. Cytokine release in sepsis. *Adv Biosci Biotechnol* 2013;4(9):860-5.
- Busse R, Fleming I, Schini VB. Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;196:7-18.
- Camacho ME, Carrion MD, Lopez-Cara LC, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Escames G, Acuna-Castroviejo D. Melatonin synthetic analogs as nitric oxide synthase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:600-17.
- Cao G, Pei W, Lan J, Stetler RA, Luo Y, Nagayama T, Graham SH, Yin XM, Simon RP, Chen J. Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 2001;21(13):4678-90.
- Cardinali DP, Golombek DA, Rosenstein RE, Cutrera RA, Esquifino AI. Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? *J Pineal Res* 1997;23:32-9.
- Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 2004;18(3):537-9.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Najji L, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Guerrero JM, Calvo JR. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* 2005;39:400-8.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-70.
- Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet* 2018;392(10141):75-87.
- Chakravortty D, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Mu MM, Yoshida T, Yokochi T. Inhibition of caspase 3 abrogates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by preventing activation of NF- $\kappa$ B and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Infect Immun* 2001;69:1315-21.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2000;29:323-33.
- Chang S, Li L. Metabolic Endotoxemia: A Novel Concept in Chronic Disease Pathology. *J Med Sci* 2011;31(5):191-209.
- Chen F, Chen J, Chen Q, Yang L, Yin J, Li Y, Huang X. *Lactobacillus delbrueckii* protected intestinal integrity, alleviated intestinal oxidative damage, and activated Toll-Like Receptor-bruton's tyrosine kinase–nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in weaned piglets challenged with lipopolysaccharide. *Antioxidants* 2021;10:468.
- Chen J, Xia H, Zhang L, Zhang L, Zhang H, Wang D, Tao X. Protective effects of melatonin on sepsis-induced liver injury and dysregulation of gluconeogenesis in rats through activating SIRT1/STAT3 pathway. *Biomed Pharmacother* 2019;117:109150.
- Chenevier-Gobeaux C, Bardet V, Poupet H, Poyart C, Borderie D, Claessens YE. Presepsin (sCD14-ST) secretion and kinetics by peripheral blood mononuclear cells and monocytic THP-1 cell line. *Ann Biol Clin* 2016;74(1):93-7.



- Choi EY, Jin JY, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Melatonin inhibits prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing nf-kappab and stat1 activity. *J Pineal Res* 2011;50:197-206.
- Chuffa LGA, Reiter RJ, Lupi LA. Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 2017;38(10):945-52.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885-91.
- Colunga Biancatelli RML, Berrill M, Mohammed YH, Marik PE. Melatonin for the treatment of sepsis: the scientific rationale. *J Thorac Dis* 2020;12:S54-65.
- Counis MF, Torriglia A. DNases and apoptosis. *Biochem Cell Biol* 2000;78(4):405-14.
- Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuña-Castroviejo D. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 1999;13:1537-46.
- Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Joshi MS, Bauer JA, Gadd ME, Wewers MD, Pfeiffer DR. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med* 2004;32:478-88.
- Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* 2004;4:729-41.
- Cunningham PN, Dyanov HM, Park P, Wang J, Newell KA, Quigg RJ. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J Immunol* 2002;168:5817-23.
- Dai JM, Guo WN, Tan YZ, Niu KW, Zhang JJ, Liu CL, Yang XM, Tao KS, Chen ZN, Dai JY. Wogonin alleviates liver injury in sepsis through Nrf2-mediated NF-κB signalling suppression. *J Cell Mol Med* 2021;25:5782-98.
- Damjanov I, Perry AM, Perry K, 2021. *Pathology for the Health Professions*, 6th Edition.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-19.
- De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence* 2014;5(1):73-9.
- De Jager CP, van Wijk PT, Mathoera RB, de Jongh-Leuvenink J, van der Poll T, Wever PC. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Crit Care* 2010;14:R192.
- De Jong E, de Lange DW, Beishuizen A, van de Ven PM, Girbes ARJ, Huisman A. Neutrophil CD64 expression as a longitudinal biomarker for severe disease and acute infection in critically ill patients. *Int Jnl Lab Hem* 2016;38(5):576-84.
- Debonera F, Aldeguez X, Shen X, Gelman AE, Gao F, Que X, Greenbaum LE, Furth EE, Taub R, Olthoff KM. Activation of interleukin-6/Stat3 and liver regeneration following transplantation. *J Surg Res* 2001;96:289-95.
- DeHart GW, Jin T, McCloskey DE, Pegg AE, Sheppard D. The alpha9beta1 integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7188-93.
- Deliyanti D, Alrashdi SF, Tan SM, Meyer C, Ward KW, de Haan JB, Wilkinson-Berka JL. Nrf2 Activation Is a Potential Therapeutic Approach to Attenuate Diabetic Retinopathy. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2018;59(2):815-25.

- Deng M, Scott MJ, Loughran P, Gibson G, Sodhi C, Watkins S, Hackam D, Billiar TR. Lipopolysaccharide clearance, bacterial clearance, and systemic inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of TLR4 during sepsis. *J Immunol* 2013;190:5152-60.
- Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* 2009;119:2868-78.
- Dong X, Liu J, Xu Y, Cao H. Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice. *Exp Ther Med* 2019;17:3835-47.
- Dong Y, Fan C, Hu W, Jiang S, Ma Z, Yan X, Deng C, Di S, Xin Z, Wu G, Yang Y, Reiter RJ, Liang G. Melatonin attenuated early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via regulating NLRP3 inflammasome and apoptosis signaling. *J Pineal Res* 2016;60(3):253-62.
- Dun-Xian T, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007;42:28-42.
- Duval DL, Miller DR, Collier J, Billings RE. Characterization of hepatic nitric oxide synthase: Identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants. *Mol Pharmacol* 1996;50:277-84.
- Eguchi K, Yonezawa M, Ohimoto H, Hiramatsu Y. Developmental changes of polyamine biosynthesis in rat liver. *Biol Neonate* 1992;362(6):402-8.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391(6662):43-50.
- Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006;40:71-8.
- Farkas JD. The complete blood count to diagnose septic shock. *J Thorac Dis* 2020;12(1):S16-21.
- Ferraz FF, Kos AG, Janino P, Homsí E. Effects of melatonin administration to rats with glycerol-induced acute renal failure. *Ren Fail* 2002;24(6):735-46.
- Fink MP. Cytopathic Hypoxia. *Crit Care Clin* 2001;17(1):21-37.
- Fiorucci S, Antonelli E, Morelli A. Nitric oxide and portal hypertension: a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid that selectively releases nitric oxide in the liver. *Digestive and Liver Disease* 2003;35(2):S61-9.
- Fischer TW, Kleszczyński K, Hardkop LH, Kruse N, Zillikens D. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8 hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J Pineal Res* 2013;54(3):303-12.
- Francois B, Trimoreau F, Vignon P, Fixe P, Praloran V, Gastinne H. Thrombocytopenia in the sepsis syndrome: role of hemophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor. *Am J Med* 1997;103:114-20.
- Fujishima S, Aikawa N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intens Care Med* 1995;21:277-85.
- Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and Septic Shock: A History. *Crit Care Clin* 2009;25(1):83-101.
- Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. Epstein FH, editor. *N Engl J Med* 1999;340(6):448-54.

