UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra A. Ružičić

EFEKTI PRETRETMANA MELDONIJUMOM NA LIPOPOLISAHARIDOM I FECESOM INDUKOVANU SEPSU KOD PACOVA

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra A. Ružičić

EFFECTS OF MELDONIUM PRETREATMENT ON LIPOPOLYSACCHARIDE- AND FECES-INDUCED SEPSIS IN RATS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentor:

dr Iva Lakić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

_____

Članovi komisije:

dr Jelena Đorđević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

_____

dr Siniša Đurašević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

_____

dr Zoran Todorović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

_____

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Od upisa doktorskih studija 2019. godine, bilo je nebrojeno momenata kada sam poželela da odustanem od rada na ovoj tezi. To je, nažalost, sastavni deo puta većine doktorskih kandidata. Ipak, ja sam imala sreću da na tom putu imam ljubav i podršku porodice, kao i da steknem prijatelje, koji su mi zajedno omogućili da u tom procesu istrajem.

Svim mojim koleginicama i kolegama sa Katedre za fiziologiju životinja i čoveka neizmerno sam zahvalna na prenetom znanju i pomoći. Dr Tamara Dakić, dr Iva Lakić, dr Tanja Jevđović, dr Predrag Vujović i Tijana Mašić su mi svakodnevno pružali podršku tokom rada na ovom doktoratu. Svi oni su mi pokazali šta znači biti čovek i u najizazovnijim momentima.

Mojoj mentorki, dr Ivi Lakić, koja najbolje razume koliko je bio izazovan ovaj doktorat, zahvaljujem na svom vremenu, trudu, znanju, strpljenju i prijateljstvu koje mi je pružila. Bez nje, ova teza ne bi ugledala svetlost dana.

Dr Siniši Đuraševiću, koji je inicirao eksperimente koji su rezultovali ovom tezom, hvala na konstantnoj podršci. Kao članu komisije, zajedno sa dr Jelenom Đorđević i dr Zoranom Todorovićem, hvala na svim savetima tokom izrade i uobličavanja teze.

Dr Slavici Borković Mitić i dr Slađanu Pavloviću iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, dr Dunji Drakulić, dr Ani Todorović i Katarini Bobić iz Insituta za nuklearne nauke Vinča, i dr Sanji Stanković iz Centra za medicinsku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu zahvaljujem na vremenu koje su mi posvetili tokom obrade i analize uzoraka, kao i na iskustvu i znanju koje su mi preneli u tom procesu.

Hvala mojim prijateljima koji su uvek bili tu da me podrže - Sanji, koja je još od dana osnovne škole tu da me sasluša, Anji koja bi mi ozarila ceo dan, Mini kao najdražem saborcu na doktorskim studijama, Pavlu i Nenadu koji su mi doturali kafu i gricke dok mi se nije pisala teza. Mom Miodragu, hvala što mi je vratio želju za stvaranjem.

Hvala i svim divnim, maštovitim i hrabrim ljudima koje je nemoguće sve pobrojati, a koje sam upoznala na treninzima ronjenja na dah, sportskog penjanja, na planinarenjima i učeći italijanski jezik. Na sebi svojstven način su me inspirisali i pomogli da se ova teza uobliči.

Večnu zahvalnost i ljubav nosim za svoju porodicu - nanu Milicu, dedu Nedeljka, sestru Žanu, sestričinu Marlenu Rosanu, majku Radicu i oca Aca. Od upisa doktorata,

odlazak u Lipovicu kod roditelja i naše Borkić mi je sigurna luka.

Porodica me je naučila šta znači bezuslovno voleti, biti istrajan u radu na sebi i u tome ostati čovek, i nadam se da to znanje prenosim dalje.

mama i tata,

ovu tezu posvećujem vama

Efekti pretretmana meldonijumom na lipopolisaharidom i fecesom indukovanu sepsu kod pacova

Sažetak

Sepsa je stanje opasno po život za koje i dalje ne postoji adekvatna terapija. Posledica je maladaptivnog imunskog odgovora, uz poremećaj energetskog metabolizma kao jedan od patofizioloških mehanizama u osnovi njenog razvoja. Meldonijum, aktivna komponenta leka Mildronate®, inhibira karnitin-zavisnu komponentu oksidacije masnih kiselina, favorizujući iskorišćavanje glukoze. Ova metabolička modulacija pokazala se korisnom u lečenju ishemičnih stanja srca i mozga, kao i u različitim invazivnim animalnim modelima, dok efekat meldonijuma u sepsi nije sistematski ispitan.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispitaju efekti četvoronedeljnog oralnog pretretmana meldonijumom (300 mg/kg t.m./dan) u dva pacovska modela sepse: endotoksemiji indukovanoj lipopolisaharidomom (LPS model) i polimikrobnoj sepsi indukovanoj intraperitonealnom injekcijom suspenzije fecesa (FIP model). Devet sati nakon indukcije sepse praćeni su preživljavanje, telesna temperatura i refleksna funkcija pacova, a zatim su izolovani krv, jetra, bubrezi, srca, pluća, nadbubrežne žlezde, mali mozak, produžena moždina i prefrontalni korteks radi analize histopatoloških promena, kao i različitih markera oksidativnog stresa, inflamacije, apoptoze i izmena energetskog metabolizma.

Uočena povoljna dejstva meldonijuma bila su izrazito model- i organ-specifična. U LPS modelu sepse, njegovi antioksidativni i antiinflamatorni efekti bili su konzistentnije izraženi po organima. U oba modela sepse, pretretman meldonijumom bio je praćen pogoršanjem histoloških oštećenja u srcu. Prefrontalni korteks se izdvojio kao moždani region posebno osetljiv na sepsom indukovana oštećenja, kao i po slabijem odgovoru na meldonijum. Ključni rezultat ove disertacije jeste da je pretretman meldonijumom povećao smrtnost pacova u FIP sepsi. Ovo se potencijalno može pripisati kombinovanom efektu brže metaboličke dekompenzacije u ovom modelu i smanjenja metaboličke fleksibilnosti pod dejstvom meldonijuma. Sa druge strane, pretpostavka je da je u LPS modelu očuvana aktivacija simpatoadrenalno-medularnog sistema rezultovala povoljnijim tokom sepse. Ovi rezultati ukazuju da je izbor eksperimentalnog modela ključan faktor u ispitivanju mogućnosti prenamene metaboličkih modulatora, kao što je meldonijum.

Ključne reči: sepsa; meldonijum; endotoksemija; lipopolisaharid (LPS); polimikrobna sepsa; oksidativni stres; inflamacija; apoptoza; energetski metabolizam

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Animalna i humana fiziologija

Effects of meldonium pretreatment on lipopolysaccharide- and feces-induced sepsis in rats

Abstract

Sepsis is a life-threatening condition for which no adequate targeted therapy exists. It results from a maladaptive immune response, with disturbances in energy metabolism as one of its underlying pathophysiological mechanisms. Meldonium, the active component of Mildronate®, inhibits the carnitine-dependent component of fatty acid oxidation, thereby favoring glucose utilization. This metabolic modulation has proven beneficial in the treatment of ischemic conditions of the heart and brain, as well as in various invasive animal models, whereas the effects of meldonium in sepsis have not been systematically investigated.

The aim of this doctoral dissertation was to examine the effects of a four-week oral pretreatment with meldonium (300 mg/kg body weight/day) in two rat models of sepsis: lipopolysaccharide-induced endotoxemia (LPS model) and polymicrobial sepsis induced by intraperitoneal injection of a fecal suspension (FIP model). Nine hours after sepsis induction, survival, body temperature, and reflex function were assessed. Subsequently, blood, liver, kidneys, heart, lungs, adrenal glands, cerebellum, medulla oblongata, and prefrontal cortex were collected for the analysis of histopathological alterations, as well as markers of oxidative stress, inflammation, apoptosis, and disturbances in energy metabolism.

The beneficial effects of meldonium were highly model- and organ-specific. In the LPS model of sepsis, its antioxidant and anti-inflammatory effects were more consistently expressed across organs. In both models, meldonium pretreatment was associated with worsening of histological damage in the heart. The prefrontal cortex was found to be particularly vulnerable to sepsis-induced injury and exhibited a weaker response to meldonium. The key finding of this dissertation is that meldonium pretreatment increased mortality in rats with FIP-induced sepsis. This effect may be attributed to the combined impact of more rapid metabolic decompensation inherent to this model and a reduction in metabolic flexibility induced by meldonium. In contrast, a more preserved activation of the sympathoadrenomedullary system in the LPS model contributed to a more favorable course of sepsis. These results indicate the selection of an experimental model as a key factor in investigating the repurposing potential of metabolic modulators such as meldonium.

Keywords: sepsis; meldonium; endotoxemia; lipopolysaccharide (LPS); polymicrobial sepsis; oxidative stress; inflammation; apoptosis; energy metabolism

Scientific area: Biology

Narrow scientific field: Animal and human physiology

SPISAK SKRAĆENICA

Acetil-CoA	acetil-koenzim A
Acil-CoA	acil-koenzim A
ACS	acetil-CoA sintetaza
AD	Alchajmerova bolest (eng. *Alzheimer's disease*, AD)
AgCl	srebro hlorid
ALI	akutna povreda pluća (eng. *acute lung injury*)
ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin aminotransferaza
AMP	adenozin monofosfat
ANOVA	analiza varijansa (eng. *analysis of variance*)
AOPP	proizvodi uznapredovale oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*)
AOS	antioksidativni sistem
APAF1	apoptotski faktor aktivacije proteaza 1 (eng. *apoptotic protease-activating factor 1*)
APP	akutnofazni proteini (eng. *acute-phase proteins*)
ARE	eng. *antioxidant response element*
ARDS	akutni respiratorni distres sindrom (eng. *acute respiratory distress syndrome*)
AST	aspartat aminotransferaza
ATP	adenozin-trifosfat
AUC	površina ispod krive (eng. *area under curve*)
Bak	Bcl-2 antagonist/ubica 1 (eng. *Bcl-2 antagonist/killer 1*)
Bax	Bcl-2-asocirani X protein (eng. *Bcl-2–associated X protein*)
Bcl-2	B-ćelijski limfom 2 (eng. *B-cell lymphoma 2*)
Bid	eng. *BH3-interacting domain death agonist*
CA	lat. *cornu ammonis*
CACT	karnitin-acilkarnitin-translokaza
CAP	holinergička antiinflamatorna putanja (eng. *cholinergic anti-inflammatory pathway*)
CAT	katalaza
CD	klaster diferencijacije (eng. *cluster of differentiation*)
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzen
CH_3COONa	natrijum acetat
CLP	podvezivanje i perforiranje cekuma (eng. *cecal ligation and perforation*)
CNS	centralni nervni sistem
CPT1	karnitin-palmitoiltransferaza 1

CrAT	karnitin-acetiltransferaza
cTnT	kardijačni troponin T (eng. *cardiac troponin T*)
$CuSO_4$	bakar sulfat
DAMPs	molekulski obrasci povezani sa opasnošću (eng. *danger–associated molecular patterns*)
DAG	diacilglicerol
ddH_2O	dejonizovana voda
DG	dentatni girus
DHA	dokozaheksaenska kiselina
DISC	signalni kompleks koji indukuje smrt (eng. *death-inducing signaling complex*)
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DrotAA	drotrekogin alfa
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina)
eATP	ekstracelularni ATP
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EGTA	etilen-glikol-bis(β-aminoetil-etar)-N,N,N',N'-tetrasirćetna kiselina
ELISA	enzimski imunoadsorbentni test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
EMA	Evropska agencija za lekove (eng. *European medicines agency*)
ET	endotoksinska tolerancija
Fas	prvi signal apoptoze (eng. *first apoptosis signal*)
FDA	Američka uprava za hranu i lekove (eng. *U.S. Food and drug administration*)
FIP	fecesom indukovan peritonitis
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GC-MS	gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom
GCS	Glasgow koma skala (eng. Glasgow coma scale)
G-CSF	faktor stimulacije kolonija granulocita (eng. *granulocyte-colony-stimulating factor*)
GDNF	glijski neurotrofni faktor (eng. *glial cell line-derived neurotrophic factor*)
GFR	stopa glomerularne filtracije (eng. *glomerular filtration rate*)
GLUT	glukozni transporter (eng. *glucose transporter*)
GR	glutation reduktaza
GSH/GSSG	odnos nivoa redukovane i oksidovane forme glutationa
GSH-Px	glutation peroksidaza
GST	glutation S-transferaza
GTP	guanozin-5'-trifosfat
Hb	hemoglobin
$HclO_4$	perhlorna kiselina

HE	hematoksilin-eozin
HIV	virus humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus*)
HMGB1	protein visoke pokretljivosti grupe 1 (eng. *high mobility group box protein 1*)
HNF4α	jedarni faktor hepatocita 4α (eng. *hepatocyte nuclear factor 4α*)
HO-1	hem oksigenaza-1
HO_2•	hidroperoksil radikal
HOCl	hipohlorasta kiselina
H_2O_2	vodonik-peroksid
Hp	haptoglobin
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *high-pressure liquid chromatography*)
HRP	peroksidaza rena (eng. *horseradish peroxidase*)
Hsp70	protein toplotnog šoka 70 (eng. *heat shock protein 70*)
IL	interleukin
IκB	inhibitor nuklearnog faktora κB
iNOS	inducibilna NO sintaza
i.p.	intraperitonealno
kat. br.	kataloški broj
K_2HPO_4	kalijum hidrogenfosfat
KMB	krvno-moždana barijera
KOH	kalijum hidroksid
LOO•	lipidni peroksil radikal
LOOH	lipidni hidroperoksid
LPC	lizofosfatidilholin
LPO	lipidna peroksidacija
LPS	lipopolisaharid
MALDI-TOF	masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa (eng. *matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight*)
MCP-1	monocitni hemotaktički protein-1 (eng. *monocytic chemotactic protein-1*)
M-CSF	faktor stimulacije kolonija makrofaga (eng. *macrophage-colony-stimulating factor*)
$MgCl_2$	magnezijum hlorid
MDA	malondialdehid
MD-2	faktor diferencijacije mijeloidnih ćelija-2 (eng. myeloid differentiation factor-2)
MODS	sindrom multiple organske disfunkcije (eng. *multiple organ dysfunction syndrome*)
MPO	medijalno preoptičko jedro
mtDNK	mitohondrijska DNK

MUFAs	mononezasićene masne kiseline (eng. *monounsaturated fatty acids*)
MyD88	eng. *myeloid differentiation primary response 88*
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
$NADP^+$	oksidovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaCl	natrijum hlorid
NaCN	natrijum cijanid
Na_2CO_3	natrijum karbonat
NaOH	natrijum hidroksid
NCAM	adhezioni molekul neurona (eng. *neural cell adhesion molecule*)
NFκB	jedarni faktor κB (eng. *nuclear factor kappa B*)
NH_4HCO_2	amonijum formijat
NO	azot monoksid
Nrf2	jedarni eritroidni faktor 2 (eng. *nuclear factor erythroid 2*)
NSE	neuron-specifična enolaza (eng. *neuron-specific enolase*)
O_2^-•	superoksid anjon
•OH	hidroksilni radikal
$^1O_2$	singlet kiseonik
O_3	ozon
OCFAs	masne kiseline sa neparnim brojem C-atoma (eng. *odd-chain fatty acids*)
OCTN2	transporter organskih katjona/karnitina 2 (eng. *organic cation/carnitine transporter 2*)
PAB	prooksidativni-antioksidativni balans (eng. *prooxidative-antioxidative balance*)
PAMPs	molekulski obrasci patogena (eng. *pathogen–associated molecular patterns*)
PaO_2/FiO_2	odnos arterijskog parcijalnog pritiska kiseonika i inspiratorne frakcije kiseonika
PAS	bojenje perjodnom kiselinom i Šifovim reagensom
PC	fosfatidilholin
PC/LPC	odnos nivoa fosfatidilholina i lizofosfatidilholina
PCO	proteinski karbonili
PD	Parkinsonova bolest (eng. *Parkinson's disease*, PD)
PDC	kompleks piruvat dehidrogenaze (eng. *pyruvate dehydrogenase complex*)
PDK	kinaza PDC
PGC1-α	koaktivator 1-α PPAR-γ (eng. *PPARγ coactivator 1-α*)
PGK1	fosfoglicerat-kinaza 1
Pi	neorganski fosfat
PLA2	fosfolipaza A2
p-NFκB p65	fosforilisana p65 subjedinica jedarnog faktora κB
PPAR-α	receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma-α (eng. *peroxisome proliferator-activated*