- Gaboriau F, Vaultier M, Moulinoux JP, Delcros JG. Antioxidative properties of natural polyamines and dimethylsilane analogues. *Redox Rep* 2005;10(1):9-18.
- Gaitantzi H, Karch J, Germann L, Cai C, Rausch V, Birgin E, Rahbari N, Seitz T, Hellerbrand C, König C, Augustin H.G, Mogler, de la Torre C, Gretz N, Itzel, Teufel A, Ebert M, Breitkopf-Heinlein K. BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS. *Cells* 2020;9(3):617.
- Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J* 1996;316:247-9.
- Galve-de Rochemonteix B, Wiktorowicz K, Kushner I, Dayer JM. C-reactive protein increases production of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ , and expression of mRNA by human alveolar macrophages. *J Leukocyte Biol* 1993;53:439.
- Gao Y, Li Y, Yu X, Guo S, Ji X, Sun T, Lan C, Lavergne V, Ghannoum M, Li L. The impact of various platelet indices as prognostic markers of septic shock. *PLoS One* 2014;9:e103761.
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates th1 lymphocytes by increasing il-12 production. *Life Sci* 1999;65:2143-50.
- Gardlund B, Sjolín J, Nilsson A, Roll M, Wickerts CJ, Wretling B. Plasma Levels of Cytokines in Primary Septic Shock in Humans: Correlation with Disease Severity. *J Infect Dis* 1995;172(1):296-301.
- Germaine E, Acuna-Castrovi D, Carlos Lopez L, Dun-Xian T, Dolores M, Sánchez-Hidalgo M. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *JPP* 2006;58:1153-65.
- Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond* 2004;58(2):187-201.
- Gholamnezhad Z, Fatehi Hassanabad Z. Effects of lipopolysaccharide-induced septic shock on rat isolated kidney, possible role of nitric oxide and protein kinase C pathways. *Iran J Basic Med Sci* 2018;21(10):1073-8.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.
- Giannakis C, Forbes IJ, Zalewski PD. Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent nuclease: tissue distribution, relationship to inter-nucleosomal DNA fragmentation and inhibition by Zn<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181(2):915-20.
- Gibot S, Kolopp-Sarda M-N, Béné MC, Cravoisy A, Levy B, Faure GC, Bollaert PE. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med* 2004;141(1):9-15.
- Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: Role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J* 1998;12:685-93.
- Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2000;275:7757-63.
- Godowski PJ. A smooth operator for LPS responses. *Nature Immunology* 2005;6:544-6.
- Gordon AC, Mason AJ, Thirunavukkarasu N, Perkins GD, Cecconi M, Cepkova M, Pogson DG, Aya HD, Anjum A, Frazier GJ, Santhakumaran S, Ashby D, Brett SJ. Effect of Early Vasopressin vs Norepinephrine on Kidney Failure in Patients With Septic Shock. *JAMA* 2016;316(5):509-18.

- Gotoh T, Araki M, Mori M. Chromosomal lokalizatio of arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:487-91.
- Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 1999;144(3):427-34.
- Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 2016;353(6):i1585.
- Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JR, Singel DJ, Stamler JS. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9027-32.
- Guiducci C, Gong M, Cepika AM, Xu Z, Tripodo C, Bennett L, Crain C, Quartier P, Cush JJ, Pascual V, Coffman RL, Barrat FJ. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2013;210(13):2903-19.
- Gumprich E, Dahl R, Yerushalmi B, Devereaux M, Sokol R. Nitric oxide ameliorates hydrophobic bile acid-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes by non-mitochondrial pathways. *J Biol Chem* 2002;277(28):25823-30.
- Gunneth CA, Chu Y, Heistad DD, Loihl A, Faraci FM. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;275:H416-21.
- Gunneth CA, Lund DD, McDowell AK, Faraci FM, Heistad DD. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1617-22.
- Guo Y, Sun J, Li T, Zhang Q, Bu S, Wang Q, Lai D. Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF- $\kappa$ B/iNOS and Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Sci Rep* 2017;7:1-13.
- Gupta R, Singh R, Soni M. C-reactive protein (CRP) as an indicator of sepsis in orthopaedic trauma. *Indian J Med Sci* 2002;56(10):501-7.
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy JL, Zweier PM, Woster RA, Casero J. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11140-5.
- Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2(2):135-43.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130-9.
- Haendeler J, Messmer UK, Brune B, Neugebauer E, Dimmeler S. Endotoxin shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2. *Shock* 1996;6:405-9.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-4.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998;92:3007-17.
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where we are now? *Free Radic Biol Med* 2002;33:774-97.
- Hashimoto JA. New spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anl Biochem* 1974;62:426-35.
- Hayashi Y, Abe M, Murai A, Shimizu N, Okamoto I, Katsuragi T, Tanaka K. Comparison of effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors on plasma nitrite/nitrate levels and tissue NOS activity in septic organs. *Microbiol Immunol* 2005;49:139-47.

- Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Inducible nitric oxide production is an adaptation to cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 2001;72(1):149-55.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
- Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes J.M, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines in Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. *J Immunol* 2001;167:6533-44.
- Hildeman DA, Mitchell T, Aronow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *PNAS* 2003;100:15035-40.
- Hines IN, Wheeler MD. Recent advances in alcoholic liver disease. III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G310-14.
- Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;187:587-600.
- Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, Comiran RA, Bernardi A, Campos MM, Battastini AM, Salbego C. Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: Involvement of gsk-3beta, tau and neuroinflammation. *J Pineal Res* 2010;48:230-8.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013;13(3):260-8.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-51.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002;168(5):2493-500.
- Howell MD, Davis AM. Management of Sepsis and Septic Shock. *JAMA* 2017;317(8):847-8.
- Hristova M, Tzaneva M, Bekyarova G, Chivchibashi D, Stefanova N, Kiselova-Kaneva Y. Molecular Mechanisms of Melatonin Protection from Gastric Mucosal Apoptotic Injury in Experimental Burns. *Molecules* 2018;23(4):pii:E749.
- Hu R, Pegg A. Rapid induction of apoptosis by deregulated uptake of polyamine analogues. *Biochem J* 1997;328:307-16.
- Huang SH, Cao XJ, Wei W. Melatonin decreases tlr3-mediated inflammatory factor expression via inhibition of nf-kappa b activation in respiratory syncytial virus-infected raw264.7 macrophages. *J Pineal Res* 2008;45:93-100.
- Hule RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Rad Commun* 1993;18:195-9.
- Hunt BJ. Bleeding and Coagulopathies in Critical Care. *N Engl J Med* 2014;370(9):847-59.
- Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:697-706.
- Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M, Akyol O, Ozen S. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 2004;340:153-62.

- Inserra P, Zhang Z, Ardestani SK, Araghi-Niknam M, Liang B, Jiang S, Shaw D, Molitor M, Elliott K, Watson RR. Modulation of cytokine production by dehydroepiandrosterone (dhea) plus melatonin (mlt) supplementation of old mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;218:76-82.
- Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, Mann GE. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res* 2004;94:609-16.
- Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993;264:G801-9.
- James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdela J, Alvis Guzman N. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392(10159):1789-858.
- Janne J, Alhonen L, Pietilä M, Keinänen TA. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem* 2004;271:877-94.
- Janne J, Raina A, Siimens M. Spermidine and spermine in rat tissues at different ages. *Acta Physiol Scand* 1964;62:352-8.
- Jersmann HPA. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol Cell Biol* 2005;83(5):462-7.
- Jiang T, Chang Q, Cai J, Fan J, Zhang X, Xu G. Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:3528274.
- Jiang W, Xu J, Shen B, Wang Y, Teng J, Ding X. Acute kidney injury risk assessment. *Contrib Nephrol* 2018;193:13-20.
- Jiang-Shieh YF, Wu CH, Chien HF, Wei IH, Chang M L, Shieh JY, Wen CY. Reactive changes of interstitial glia and pinealocytes in the rat pineal gland challenged with cell wall components from gram-positive and -negative bacteria. *J Pineal Res* 2005;38:17-26.
- Joshi MS, Julian MW, Huff JE, Bauer JA, Xia Y, Crouser ED. Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:999-1007.
- Kallet RH, Lipnick MS, Zhuo H, Pangilinan LP, Gomez A. Characteristics of 133 nonpulmonary organ dysfunction at onset of ARDS based on the Berlin definition. *Respir Care* 2019;64(5):493-501.
- Kamal F, Snook L, Saikumar JH. Rhabdomyolysis-Associated Acute Kidney Injury With Normal Creatine Phosphokinase. *Am J Med Sci* 2018;355(1):84-7.
- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
- Karzai W, Reinhart K. Modulation of neutrophil function in sepsis. In Vincent JL (ed): *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Berlin: Springer-Verlag, 2000, pp 41-50.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2009;47(9):1304-9.
- Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 2014;311(13):1308-16.
- Kaukonen K-MM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med* 2015;372(17):1629-38.

- Kaushik S, Kaur J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta* 2003;333(1):69-77.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11(5):373-84.
- Kazaki H, Sakurada T. Simple micro-assay methods for enzymes of purine metabolism. *J Lab Clin Med* 1977;89:1135-44.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:89-116.
- Kerr JF, Searle J. The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. *J Pathol* 1972;108(1):55-8.
- Kettle AJ, Winterbourn CC. Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1994;269:17146-51.
- King EG, Bauzá GJ, Mella JR, Remick DG. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Lab Invest* 2014;94(1):4-12.
- Kishi K, Yasuda T, Takeshita H. DNase I: structure, function, and use in medicine and forensic science. *Leg Med (Tokyo)* 2001;3(2):69-83.
- Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukocyte Biol* 2013;93:185-98.
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 2006;26:221-9.
- Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine HN, Tanaka T, Moriguchi H, Motohashi H, Nakayama K, Yamamoto M. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 2016;7:1-14.
- Kong X, Thimmulappa R, Craciun F, Harvey C, Singh A, Kombairaju P, Reddy SP, Remick D, Biswal S. Enhancing Nrf2 pathway by disruption of Keap1 in myeloid leukocytes protects against sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(8):928-38.
- Koroliuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. A method of determining catalase activity. *Lab Delo* 1988;1:16-9.
- Kotera A, Sagishima K, Tashiro T, Niimori D, Kamohara H, Kinoshita Y. A validation of presepsin levels in kidney dysfunction patients: four case reports. *J Intensive Care* 2014;2(1):63.
- Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003;52(3):818-23.
- Kress JP, Accp I, Care C, Brd M. Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med* 2009;279-88.
- Kubes P, Jenne C. Immune responses in the liver. *Annu Rev Immunol* 2018;36:247-77.
- Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, Peters C, Ahsan M, Chateau D. Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock. *Chest* 2009;136(5):1237-48.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine* 2006;34(6):1589-96.