	receptor-α)
PUFAs	polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*)
P2X7	eng. *purinergic P2X receptor subtype 7*
Rac1	Ras-srodni C3 supstrat botulinum toksina 1 (eng. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)
RAGE	receptor za krajnje proizvode glikacije (eng. *receptor for advanced glycation endproducts*)
RO•	alkoksil radikal
RO_2•	peroksil radikal
ROS	reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*)
ROOH	organski peroksid
ROUT	test robustne regresije i uklanjanja autlajera (eng. *robust regression and outlier removal test*)
SAE	encefalitis povezan sa sepsom (eng. *sepsis-associated encephatilis*)
S-AKI	akutno oštećenje bubrega povezano sa sepsom (eng. *sepsis-associated acute kidney injury*)
S-ALI	sepsom-indukovano akutno oštećenje pluća (eng. *sepsis-induced acute lung injury*)
SAM	simpatoadrenalno-medularni
SCD1	stearoil-CoA desaturaza 1 (eng. *stearoyl-CoA desaturase 1*)
SDS	natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza
SEM	standardna greška srednje vrednosti (eng. *standard error of mean*)
SFAs	zasićene masne kiseline (eng. *saturated fatty acids*)
SIMD	sepsom-indukovana disfunkcija miokarda (eng. *sepsis-induced myocardial dysfunction*)
SILI	sepsom-indukovano oštećenje jetre (eng. *sepsis-induced liver injury*)
SMK	slobodne masne kiseline
SOD	superoksid dismutaza
SOFA	procena otkazivanja organa povezanog sa sepsom (eng. *sepsis-related organ failure assessment*)
SVZ	subventrikularna zona lateralnih moždanih komora
TAC	snižen ukupni antioksidativni kapacitet (eng. *total antioxidant capacity*)
TBA	tiobarbituratna kiselina
TBST	Tris-puferisani fiziološki rastvor sa Tween-20 deterdžentom
TG	trigliceridi
TGF-β	transformišući faktor rasta-β (eng. *transforming growth factor-β*)
TLR	membranski receptori slični Toll-u (eng. *toll-like receptors*)
t.m.	telesna masa

TNB	2-nitro-5-tiobenzoična kiselina
TNF	faktor nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor*)
TNFR1	TNF receptor 1 (eng. *TNF receptor 1*)
TOS	ukupni oksidativni status (eng. *total oxidative status*)
TPM	traumatska povreda mozga
TRAP1	protein asociran sa TNF receptorom 1 (eng. *TNF receptor-associated protein 1*)
VCAM-1	molekul vaskularne ćelijske adhezije-1 (eng. *vascular cell adhesion molecule-1*)
Vegfa	eng. *vascular endothelial growth factor*
Vim	vimentin
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World health organisation*)

SADRŽAJ

1. UVOD **1**
1.1. Definicija sepse i epidemiološki značaj ... 1
1.2. Sepsa kao multisistemski poremećaj ... 2
1.3. Procesi uključeni u razvoj, progresiju i terminaciju sepse ... 4
1.3.1. Inflamacija ... 4
1.3.2. Apoptoza ... 8
1.3.3. Oksidativni stres ... 10
1.3.4. Izmene energetskog metabolizma ... 12
1.4. Eksperimentalni modeli sepse ... 18
1.5. Meldonijum ... 21
1.5.1. Biohemijski mehanizmi u osnovi dejstva meldonijuma ... 21
1.5.2. Značaj L-karnitina i metabolički efekti meldonijuma ... 21
1.5.3. Efekti meldonijuma u animalnim modelima i kliničkim studijama ... 23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA **29**
3. MATERIJALI I METODE **30**
3.1. Eksperimentalne životinje ... 30
3.2. Eksperimentalni dizajn ... 30
3.2.1. FIP model sepse ... 31
3.2.2. LPS model sepse ... 32
3.3. Monitoring pacova po izazivanju sepse i prikupljanje tkiva za analizu ... 32
3.4. Histološka analiza ... 33
3.4.1. Histološko bojenje preseka jetre, bubrega, srca i pluća hematoksilin-eozinom (HE) i perjodnom kiselinom-Šifovim reagensom (PAS) ... 33
3.4.2. Prinicip histološke procene oštećenja jetre, bubrega, srca i pluća ... 34
3.5. Biohemijske analize ... 34
3.5.1. Određivanje koncentracije glukoze, triglicerida (TG) i ukupnih slobodnih masnih kiselina (SMK) u serumu pacova ... 34
3.5.2. Određivanje aktivnosti enzima jetre, koncentracije kardijačnog troponina T (cTnT), uree i kreatinina u serumu pacova ... 35
3.5.3. Određivanje markera oksidativnog stresa ... 35
3.5.4. Određivanje aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze (CD73) ... 39
3.6. Hromatografske analize ... 39
3.6.1. Postupak pripreme uzorka ... 39
3.6.2. Određivanje koncentracije L-karnitina ... 40
3.6.3. Određivanje koncentracije glukoze, glicerola i laktata ... 41
3.6.4. Određivanje koncentracije adrenalina i noradrenalina ... 42
3.6.5. Određivanje koncentracije triglicerida (TG) ... 42
3.6.6. Određivanje masnokiselinskog profila ... 43
3.7. Maseno-spektrometrijske analize ... 43
3.8. Molekularno-biološke analize ... 44
3.8.1. Izolacija ukupnih proteina ... 44
3.8.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina ... 44
3.8.3. Western blot analiza ... 45
3.8.4. Enzimski imunoadsorbentni test (ELISA) ... 47

3.9. Statistička analiza podataka 48
4. REZULTATI **49**
4.1. Uticaj pretretmana meldonijumom na preživljavanje pacova u FIP i LPS modelima sepse 49
4.2. Uticaj pretretmana meldonijumom na telesnu temperaturu pacova u FIP i LPS modelima sepse . 50
4.3. Uticaj pretretmana meldonijumom na očuvanost refleksa kod septičnih pacova 50
4.4. Uticaj pretretmana meldonijumom na markere oštećenja jetre, srca i bubrega u serumu septičnih pacova 51
4.5. Uticaj pretretmana meldonijumom na sadržaj vode u mozgu i plućima septičnih pacova 53
4.6. Uticaj pretretmana meldonijumom na histološke pokazatelja oštećenja jetre, bubrega, srca i pluća septičnih pacova 54
4.7. Uticaj pretretmana meldonijumom na markere oksidativnog stresa kod septičnih pacova 58
4.8. Uticaj pretretmana meldonijumom na proteinsku ekspresiju proinflamatornih markera kod septičnih pacova 65
4.9. Uticaj pretretmana meldonijumom na odnos nivoa proteina Bax i Bcl-2 kod septičnih pacova 73
4.10. Uticaj pretretmana meldonijumom na koncentraciju kateholamina u nadbubrežnim žlezdama i serumu septičnih pacova 75
4.11. Uticaj pretretmana meldonijumom na koncentraciju glukoze i laktata u tkivima septičnih pacova 76
4.12. Uticaj pretretmana meldonijumom na koncentraciju L-karnitina u jetri, bubrezima i srcu septičnih pacova 78
4.13. Uticaj pretretmana meldonijumom na lipidni status u tkivima septičnih pacova 79
4.14. Uticaj pretretmana meldonijumom na ekspresiju PGC-1α/β kod septičnih pacova 81
4.15. Uticaj pretretmana meldonijumom na aktivnost ekto-5'-nukleotidaze (CD73) u moždanim regionima septičnih pacova 83
4.16. Uticaj pretretmana meldonijumom na odnos intenziteta pikova PC i LPC u malom mozgu, produženoj moždini i prefrontalnom korteksu septičnih pacova 84
5. DISKUSIJA **88**
6. ZAKLJUČCI **115**
LITERATURA **117**
PRILOZI **140**