- Kumar S, Rizvi M. Serum tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in pediatric patients with sepsis and its correlation with microbiologic findings. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53(3):494-7.
- Kurosaki M, Calzi M.L, Scanziani E, Garattini E, Terao M. Tissue-and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem J* 1995;306:225-34.
- L'Heureux M, Sternberg M, Brath L, Turlington J, Kashiouris MG. Sepsis-Induced Cardiomyopathy: a Comprehensive Review. *Curr Cardiol Rep* 2020;22(5):35.
- Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R, Ferrara P. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol* 1993;23(9):2144-51.
- Lai H, Singh NP. Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells". *Bioelectromagnetics* 1997;18:446-54.
- Lang F, Gulbins E, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Huber SM, Duranton C, Lang KS, Lang PA, Wieder T. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 2004;17:473-80.
- Laskin DL, Laskin JD. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology* 2001;160:111-8.
- Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002;186:37-46.
- Lauková L, Konečná B, Janovičová L, Vlková B, Celec. Deoxyribonucleases and their applications in biomedicine. *Biomolecules* 2020;10:1036.
- Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(12):4742-6.
- Lee EJ, Lee YR, Joo HK, Cho EJ, Choi S, Sohn KC, Lee SD, Park JB, Jeon BH. Arginase II inhibited lipopolysaccharide-induced cell death by regulation of iNOS and Bcl-2 family proteins in macrophages. *Mol Cells* 2013;35:396-401.
- Lee S, Kim S, Kang KP, Moon SO, Sung MJ, Kim DH, Kim HJ, Park SK. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1057-65.
- Lee SMY, Kok K-H, Jaume M, Cheung TKW, Yip TF, Lai JCC, Guan Y, Webster RG, Jin DY, Peiris JSM. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111(10):3793-8.
- Lefkowitz DL, Mills K, Morgan D, Lefkowitz SS. Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;199:204-10.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 1995;146:1220-34.
- Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 2000;343:1703-14.
- Lemarié J, Gibot S. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Critical Care Clinics* 2020;36(1):41-54.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of Melatonin, The Pineal Gland Factor That Lightens Melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80(10):2587.
- Levy B, Desebbe O, Montemont C, Gibot S. Increased aerobic glycolysis through  $\beta_2$  stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states. *Shock* 2008;30(4):417-21.



- Levy B. Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 2006;12(4):315-21.
- Levy E, Ruebner BH. Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. *Light microscopy and histochemistry. Am J Pathol* 1967;51:269-85.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-6.
- Levy MM. The challenge of sepsis. *Crit Care* 2004;8(6):435-6.
- Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signalling. *Critical Care Med* 2000;28(4):N37-52.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(15):8461-6.
- Liu Y, Li F, Zhang L, Wu J, Wang Y, Yu H. Taurine alleviates lipopolysaccharide induced liver injury by antiinflammation and antioxidants in rats. *Mol Med Rep* 2017;16:6512-7.
- Ljungström L, Pernestig AK, Jacobsson G, Andersson R, Usener B, Tilevik D. Diagnostic accuracy of procalcitonin, neutrophil-lymphocyte count ratio, C-reactive protein, and lactate in patients with suspected bacterial sepsis. *PLoS One* 2017;12(7):e0181704.
- Louis CA, Mody V, Henry WL Jr, Reichner JS, Albina JE. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 1999;276:R237-42.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-73.
- Luheshi GN. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. *Ann N Y Acad Sci* 1998;856:83-9.
- Luster MI, Germolec DR, Yoshida T, Kayama F, Thompson M. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology* 1994;19:480-8.
- MacLea KS, Krieser RJ, Eastman A. Revised structure of the active form of human deoxyribonuclease II alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292(2):415-21.
- MacLea KS, Krieser RJ, Eastman A. Structural requirements of human DNase II alpha for formation of the active enzyme: the role of the signal peptide, N-glycosylation, and disulphide bridging. *Biochemical Journal* 2003;371:867-76.
- Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 1988;63:465-9.
- Maestroni GJM, and Conti A, 1993. Melatonin in relation to the immune system. Pages 289-311 in: *Melatonin. Biosynthesis, Physiological Effect, and Clinical Applications*. H. S. Yu and R. J. Reiter, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Majno G. The Ancient Riddle of Formula (Sepsis). *J Infect Dis* 1991;163(5):937-45.
- Martella MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994;78:927-30.
- Masson S, Caironi P, Spanuth E, Thomae R, Panigada M, Sangiorgi G, Fumagalli R, Mauri T, Isgrò S, Fanizza C, Romero M, Tognoni G, Latini R, Gattinoni L. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. *Crit Care* 2014;18(1). doi:10.1186/cc13183
- Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 2002;296(5566):301-5.

- Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol* 1994;12(1):991-1045.
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, Gonzalez-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 2013;54(1):1-14.
- Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakyntinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000;28(2):451-7.
- May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998;19:80-8.
- McGowan AJ, Fernandes RS, Samali A, Cotter TG. Antioxidants and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 1996;24:229-76.
- Mehta S, Gill SE. Improving clinical outcomes in sepsis and multiple organ dysfunction through precision medicine. *J Thorac Dis* 2019;11(1):21-8.
- Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 1993;15:59-69.
- Messaris E, Memos N, Chatzigianni E. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:1764-70.
- Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988;318:1481-6.
- Millar CGM, Theimermann C. Intrarenal haemodynamics and renal dysfunction in endotoxaemia: effects of nitric oxide synthase inhibition. *Br J Pharmacol* 1997;121:1824-30.
- Mizock BA. The Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Disease-a-Month* 2009;55(8):476-526.
- Mladenovic B, Mladenovic N, Brzacki V, Petrovic N, Kamenov A, Golubovic M, Nickovic V, Stojanovic NM, Sokolovic DT. Exogenous putrescine affects polyamine and arginine metabolism in rat liver following bile ductus ligation. *Can J Physiol Pharmacol* 2018;96:1232-37.
- Mogil RJ, Shi Y, Bissonnette RP, Bromley P, Yamaguchi I, Green DR. Role of DNA fragmentation in T cell activation-induced apoptosis in vitro and in vivo. *J Immunol* 1994;152(4):1674-83.
- Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem Mol Biol Int* 1995;37:1063-70.
- Molpeceres V, Manriz JL, Barrio JE, Cairo E, Villafafie A, Gonzalez-Gallego J. Reduction of liver apoptosis by administration of melatonin in a rat model of aging. *Molecular and Cellular Biology - Cell Cycle Control/Apoptosis* 2001;p109.
- Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 1999;342:481-96.
- Morgenthaler NG, Struck J, Chancerelle Y, Weglöhner W, Agay D, Bohuon C, Suarez-Domenech V, Bergmann A, Müller B. Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res* 2003;35(5):290-5.
- Morikawa A, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Chakravorty D, Yoshida T, Yokochi T. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in D-galactosaminesensitized mice as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun* 1999;67:1018-24.
- Mortezaee K, Khanlarkhani N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: A review. *J Cell Physiol* 2018;233:4015-32.

- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004;25:75-84.
- Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 2003;24:327-34.
- Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Marktl W, Ferti L, Siostrzonek P. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:536-40.
- Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 2000;29(1):1-13.
- Nauseef WM, Malech HL. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood* 1986;67:1504-7.
- Nesslerer N, Launey Y, Aninat C, Morel F, Mallédant Y, Seguin P. Clinical review: The liver in sepsis. *Crit Care* 2012;16(5):235.
- Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1102-11.
- Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase modified lipoproteins and atherogenesis. *J Lipid Res* 2009;50:346-51.
- Ničković VP, Novaković T, Lazarević S, Šulović L, Živković Z, Živković J, Mladenović B, Stojanović NM, Petrović V, Sokolović DT. Pre- vs. post-treatment with melatonin in CCl<sub>4</sub>-induced liver damage: Oxidative stress inferred from biochemical and pathohistological studies. *Life Sci* 2018;202:28-34.
- Niehues T. C-reactive protein and other biomarkers-the sense and non-sense of using inflammation biomarkers for the diagnosis of severe bacterial infection. *LymphoSign Journal* 2018;5:35-47.
- Nikolic J, Bjelakovic G, Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. *Mol Cell Biochem* 2003;244(1-2):125-8.
- Nikolic J, Stojanovic I, Pavlovic R, Sokolovic D, Bjelakovic G, Beninati S. The role of L-arginine in toxic liver failure: interrelation of arginase, polyamine catabolic enzymes and nitric oxide synthase. *Amino Acids* 2007;32:127-31.
- Nonogaki K, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Alphaadrenergic receptors mediate the hypertriglyceridemia induced by endotoxin, but not tumor necrosis factor, in rats. *Endocrinology* 1994;135:2644-50.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrance P, Canet E, Boutin JA. Identification of the Melatonin-binding Site iMT/i sub3/sub as the Quinone Reductase 2. *J Biol Chem* 2000;275(40):31311-7.
- Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K, Ishiguro I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *J Pineal Res* 2000;28(2):119-26.
- Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in human pregnancy near term. *J Pineal Res* 1998;25:129-34.
- Oktem F, Ozguner F, Mollaoglu H, Koyu A, Uz E. Oxidative Damage in the Kidney Induced by 900-MHz- Emitted Mobile Phone: Protection by Melatonin. *Arch Med Res* 2005;36:350-5.
- Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117(4):1162-72.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol* 2011;29(1):71-109.

- Pachment RE, Pierce GB. Polyamine oxidation, programmed cell death, and regulation of melanoma in the murine embryonic limb. *Cancer Res* 1989;49:6680-6.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008;85(3):335-53.
- Patnaik R, Azim A, Agarwal V. Neutrophil CD64 a Diagnostic and Prognostic Marker of Sepsis in Adult Critically Ill Patients: A Brief Review. *Indian J Crit Care Med* 2020;24(12):1242-50.
- Pavlović D. Proučavanje povezanosti peroksidacije lipida i katabolizma poliamina u različitim metaboličkim uslovima. *Doktorska disertacija, Niš, 1991.*
- Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983;34:141-212.
- Perreau-Lenz S, Pevet P, Buijs RM, Kalsbeek A. The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int* 2004;21(1):1-25.
- Pioli C, Caroleo MC, Nistico G, Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol* 1993;15:463-8.
- Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care* 2004;8(6):R409-13.
- Popovic D, Kocic G, Katic V, Jovic Z, Zarubica A, Jankovic Velickovic L, Nikolic V, Jovic A, Kundalic B, Rakic V, Ulrih NP, Skrt M, Sokolovic D, Dinic L, Stojanovic M, Milosavljevic A, Velickovic F, Sokolovic D. Protective effects of anthocyanins from bilberry extract in rats exposed to nephrotoxic effects of carbon tetrachloride. *Chem Biol Interact* 2019;304:61-72.
- Poremska Z, Kedra M. Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. *Clin Chim Acta* 1975;60:355-61.
- Potic, M, Ignjatovic, I, Nickovic, VP, Zivkovic JB, Krdzic JD, Mitic JS, Popovic D, Ilic IR, Stojanovic NM, Sokolovic D. Two different melatonin treatment regimens prevent an increase in kidney injury marker-1 induced by carbon tetrachloride in rat kidneys. *Can J Physiol Pharm* 2019;97:422-8.
- Protti A, Carre J, Frost MT, Taylor V, Stidwill R, Rudiger A, Singer M. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Crit Care Med* 2007;35:2150-5.
- Prucha M, Herold I, Zazula R, Dubska L, Dostal M, Hildebrand T, Hyanek J. Significance of lipopolysaccharide-binding protein (an acute phase protein) in monitoring critically ill patients. *Crit Care* 2003;7(6):R154-9.
- Pryor W, Squadrito G. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with the superoxide anion. *Am J Physiol* 1995;268:L699-722.
- Quash G, Calogero H, Fossar N, Ferdinand A, Taylor D. Modification of diamine oxidase activity in vitro by metabolites of asparagine and differences in asparagine decarboxylation in normal and virus-transformed baby hamster kidney cells. *Biochem J* 1976;157(3):599-608.
- Quash G, Gresland L, Delain E, Huppert J. Antipolyamine antibodies and cell lysis. The inhibitory effect of putrescine. *Exp Cell Res* 1972;75(2):363-8.
- Quash G, Taylor DR. Serum  $\beta$ -aminopropionaldehyde: Identification and origin. *Clin Chim Acta* 1970;30:17-23.
- Quinet M, Ndayiragije A, Lefèvre I, Lambillotte B, Dupont-Gillain CC, Lutts S. Putrescine differently influences the effect of salt stress on polyamine metabolism and ethylene synthesis in rice cultivars differing in salt resistance. *J Exp Bot* 2010;61:2719-33.

- Quoilin C, Mouithys-Mickalad A, Lécart S, Fontaine-Aupart MP, Hoebeke M. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2014;1837:1790-800.
- Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002;71:635-700.
- Rahman I, Kode A, Biswas SB. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 2006;1:3159-65.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002;192:131-7.
- Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(2):111-21.
- Reinhart K, Daniels R, Kisson N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 2017;377(5):414-7.
- Reis DJ, Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends in Pharmacological Sciences* 2000;21(5):187-93.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 2016;61(3):253-78.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995;18(1):1-11.
- Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: Exceeding Expectations. *Physiology* 2014;29(5):325-33.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. A review of the evidence. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2001;34:237-56.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress. *J Biomed Sci* 2000;7:444-58.
- Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2002;54(10):1299-321.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991;12:151-80.
- Reynolds FD, Dauchy R, Blask D, Dietz PA, Lynch D, Zuckerman R. The pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A. *Surgery* 2003;134:474-9.
- Rhee SH. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut. *Intest Res* 2014;12:90-5.
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, ME Nunnally, B Rochweg, GD Rubenfeld, DC Angus, D Annane, RJ Beale, GJ Bellingham, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, der Poll TV, Vincent J-L, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. *Intensive Care Med* 2017;43(3):304-77.