1. UVOD

1.1. Definicija sepse i epidemiološki značaj

Sepsa je stanje opasno po život koje nastaje usled neadekvatnog imunskog odgovora organizma na infekciju i praćeno je oštećenjem sopstvenih tkiva [1]. Ukoliko se ne uoči i ne leči na vreme, neminovno dovodi do otkazivanja organa i smrti [1]. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World health organisation*, WHO), 20% svih smrtnih slučajeva na godišnjem nivou, posledica je sepse [2]. Prema najnovijoj studiji o globalnom opterećenju bolestima (eng. *global burden of disease study*), incidenca sepse na svetskom nivou smanjena je za 37% u periodu od 1990. do 2017. godine [2]. Ipak, samo u 2017. godini zabeleženo je 48,9 miliona slučajeva sepse, odnosno 11 miliona smrtnih slučajeva u kojima je sepsa identifikovana kao uzrok [2]. Metaanalize na globalnom nivou pokazuju da, uprkos bolničkom lečenju, približno svaki četvrti pacijent oboleo od sepse ne preživi [3]. Stope smrtnosti su naročito visoke u nerazvijenim zemljama; na primer, studija iz 2021. godine pokazala je da je smrtnost hospitalizovanih pacijenata sa sepsom u Ruandi iznosila 51,4% [4].

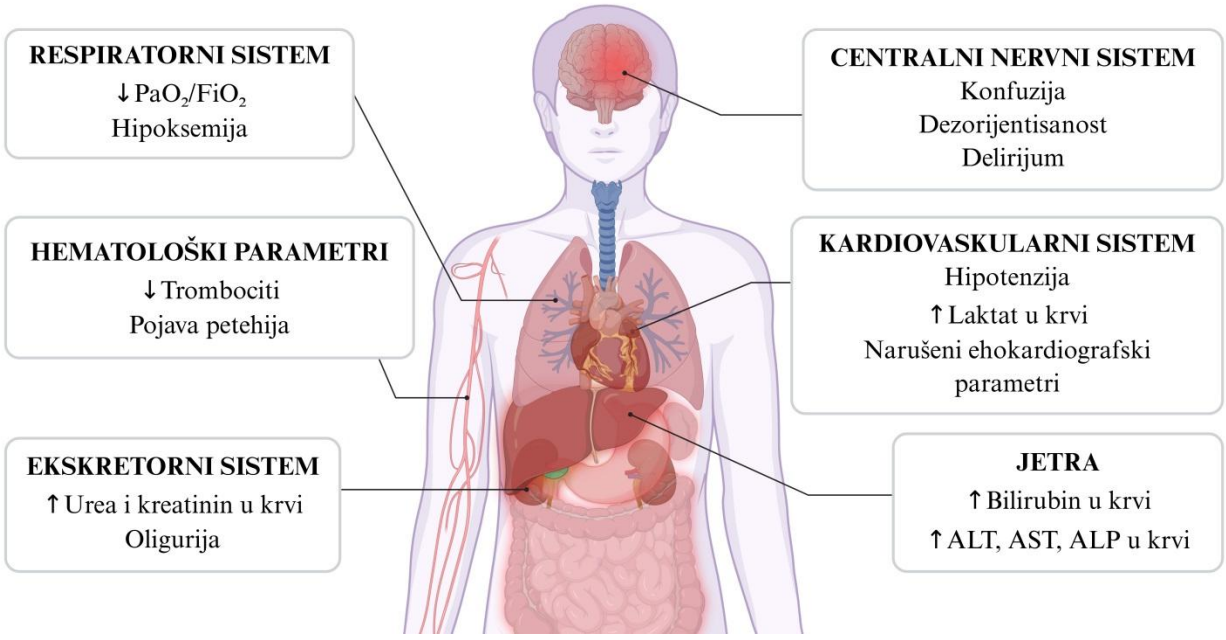
U razvijenim zemljama sepsa se najčešće dovodi u vezu sa bolnički stečenim infekcijama i invazivnim medicinskim procedurama, dok se zemljama sa niskim i srednjim prihodima ona dominantno javlja kao komplikacija malarije, upale pluća i infekcije HIV virusom (eng. *human immunodeficiency virus*, HIV) [3,5]. U nerazvijenim zemljama, neadekvatni sanitarni uslovi i ograničen pristup zdravstvenoj zaštiti značajno doprinose visokoj incidenci sepse i povećanoj stopi smrtnosti [5].

Epidemiološki podaci o sepsi u Republici Srbiji su oskudni i potiču od retrospektivnih analiza u okviru pojedinačnih zdravstvenih ustanova, bez objedinjavanja podataka na nacionalnom nivou [6–9]. U trenutku izrade ove disertacije, najnoviji Zdravstveno-statistički godišnjak Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, nije obuhvatao epidemiološke podatke o sepsi [10]. U studiji sprovedenoj 2013. godine, grupa autora iz Novog Sada je pokazala da je u periodu od 2004. do 2012. godine 2,2% svih pacijenata primljenih na urgentno lečenje u Kliničkom centru Vojvodine imalo dijagnozu sepse, uz stopu smrtnosti od 42% [7]. Autori navode da je čak 89% septičnih pacijenata bilo muškog pola [7], što je u skladu sa trendom uočenim na globalnom nivou [11]. Uzelac i sar. su prijavili da je na teritoriji Beograda, u periodu od 2007. do 2017. godine, registrovano 682 slučaja sepse, od kojih je 136

završeno smrtnim ishodom [9]. Ova grupa autora takođe ističe da je sepsa češće dijagnostikovana kod muškaraca, kao i kod osoba starijih od 70 godina [9]. U periodu od januara do juna 2023. godine, stopa smrtnosti septičnih pacijenata primljenih na urgentno lečenje u Univerzitetskom kliničkom centru Srbije u Beogradu iznosila je 55%, pri čemu je kod gotovo trećine preminulih smrt nastupila već u prva 24 sata od prijema [6]. Prema podacima Instituta za neonatologiju u Beogradu, u periodu od 2013. do 2015. godine zabeležena je stopa smrtnosti od 37,5% kod novorođenčadi sa ranom neonatalnom sepsom [8].

1.2. Sepsa kao multisistemski poremećaj

Prema podacima iz pojedinih studija, u kliničkoj praksi je kod gotovo 80% sa sepsom narušena funkcija više od jednog sistema organa (**Slika 1**) [12]. Kao najranije klinički uočljive manifestacije sepse najčešće se registruju respiratorna disfunkcija i hemodinamska nestabilnost [12]. U najtežim slučajevima dolazi do progresije u sindrom multiple organske disfunkcije (eng. *multiple organ dysfunction syndrome*, MODS), pri čemu stopa smrtnosti raste sa brojem zahvaćenih organa [13,14]. Prema jednoj retrospektivnoj studiji, bolnička smrtnost u kohorti septičnih pacijenata sa insuficijencijom četiri ili više organa, iznosila je 88% [13].



Slika 1. Pregled vitalnih funkcija narušenih u sepsi koje se procenjuju SOFA skorom. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. Slika je preuzeta iz preglednog rada Lelubre i sar. [15] i prilagođena korišćenjem alata BioRender.

Sa ciljem kvantitativne i objektivne procene disfunkcije organa, pre više od 30 godina uvedena je skala za procenu otkazivanja organa povezanog sa sepsom, poznata kao SOFA skor (eng. *sepsis-related organ failure assessment*, SOFA) [16]. SOFA skorom se procenjuje očuvanost šest različitih vitalnih funkcija (**Slika 1**) [16]. Respiratorna funkcija se vrednuje odnosom parcijalnog pritiska kiseonika u arterijskoj krvi i inspiratorne frakcije kiseonika (PaO_2/FiO_2), uzimajući u obzir potrebu za mehaničkom ventilacijom kod pacijenata u težem kliničkom stanju [16]. Kardiovaskularna funkcija se procenjuje na osnovu srednjeg arterijskog pritiska, koji se reguliše primenom vazopresora [16]. Koagulacioni status se procenjuje brojem trombocita i merenjem protrombinskog vremena [16], dok se funkcija centralnog nervnog sistema (CNS) procenjuje Glasgow koma skalom (eng. *Glasgow coma scale*, GCS). Prema GCS, potpuna očuvanost funkcije CNS-a podrazumeva da je pacijent budan i orijentisan, da adekvatno reaguje na spoljašnje nadražaje, bez smetnji u rasuđivanju ili pamćenju [16]. Funkcija jetre se procenjuje na osnovu koncentracije bilirubina u krvi, dok se bubrežna funkcija vrednuje koncentracijom kreatinina, a u težim slučajevima se uzima obzir i dnevna zapremina izlučenog urina [16].

Svaka od šest komponenti SOFA skora boduje se ocenom od 0 do 4, pri čemu skor 0 ukazuje na potpuno očuvanu funkciju, dok skor 4 ukazuje na otkazivanje organa [16]. Pojedinačne vrednosti se sabiraju u ukupan SOFA skor koji je prepoznat kao pouzdan prognostički pokazatelj ishoda bolesti [17]. Nezavisno od početne vrednosti SOFA skora u trenutku prijema u jedinicu intenzivne nege, njegovo povećanje tokom narednih 48 sati predviđa stopu smrtnosti od najmanje 50% [17].

Pojedine grupe autora su predložile reviziju postojećeg SOFA skora kroz proširivanje seta parametara za njegovu procenu (**Slika 1**) [18]. Među predloženim dodatnim parametrima nalaze se merenja nivoa alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST) i alkalne fosfataze (ALP) u serumu, enzima koji dospevaju u cirkulaciju usled oštećenja hepatocita [19]. Dodatno, predloženo je praćenje i koncentracije laktata u krvi, jer je pokazano da hiperlaktatemija koreliše sa višom stopom mortaliteta u sepsi [20].

Razvijene su i modifikacije kliničkog SOFA skora sa ciljem primene u animalnim studijama sepse. Kako merenje respiratorne funkcije i hemodinamskih parametara zahteva specijalizovanu aparaturu, ovi sistemi ocenjivanja kod glodara najčešće se zasnivaju na praćenju standardnih biohemijskih parametara i proceni očuvanosti neurološke funkcije [21–23].

1.3. Procesi uključeni u razvoj, progresiju i terminaciju sepse

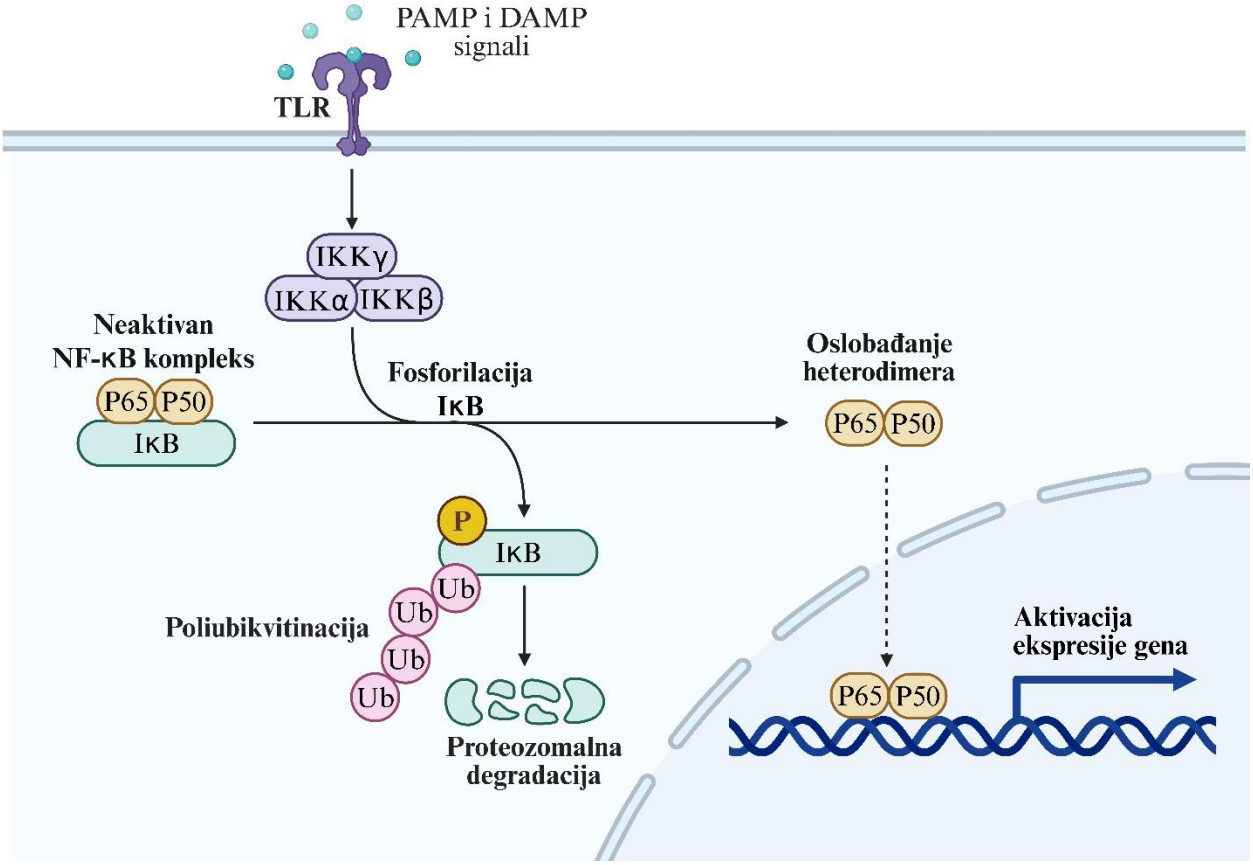
Patofiziološki procesi koji se nalaze u osnovi razvoja i progresije sepse su izuzetno raznovrsni [24]. Cilj ovog poglavlja jeste da pruži kratak pregled ključnih mehanizama koji su od značaja za razumevanje tokova sepse, a time i da obrazloži izbor parametara koji su analizirani u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije.

1.3.1. Inflamacija

Inflamacija je odgovor organizma na infekciju ili povredu i podrazumeva aktivaciju imunskog sistema sa ciljem eliminacije štetnog agensa i obnove homeostaze. U sepsi, pak, burna sistemska inflamacija predstavlja patofiziološki proces koji dovodi do oštećenja tkiva i u kratkom vremenskom roku može rezultovati otkazivanjem organa. U medijatore odgovora organizma na infekciju spadaju citokini, velika grupa proteina male molekulske mase (8–26 kDa) sa ulogom u međućelijskoj komunikaciji [25]. Njih pretežno sintetišu makrofagi i T-pomoćne ćelije (sin. CD4+ T-limfociti) [25]. Uobičajena klasifikacija citokina zasniva se na njihovoj funkciji i deli ih na proinflamatorne, koji pokreću i pojačavaju inflamaciju, i antiinflamatorne, koji je ograničavaju i pospešuju obnovu tkiva [26]. U proinflamatorne citokine spadaju interleukin-6 (eng. *interleukin-6*, IL-6), interleukin-1β (IL-1β), faktor nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor*, TNF), interleukin-8 (IL-8) i monocitni hemotaktički protein-1 (eng. *monocytic chemotactic protein-1*, MCP-1), dok se među antiinflamatorne citokine ubrajaju transformišući faktor rasta-β (eng. *transforming growth factor-β*, TGF-β), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) i interleukin-13 (IL-13) [26]. Ipak, važno je istaći da pojedini citokini imaju dualnu funkciju i da, zavisno od faze bolesti i prisustva drugih signalnih molekula, mogu delovati i proinflamatorno i antiinflamatorno [27].