- Ribas V, García-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* 2014;5:1-19.
- Riedemann NC, Ward PA. Anti-inflammatory strategies for the treatment of sepsis. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:339-50.
- Rigato O, Silva E, Kallas EG, Brunialti MKC, Martins PS, Salomao R. Pathogenetic aspects of sepsis and possible targets for adjunctive therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocrin Metabol Dis* 2001;1:13-30.
- Rittirsch D, Flierl MA, Peter A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Ward Nature Reviews Immunology* 2008;8:776-87.
- Rodriguez AM, Rodin D, Nomura H, Morton CC, Weremowicz S, Schneider MC. Identification, localization, and expression of two novel human genes similar to deoxyribonuclease I. *Genomics* 1997;42(3):507-13.
- Rodríguez-Reynoso S, Leal C, Portilla E, Olivares N, Mu niz J. Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Surg Res* 2001;100(2):141-9.
- Roland CR, Naziruddin B, Mohanakumar T, Flye MW. Gadolinium chloride inhibits Kupffer cell nitric oxide synthase (iNOS) induction. *J Leukocyte Biol* 1996;60:487-92.
- Rosenthal NE. Plasma melatonin as a measure of the human clock. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:225-6.
- Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R, H bschle T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009;29:229-45.
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020;395(10219):200-11.
- Sahelian R. Melatonin. *Arch Fam Med* 1996;5(4):196.
- Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: Differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(7):1407-26.
- Samra JS, Summers LK, Frayn KN. Sepsis and fat metabolism. *Br J Surg* 1996;83:1186-96.
- Sasaki K, Fujita I, Hamasaki Y, Miyazaki S. Differentiating between bacterial and viral infection by measuring both C-reactive protein and 2'-5'-oligoadenylate synthetase as inflammatory markers. *J Infect Chemother* 2002;8(1):76-80.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17(6):1675-87.
- Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Peter ME. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999;11:277-85.
- Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990;12(5):1216-21.
- Schomerus C, Laedtke E, Olcese J, Weller J, Klein D, Korf HW. Signal transduction and regulation of melatonin synthesis in bovine pinealocytes: impact of adrenergic, peptidergic and cholinergic stimuli. *Cell Tissue Res* 2002;309(3):417-28.
- Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004;351:159-69.

- Schuber F. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J* 1989;260:1-10.
- Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets-an updated view. *Mediators of inflammation* 2013;2013:165974.
- Screaton G, Xu NK. The cell life and death signaling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol* 2000;12:316-22.
- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L355-63.
- Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care* 2003;7:291-307.
- Segal AW. The molecular and cellular pathology of chronic granulomatous disease. *Eur J Clin Invest* 1988;18:433-43.
- Seiler N, Al-Terib MJ. Putrescine catabolism in mammalian brain. *Biochem J* 1974;144:295-305.
- Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver-disruption at two different levels of the regeneration pathway. *HEPATOLOGY* 2000;31:35-42.
- Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yegen BÇ. Melatonin protects against organ injury in rat model of sepsis. *Surg Today* 2005;35:52-9.
- Sewerynek E, Abe M, Reiter RJ, Barlow-Walden LR, Chen L, McCabe TJ, Roman LJ, Diaz-Lopez B. Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *J Cell Biochem* 1995;58:436-44.
- Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *European Journal of Pharmacology Environmental Toxicology and Pharmacology Section* 1995;293:327-34.
- Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. *JAMA* 2016;315(8):762-74.
- Seymour CW, Rosengart MR. Septic Shock: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA* 2015;314(7):708-17.
- Shah MD, Gnanaraj C, Haque AE, Iqbal M. Antioxidative and chemopreventive effects of *Nephrolepis biserrata* against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced oxidative stress and hepatic dysfunction in rats. *Pharm Biol* 2015;53:31-9.
- Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. *JAMA* 2016;315(8):775-87.
- Shen Y, Huang X, Zhang W. Platelet-to-lymphocyte ratio as a prognostic predictor of mortality for sepsis: interaction effect with disease severity-a retrospective study. *BMJ Open* 2019;9:e022896.
- Shrestha GS, Kwizera A, Lundeg G, Baelani JI, Azevedo LCP, Pattnaik R, Haniffa R, Gavrilovic S, Thi Hoang Mai N, Kissoon N, Lodha R, Misango D, Neto AS, Schultz MJ, Dondorp AM, Thevanayagam J, Dünser MW, Alam AKMS, Mukhtar AM, Hashmi M, Ranjit S, Otu A, Gomersall C, Amito J, Vaeza NN, Nakibuuka J, Mujiyarugamba P, Estenssoro E, Ospina-Tascón GA, Mohanty S, Mer M. International Surviving Sepsis Campaign guidelines 2016: the perspective from low-income and middle-income countries. *Lancet Infect Dis* 2017;17(9):893-5.