Produkciju proinflamatornih citokina pokreće jedarni faktor κB (eng. *nuclear factor kappa B*, NFκB), transkripcioni faktor koji predstavlja heterodimerni kompleks proteinskih subjedinica p65 i p50 [28]. U neaktivnoj formi, ovaj kompleks se nalazi u citoplazmi vezan za inhibitor jedarnog faktora κB (IκB) (**Slika 2**). Najbolje okarakterisan put aktivacije NFκB označava se kao kanonski, a među najznačajnijim stimulusima koji ga pokreću su molekulski obrasci patogena (eng. *pathogen–associated molecular patterns*, PAMPs) i molekulski obrasci povezani sa opasnošću (eng. *danger-associated molecular patterns*, DAMPs), koje prepoznaju membranski receptori slični Toll-u (eng. *toll-like receptors*, TLR) [28,29]. U PAMP signale

spada lipopolisaharid (LPS), komponenta ćelijskog zida Gram negativnih bakterija, koji se veže za TLR4 (sin. CD284; eng. *cluster of differentiation 284*) posredstvom adapternog proteina MD-2 (eng. *myeloid differentiation factor-2*, MD-2). Sledstveno formiranje kompleksa LPS/MD-2/TLR4 pokreće unutarćelijsku signalizaciju koja rezultuje fosforilacijom IκB, njegovim označavanjem za poliubikvitinaciju i proteazomalnu degradaciju [28]. To dovodi do oslobađanja p65:p50 heterodimera koji se potom translocira u jedro gde pokreće ekspresiju preko 150 gena



Slika 2. Shematski prikaz aktivacije ekspresije gena posredstvom transkripcionog faktora NFκB, u odgovoru na PAMP i DAMP signale. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. Slika je kreirana korišćenjem alata BioRender.

uključenih u inflamatorni odgovor (**Slika 2**). To su geni za proinflamatorne citokine, molekule za prezentovanje antigena i receptore koji omogućavaju adheziju i dijapedezu neutrofila [30]. Fosforilacija p65 subjedinice (p-NFκB p65) olakšava interakciju heterodimera sa koaktivatorima transkripcije, pa ova posttranslaciona modifikacija predstavlja važan mehanizam regulacije njegove transkripcione potentnosti [31,32].

Citokini deluju autokrino na ćelije koje ih izlučuju, parakrino na susedne ćelije, ali i na udaljene ćelije do kojih dospevaju putem krvi. Ciljne ćelije na koje citokini ostvaruju dejstvo migriraju ka mestu infekcije, ali se istovremeno aktiviraju da same sintetišu i oslobađaju nove citokine, što se označava kao "citokinska kaskada" [33]. U sepsi, povećana produkcija proinflamatornih citokina može dovesti do tzv. „citokinske oluje" koja nastaje kao posledica pozitivne povratne sprege između citokina i ciljnih ćelija što rezultuje preteranom aktivacijom imunskih ćelija [25,34,35]. Na taj način, fiziološki procesi čija je svrha odbrana organizma od infekcije, uzrokuju oštećenja tkiva i time sami postaju štetni po organizam. Više studija je pokazalo da smanjenje inflamatornog odgovora supresijom NFκB signalnog puta ima protektivno dejstvo u uslovima sepse [36–38].

Protein visoke pokretljivosti grupe 1 (eng. *high mobility group box protein 1*, HMGB1) je izuzetno potentan DAMP signal, odnosno snažan medijator inflamacije [39]. Ovaj ne-histonski protein je u jedru vezan za hromatin, čineći DNK sekvencu dostupnom za vezivanje različitih regulatora ekspresije gena [40]. U određenim patološkim uslovima, dolazi do sekrecije HMGB1 koja može biti pasivna i aktivna [40]. HMGB1 je za hromatin vezan slabim vezama i narušavanjem integriteta ćelijske membrane usled nekroze ili drugih vrsta oštećenja, pasivno se oslobađa iz svih ćelija [41,42]. Aktivnu sekreciju vrše prvenstveno makrofagi i hepatociti i ona zahteva posttranslacione modifikacije koje omogućavaju translokaciju HMGB1 iz jedra u citoplazmu [43]. Za aktivnu sekreciju HMGB1 potrebna su dva signala. Primarni signal je npr. LPS, koji dovodi do acetilacije ili fosforilacije HMGB1 [39], čime se omogućava njegova translokacija u citoplazmu gde se nakuplja u sekretornim vezikulama [43]. Konačno, za sekreciju je neophodno prisustvo vanćelijskog lizofosfatidilholina (LPC) kao sekundarnog signala koji je prisutan kasnije u inflamaciji [44], usled čega i HMGB1 predstavlja njen kasni marker [45].

Po oslobađanju iz ćelije, HMGB1 funkcioniše kao proinflamatorni citokin i vezuje se za nekoliko membranskih receptora, pre svega TLR2 i 4, kao i za receptor za krajnje proizvode glikacije (eng. *receptor for advanced glycation endproducts*, RAGE). Vezivanjem za TLR receptore, HMGB1 pokreće signalnu kaskadu, aktivira NFκB kompleks i sintezu proinflamatornih citokina na ranije opisan način. Ako se, pak, veže za RAGE receptor, dolazi do endocitoze HMGB1-RAGE kompleksa, destabilizacije endolizozomalne membrane i pokretanja piroptoze – kaspazom-1 posredovanog tipa programirane ćelijske smrti [46]. Nju karakterišu razaranje ćelijske membrane, fragmentacija DNK i oslobađanje unutarćelijskog sadržaja čime se

pojačava inflamatorni odgovor [46]. Interesantno je istaći da funkcionalnost HMGB1 proteina zavisi od stepena redukovanosti njegovih cisteinskih ostataka. Naime, potpuno redukovana forma poseduje hemotaktična svojstva; delimično redukovana forma HMGB1 sa očuvanim Cys23-Cys45 disulfidnim mostom predstavlja najpotentniji DAMP koji pokreće signalizaciju preko TLR4; dok forma sa potpuno oksidovanim cisteinskim ostacima ne ispoljava proinflamatornu aktivnost [47].

Akutnofazni proteini (eng. *acute-phase proteins*, APP) imaju značajnu ulogu u odbrani organizma od infekcije. Oni se uopšteno definišu kao proteini čija se koncentracija u krvnoj plazmi tokom inflamatornih stanja menja za najmanje 25%, pri čemu se, u zavisnosti od smera promene, klasifikuju kao pozitivni, ukoliko se njihova koncentracija povećava, ili negativni APP ukoliko se smanjuje [48]. Jedan od pozitivnih APP je haptoglobin (Hp), čiju sintezu vrše pretežno hepatociti u odgovoru na proinflamatorne citokine [48,49]. Primarna fiziološka uloga Hp je vezivanje slobodnog hemoglobina (Hb), koji se oslobađa iz eritrocita tokom hemolize [49]. Efikasno uklanjanje Hb iz cirkulacije od ključnog je značaja, budući da redoks potencijal hema u njegovom sastavu doprinosi stvaranju reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species,* ROS) i oksidativnom oštećenju ćelija.