- Silva SO, Rodrigues MR, Carvalho SR, Catalani LH, Campa A, Ximenes VF. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J Pineal Res* 2004;37(3):171-5.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003;55(2):325-95.
- Simpson SQ. New Sepsis Criteria. *Chest* 2016;149(5):1117-8.
- Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 2004;364(9433):545-8.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315(8):801-10.
- Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 2014;5(1):66-72.
- Siracusano L, Girasole V. Glucose and lipid metabolism in sepsis and endotoxemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009;53(3):413-4.
- Skirecki T, Borkowska-Zielińska U, Złotorowicz M, Hoser G. Sepsis immunopathology: Perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. *Arch Immunol Ther Exp* 2012;60:123-35.
- Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(2):152-66.
- Sokolovic D, Bjelakovic G, Nikolic J, Djindjic B, Pavlovic D, Kocic G, Stojanovic I, Pavlovic V. Effect of L-arginine on metabolism of polyamines in rat's brain with extrahepatic cholestasis. *Amino Acids* 2010;38:339-45.
- Sokolovic DT, Lilic L, Milenkovic V, Stefanovic R, Ilic TP, Mekic B, Ilic I, Stojanovic NM, Ilic IR. Effects of melatonin on oxidative stress parameters and pathohistological changes in rat skeletal muscle tissue following carbon tetrachloride application. *Saudi Pharm J* 2018;26:1044-50.
- Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJC, Baron EJ, O'Neill PJ, Chow AW, Dellinger RP. Diagnosis and Management of Complicated Intraabdominal Infection in Adults and Children: Guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America Complicated Intra-abdominal Infection Guidelines. *Clin Infect Dis* 2010;50(2):133-64.
- Soulet D, Rivest S. Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J Cell Biol* 2003;162:257-68.
- Sprung CL, Schein RMH, Balk RA. The new sepsis consensus definitions: the good, the bad and the ugly. *Intensive Care Med* 2016;42(12):2024-6.
- Srinivasan V, Mohamed M, Kato H. Melatonin in bacterial and viral infections with focus on sepsis: a review. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012;6(1):30-9.
- Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The Pathogenesis of Sepsis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2011;6(1):19-48.
- Steff SE, Porunellor A, Mathew A, Bennett M, De Saint Basile G. Perforin more than just an effector molecule. *Immunol Today* 2000;21:254-6.



- Sterling SA, Puskarich MA, Jones AE. The effect of liver disease on lactate normalization in severe sepsis and septic shock: a cohort study. *Clin Exp Emerg Med* 2015;2(4):197-202.
- Strauss R, Wehler M, Mehler K, Kreutzer D, Koebnick C, Hahn EG. Thrombocytopenia in patients in the medicalintensive care unit: bleeding prevalence, transfusion require-ments, and outcome. *Crit Care Med* 2002;30:1765-71.
- Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:55-66.
- Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:7738-42.
- Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G256-65.
- Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery* 1987;101:746-52.
- Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Med* 2003;167:570-9.
- Swiderska-Kończak G, Klusek J, Kołataj A. The effect of melatonin on glutathione and glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse liver and kidney in vivo. *Neuro Endocrinol Lett* 2006;27:365-8.
- Tadolini B. Polyamine inhibition of lipid peroxidation. *Biochem J* 1988;249:830-3.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010;140(6):805-20.
- Tan DX, Chen LD, Poeggler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993;1:57-60.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001;15(12):2294-6.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AMM. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:614-20.
- Tarocco A, Carocchia N, Morciano G, Wieckowski MR, Ancora G, Garani G, Pinton P. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death and Disease* 2019;10:317.
- Tay SY, O'Brien TE, McNulty JA. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res* 2001;303:423-31.
- Tein M, Berlett BS, Levine RL, Chock PB, Stadtman ER. Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration and methionine oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7809-14.
- Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:244-58.
- Tiwari RK, Kumar R, Lal MK, Kumar A, Altaf MA, Devi R, Mangal V, Naz S, Altaf MM, Dey A, Aftab T. Melatonin-Polyamine Interplay in the Regulation of Stress Responses in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 2022; DOI:10.1007/s00344-022-10717-y.

- Tocharus J, Khonthun C, Chongthammakun S, Govitrapong P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *J Pineal Res* 2010;48:347-52.
- Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, Dünser MW. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg* 2009;108(6):1841-7.
- Tripathi P, Hildeman D. Sensitization of T cells to apoptosis-a role for ROS? *Apoptosis* 2004;9:515-23.
- Tsukada T, Watanabe M, Yamashima T. Implications of CAD and DNase II in ischemic neuronal necrosis specific for the primate hippocampus. *J Neurochem* 2001;79(6):1196-206.
- Turjanski AG, Sáenz DA, Doctorovich F, Estrin DA, Rosenstein RE. Nitrosation of melatonin by nitric oxide: a computational study. *J Pineal Res* 2001;31(2):97-101.
- Tzirogiannis KN, Panoutsopoulos GI, Demonakou MD, Papadimas GK, Kondyli VG, Kourentzi KT, Hereti RI, Mykoniatis MG. The hepatoprotective effect of putrescine against cadmium-induced acute liver injury. *Arch Toxicol* 2004;78(6):321-9.
- Uberti D, Yavin E, Gil S, Ayasola KR, Goldfinger N, Rotter V. Hydrogen peroxide induces nucleartranslocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin. *Brain Res Mol* 1999;65:167-75.
- Ulmer JS, Herzka A, Toy KJ, Baker DL, Dodge AH, Sinicropi D, Shak S, Lazarus RA. Engineering actin-resistant human DNase I for treatment of cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(16):8225-9.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoriki S, Ueda T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces-glutamylcysteine synthase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 1999;27:838-47.
- Van der Poll T, Lowry SF. Modulation of the inflammatory response in severe sepsis. Tellado JM, Forse RA, Solomkin JS, editors. Basel Switzerland: Karger 1995.p.18-32.
- Van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *The Lancet Infectious Diseases* 2008;8(1):32-43.
- Van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2017;17(7):407-20.
- Van der Vliet A, Eiserich JP, O'Neill CA, Halliwell B, Cross CE. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys* 1995;319(2):341-9.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995;5:392-9.
- Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* 2018;14(2):121-37.
- Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2019;23(1):1-11.
- Vincent JL, Lefrant JY, Kotfis K, Nanchal R, Martin-Loeches I, Wittebole X, Sakka SG, Pickkers P, Moreno R, Sakr Y. Comparison of European ICU patients in 2012 (ICON) versus 2002 (SOAP). *Intensive Care Med* 2018;44(3):337-44.

- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Gall J-RL, Payen D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34(2):344-53.
- Vincent JL. The rise and fall of drotrecogin alfa (activated). *Lancet Infect Dis* 2012;12(9):649-51.
- Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 2001;38:189.
- Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987;1:355-7.
- Wang H, Wei W, Shen YX, Dong C, Zhang LL, Wang NP, Yue L, Xu SY. Protective effect of melatonin against liver injury in mice induced by *Bacillus Calmette-Guerin* plus lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol* 2004;10:2690-6.
- Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004;207:3221-31.
- Watkins RR, Lemonovich TL. Serum procalcitonin in the diagnosis and management of intra-abdominal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;10(2):197-205.
- West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011;472:476-80.
- Whiting JF, Green RM, Rosenbluth AB, Gollan JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis. *Hepatology* 1995;22:1273-8.
- Winiarska K, Fraczyk T, Malinska D, Drozak J, Bryla J. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *J Pineal Res* 2006;40(2):168-76.
- Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem* 2016;85:765-92.
- Withers PC. Urea: diverse functions of a "waste" product. *Clin Exp Pharmacol Pharmacol* 1998;25(9):722-7.
- Woo EJ, Kim YG, Kim MS, Han WD, Shin S, Robinson H, Park SY, Oh BH. Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol Cell* 2004;14:531-9.
- Woznica EA, Inglot M, Woznica RK, Łysenko L. Liver dysfunction in sepsis. *Adv Clin Exp Med* 2018;27:547-51.
- Wu CC, Lu KC, Lin GJ, Hsieh HY, Chu P, Lin SH, Sytwu HK. Melatonin enhances endogenous heme oxygenase-1 and represses immune responses to ameliorate experimental murine membranous nephropathy. *J Pineal Res* 2012;52(4):460-9.
- Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1-17.
- Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res* 2008;45:106-16.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-6.
- Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2575.

- Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, Chen YH, Zhang C, Zhao M, Xu DX, Song LH. Melatonin modulates tlr4-mediated inflammatory genes through myd88- and trif-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated raw264.7 cells. *J Pineal Res* 2012;53:325-34.
- Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem* 1998;273(35):22635-9.
- Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 2007;27:135-44.
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002;169(12):6668-72.
- Yan J, Li S, Li S. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol* 2014;33:498-510.
- Yang Y, Xie J, Guo F, Longhini F, Gao Z, Huang Y, Qiu H. Combination of C-reactive protein, procalcitonin and sepsis-related organ failure score for the diagnosis of sepsis in critical patients. *Ann Intensive Care* 2016;6(1):51.
- Yuan J, Horvitz HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* 2004;116:S53-6.
- Zahedi K, Barone S, Kramer DL, Amlal H, Alhonen L, Jänne J, Porter CW, Soleimani M. The role of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in endotoxin-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C164-74.
- Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts - Rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy* 2001;102:5-14.
- Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3(32):1-6.
- Zapellini PH, Rezin GT, Cardoso MR, Ritter C, Klamt F, Moreira JCF, Streck EL, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion* 2008;8:211-8.
- Zavodnik IB, Lapshina EA, Zavodnik LB, Labieniec M, Bryszewska M, Reiter RJ. Hypochlorous acid-induced oxidative stress in Chinese hamster B14 cells: viability, DNA and protein damage and the protective action of melatonin. *Mutat Res* 2004;559:39-48.
- Zhang C, Walker LM, Hinson JA, Mayeux PR. Oxidant stress in rat liver after lipopolysaccharide administration: effect of inducible nitric-oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:968-72.
- Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B, Tracey KJ. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 1997;185:1759-68.
- Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002;277:4611-22.
- Zhang S, Cui YL, Diao MY, Chen DC, Lin ZF. Use of platelet indices for determining illness severity and predicting prognosis in critically ill patients. *Chin Med J (Engl)* 2015;128:2012-8.
- Zhang Z, Zhou S, Jiang X, Wang YH, Li F, Wang YG, Zheng Y, Cai L. The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2014;16(1):35-45.

- Zhao H, Heard SO, Mullen MT, Crawford S, Goldberg RJ, Frenzl G, Lilly CM. An evaluation of the diagnostic accuracy of the 1991 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine and the 2001 Society of Critical Care Medicine/European Society of Intensive Care Medicine/American College of Chest Physicians/Ame. *Crit Care Med* 2012;40(6):1700-6.
- Zhong S, Zen Q, Tebo J, Schlottmann K, Coggeshall M, Mortensen RF. Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling. *J Immunol* 1998;161:2533.
- Zhu S, Ashok M, Li J, Li W, Yang H, Wang P, Tracey KJ, Sama AE, Wang H. Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers. *Mol Med* 2009;15:275-82.
- Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. Poly-saccharide part of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen. *Platelets* 2002;13:419-24.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2002;30:S294-301.
- Zimmerman H. Jaundice due to bacterial infection. *Gastroenterology* 1979;77:362-74.
- Zumla A. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2010;10(5):303-4.

## **Биографија**

Данка Соколовић је рођена 23. 09. 1976. године у Нишу. Основну школу и Гимназију "Светозар Марковић" завршила је са одличним успехом.

Медицински факултет, Универзитета у Нишу завршила је 2009. године, са општим успехом 8,43 у току студија и оценом 10 на дипломском испиту. Лекарски стаж обавила је у Клиничком центру Ниш, а затим и положила државни испит одличном оценом.

Специјалиста трансфузијске медицине, постала је 2020. године, полагањем специјалистичког испита на Медицинском факултету, Универзитета у Београду. Тренутно обавља функцију начелника Службе за обезбеђење и контролу квалитета и информациони систем у Заводиу за трансфузију крви Ниш. Данка Соколовић је члан Удружења трансфузиолога Србије, од 2011. године.

Данка Соколовић била је истраживач на пројекту Министарста просвете, науке и технолошког развоја (број: 43012), под називом "Мониторинг електромагнетног зрачења мобилних телекомуникационих система у животној средини, анализа молекуларних механизма и биомаркера оштећења код хроничне изложености са развојем модела за процену ризика и метода за заштиту", од 2013 до 2018. године.

До сада је објавила више од 15. научних радова, како у домаћим тако и у иностраним часописима.

Удата је и има сина.

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом: **Испитивање имуномодулаторних, антиоксидативних и антиапоптоличких ефеката мелатонина током ендотоксемије изазване липополисахаридом: експериментална студија,**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:



Данка М. Соколовић

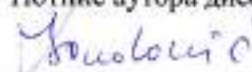
**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: **Испитивање имуномодулаторних, антиоксидативних и антиапоптоличких ефеката мелатонина током ендотоксемије изазване липополисахаридом: експериментална студија**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:



---

Данка М. Соколовић



## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом: **Испитивање имуномодулаторних, антиоксидативних и антиапоптогичких ефеката мелатонина током ендотоксемије изазване липополисахаридом: експериментална студија.**

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

**3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**

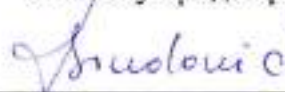
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:



Данка М. Соколовић