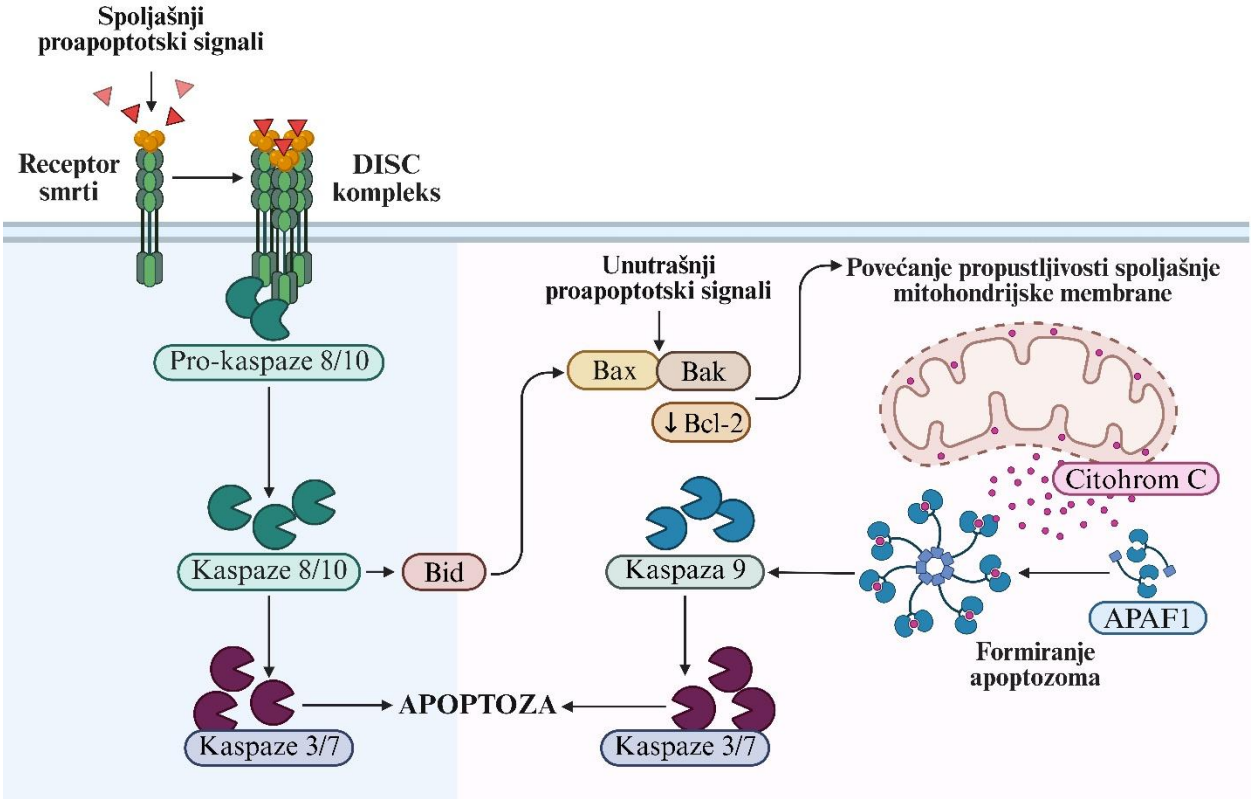
Hp gotovo ireverzibilno vezuje Hb, formirajući stabilan kompleks, koji prepoznaje membranski receptor iz familije „sakupljača“ (eng. scavenger) CD163 makrofaga i monocita, što vodi internalizaciji kompleksa i razlaganja hema na gvožđe i bilirubin [50]. Hp uključen u ovaj proces nije isključivo poreklom iz jetre, već su identifikovana i ekstrahepatična mesta njegove sinteze, poput pluća i mozga [51,52]. U ovim organima, koji su naročito osetljivi na oštećenja izazvana hemoragijom, lokalno sintetisan Hp omogućava bržu i efikasniju zaštitu tkiva [51,52].

Pored primarne fiziološke uloge, Hp takođe ostvaruje i imunomodulatorne uloge, učestvujući u održavanju ravnoteže između proinflamatornog i antiinflamatornog odgovora organizma. U stanju endotoksinske tolerancije (ET) koja predstavlja fenomen smanjenog imunskog odgovora na ponavljano izlaganje toksinima, povećanje koncentracije Hp direktno utiče na smanjenje ekspresije TNF kao ključnog medijatora citokinske oluje [53]. U *ex vivo* i *in vitro* uslovima, inhibicija sekrecije Hp poništava stanje ET, što se ogleda u značajnom povećanju koncentracije TNF [53]. Sepsa je klinički relevantan primer ET, pa je kod septičnih pacijenata uočeno povećanje koncetracije Hp, koje se stabilno održavalo kako tokom same sepse, tako i tokom celog perioda oporavka [53]. Poznato je i da Hp vezuje potpuno i delimično redukovane

forme HMGB1, koje poseduju proinflamatornu aktivnost, dok ne ispoljava afinitet prema potpuno oksidovanoj formi HMGB1 [54]. Hp sa HMGB1 formira kompleks koji makrofagi prepoznaju i preuzimaju posredstvom CD163 receptora [54]. Hp-HMGB1 kompleks stimuliše makrofage da sintetišu antiinflamatorne medijatore kao što su enzim hem oksigenaza-1 (HO-1) i IL-10 [54].

1.3.2. Apoptoza

Apoptoza predstavlja precizno regulisani oblik programirane ćelijske smrti sa ključnom ulogom u očuvanju homeostaze i regulaciji broja ćelija u fiziološkim uslovima. Međutim, u kontekstu sepse njena uloga može biti dvosmerna – u zavisnosti od patofiziološkog konteksta i stadijuma sepse, apoptoza može imati i protektivne i štetne posledice. Stoga se, kao i mnogi drugi inače homeostatski procesi, apoptoza u sepsi može slikovito opisati kao “mač sa dve oštrice” [55].



Slika 3. Shematski prikaz spoljašnjeg i unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze. Detaljno objašnjenje dato je u tekstu. Slika je kreirana korišćenjem alata BioRender.

Stimulusi koji mogu da pokrenu apoptozu su brojni i raznovrsni i uopšteno se klasifikuju prema tome da li aktiviraju spoljašnji – receptorski ili unutrašnji – mitohondrijski put apoptoze (**Slika 3**). Bez obzira na inicijalni mehanizam aktivacije, oba puta konvergiraju u jedan zajednički čiji je krajnji ishod kaskadna aktivacija efektorskog proteina apoptoze – kaspaze 3 (**Slika 3**) [56].

Spoljašnji, odnosno receptorski put apoptoze započinje vezivanjem liganada kao što su TNF ili Fas za njihove odgovarajuće receptore smrti kao što su TNFR1 ili CD95. Sledi trimerizacija receptora smrti i regrutovanje adapternih proteina sa kojima formiraju signalni kompleks koji indukuje smrt (eng. *death-inducing signaling complex,* DISC). DISC regrutuje kaspaze-8 koje dalje aktiviraju „egzekutivne" kaspaze-3 i -7 ili Bid (eng. *BH3-interacting domain death agonist*) koji ulazi u mitohondrije i pokreće unutrašnji put apoptoze (**Slika 3**) [57]. Unutrašnji put podstiču signali koji povećavaju propustljivost spoljašnje membrane mitohondrija što dovodi do oslobađanja citohroma C u citosol. Ključni korak unutrašnjeg puta predstavlja formiranje apoptozoma od strane apoptotskog faktora aktivacije proteaza 1 (eng. *apoptotic protease-activating factor 1,* APAF1), koji nakon vezivanja citohrom C oligomerizuje i regrutuje inaktivne prokaspaze-9, koje se unutar apoptozoma autoaktiviraju i zatim aktiviraju "egzekutivne" kaspaze (**Slika 3**). Formiranje pora u spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani direktno zavisi od ravnoteže između nivoa proapoptotskih i antiapoptotskih proteina iz porodice proteina B-ćelijskog limfoma 2 (eng. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2). Njeni proapoptotski članovi kao što su Bcl-2-asocirani X protein (eng. *Bcl-2–associated X protein*, Bax) i Bcl-2 antagonist/ubica 1 (eng. *Bcl-2 antagonist/killer 1,* Bak) povećavaju njenu propustljivost formiranjem pora, dok antiapoptotski članovi, kao što je Bcl-2, vezuju proapoptotske proteine i time sprečavaju pokretanje apoptotskog odgovora. Stoga, povećanje odnosa Bax/Bcl-2 ukazuje na pojačan proapoptotski odgovor [58].

U kontekstu takozvane "citokinske oluje" apoptoza imunskih ćelija može ograničiti nekontrolisan imunski odgovor [55,59]. Ipak, iako se sepsa definiše kao stanje nekontrolisanog imunskog odgovora, sa progresijom bolesti paradoksalno nastupa tzv. imunološka „paraliza", prouzrokovana sepsom-indukovanom apoptozom ključnih efektorskih ćelija imunskog sistema – limfocita i dendritskih ćelija [55]. U skladu sa tim, još pre trideset godina je uočena potreba za opreznom primenom terapija usmerenih na inhibiciju sekrecije proinflamatornih citokina [60].

Post mortem analiza uzoraka tkiva septičnih pacijenata ukazuje na ekstenzivnu apoptozu

limfocita [61], pri čemu intenzitet limfopenije koreliše sa težinom i ishodom sepse [62,63]. Ovi rezultati dobijeni su i na animalnim modelima sepse [64,65]. Prva studija koja je pokazala da indukovanje prekomerne ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 pospešuje preživljavanje miševa sa eksperimentalno izazvanom sepsom objavljena je još 1999. godine [66]. Takođe, pokazano je da i neki terapeutici potencijalno efikasni u lečenju sepse ostvaruju svoje dejstvo indukovanjem ekspresije Bcl-2, dok inhibiraju ekspresiju proapoptotskog Bax proteina [67].

Važno je istaći da nekrotične ćelije pasivno oslobađaju i protein HMGB1, dok ga ćelije u apoptozi ne sekretuju. Ipak on predstavlja jedan od signala koji mogu indukovati apoptozu. Međutim, povećana akumulacija apoptotičnih ćelija u tkivima stimuliše makrofage da aktivno sekretuju HMGB1, što može doprineti sekundarnom oštećenjem tkiva [68].

1.3.3. Oksidativni stres

Osnov aerobnog metabolizma predstavlja proces oksidativne fosforilacije, tokom kog se elektroni prenose kroz četiri kompleksa mitohondrijskog transportnog lanca elektrona, pri čemu je molekulski kiseonik njihov krajnji primalac [69]. Za potpunu redukciju jednog molekula kiseonika do vode neophodna su četiri elektrona, dok njegova nepotpuna redukcija rezultuje stvaranjem slobodno-radikalskih i neradikalskih ROS [70]. Slobodno-radikalske ROS, koje karakteriše prisustvo nesparenog elektrona, obuhvataju superoksid anjon ($O_2^{-}\cdot$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), hidroperoksil radikal ($HO_2\cdot$), alkoksil radikal ($RO\cdot$) i peroksil radikal ($RO_2\cdot$). Neradikalske ROS, iako nemaju nesparene elektrone, aktivno učestvuju u oksidativnim procesima i obuhvataju: singlet kiseonik ($^1O_2$), ozon (O_3), vodonik-peroksid (H_2O_2), hipohlorastu kiselinu (HOCl) i organske perokside (ROOH). U ćelijskom okruženju, interakcija ROS sa biomolekulima je neizbežna i dovodi do njihovog strukturnog oštećenja i narušavanja funkcije [71], predstavljajući tako osnovu oksidativnog stresa.

Nivo ROS u ćeliji održava se finim balansom između njihove proizvodnje enzimskim i neenzimskih procesima i neutralizacije antioksidativnim mehanizmima [72]. Po kapacitetu proizvodnje, najvažniji izvori ROS obuhvataju mitohondrijski transportni lanac elektrona, NADPH oksidaze, azot monoksid (NO) sintazu i ksantin oksidazu [73–76]. Dodatno, solubilni oksidoreduktivni enzimi kao što su aldehid oksidaza, flavoprotein dehidrogenaza i triptofan dioksigenaza mogu generisati ROS kao sporedne proizvode svoje aktivnosti [72]. U enzime antioksidativnog sistema (AOS) koji neutrališu ROS i štite ćeliju od oksidativnog stresa spadaju superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT) [77]. U neutralizaciju ROS uključen je i glutation

koji učestvuje kao potentan redukujući agens u reakcijama posredovanim enzimima glutation reduktaza (GR), glutation peroksidaza (GSH-Px) i glutation S-transferaza (GST). Aktivnost navedenih enzima kao i odnos nivoa redukovane i oksidovane forme glutationa (GSH/GSSG) koriste se kao pokazatelji kapaciteta ćelije da uspešno otkloni oksidativni stres [78].

ROS se karakterišu izuzetno kratkim poluživotom zbog čega se u njihovom merenju najčešće primenjuju indirektne metode koje detektuju stabilnije produkte oksidacije lipida, proteina i DNK nastale njihovom interakcijom sa ROS. Proces oksidativnog oštećenja lipida, poznat kao lipidna peroksidacija (LPO), započinje napadom ROS na dvogubu C=C vezu lipida, pri čemu nastaje lipidni peroksil radikal (LOO·) [79,80]. Nastali LOO· radikal dalje lančano oksiduje nove molekule lipida stvarajući tako nove radikale. Terminacija ovog procesa zahteva prisustvo antioksidanasa koji doniraju atom vodonika LOO· radikalu, čime nastaje primarni produkt – lipidni hidroperoksid (LOOH) [80]. Sekundarni produkti LPO su različiti aldehidi, od kojih je jedan malondialdehid (MDA). Za procenu nivoa oksidativnih oštećenja meri se nivo MDA jednostavnom kolorimetrijskom metodom u kojoj MDA reaguje sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) [79]. Još osamdesetih godina prošlog veka zabeležena je povećana LPO u plazmi septičnih pacijenata, kao i u plazmi i tkivima pacova sa eksperimentalno izazvanom sepsom [81,82].

Usled svoje hemijske prirode, procesu LPO su naročito podložni glikolipidi, fosfolipidi, holesterol i polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs). Najzastupljeniji fosfolipidi u sastavu membrana, a naročito u spoljašnjem sloju lipidnog dvosloja su fosfatidilholini (PC). Pored uloge u održavanju stabilnosti i fluidnosti membrane, PC učestvuju i u ćelijskoj signalizaciji, predstavljajući depo sekundarnih glasnika. Naime, dejstvom fosfolipaze A2 (PLA2) od PC se formiraju lizofosfatidilholini (LPC) i niz sekundarnih glasnika [83]. Do neenzimskog stvaranja LPC dolazi usled interakcije ROS sa PC. Jedan od ključnih pokazatelja integriteta ćelijske membrane jeste PC/LPC odnos, pri čemu se smanjenje nivoa PC u odnosu na nivo LPC smatra pokazateljem degradacije ćelijske membrane [83]. LPC su takođe bioaktivni lipidi koji mogu da indukuju migraciju limfocita i makrofaga, kao i da pokrenu produkciju proinflamatornih citokina [84–86].

Jedan od pokazatelja interakcije ROS sa proteinima su proteinski karbonili (PCO) koji nastaju uvođenjem karbonilnih grupa, poput aldehida i ketona, na bočne ostatke aminokiselina kao što su prolin, arginin, lizin i treonin. Ove modifikacije su ireverzibilne što čini PCO

pouzdanim markerom oksidativnog oštećenja proteina i njihov snižen nivo snažno koreliše sa povećanom verovatnoćom preživljavanja kod septičnih pacijenata [87,88]. Kao indikatori oksidativnog stresa koriste se i proizvodi uznapredovale oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*, AOPP) koji nastaju dejstvom hlornih oksidanasa (npr. HOCl) na proteine [89]. Takođe, česta je upotreba i tzv. integrativnih parametara kao što je određivanje prooksidativnog-antioksidativnog balansa (eng. *prooxidative-antioxidative balance*, PAB) kojim se kvantitativno izražava odnos između oksidansa i antioksidansa u uzorku [90].

Pored toga što neposredno dovode do oštećenja biomakromolekula, ROS imaju i ulogu sekundarnih glasnika u signalnim putevima povezanim sa inflamatornim odgovorom. Uloga ROS u aktivaciji NFκB u kontekstu sepse je dobro poznata [91]. Izlaganje makrofaga LPS-u dovodi do produkcije ROS posredstvom malog GTP-vezujućeg proteina Rac1, aktivira NFκB i rezultuje sekrecijom TNF [91]. Injekcija LPS-a kod miševa dovodi do pokretanja NFκB-posredovane transkripcije gena za citokine u jetri, plućima i bubrezima [92]. ROS posredno indukuju ne samo produkciju proinflamatornih citokina, već i molekula vaskularne ćelijske adhezije-1 (eng. *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1), faktora rasta poput faktora stimulacije kolonija granulocita (eng. *granulocyte-colony-stimulating factor*, G-CSF) i faktora stimulacije kolonija makrofaga (eng. *macrophage-colony-stimulating factor*, M-CSF), kao i inducibilne forme NO sintaze (iNOS). Ovi molekuli zajedno doprinose leukocitnoj infiltraciji, aktivaciji monocita i vaskularnoj disfunkciji u toku sepse [93].

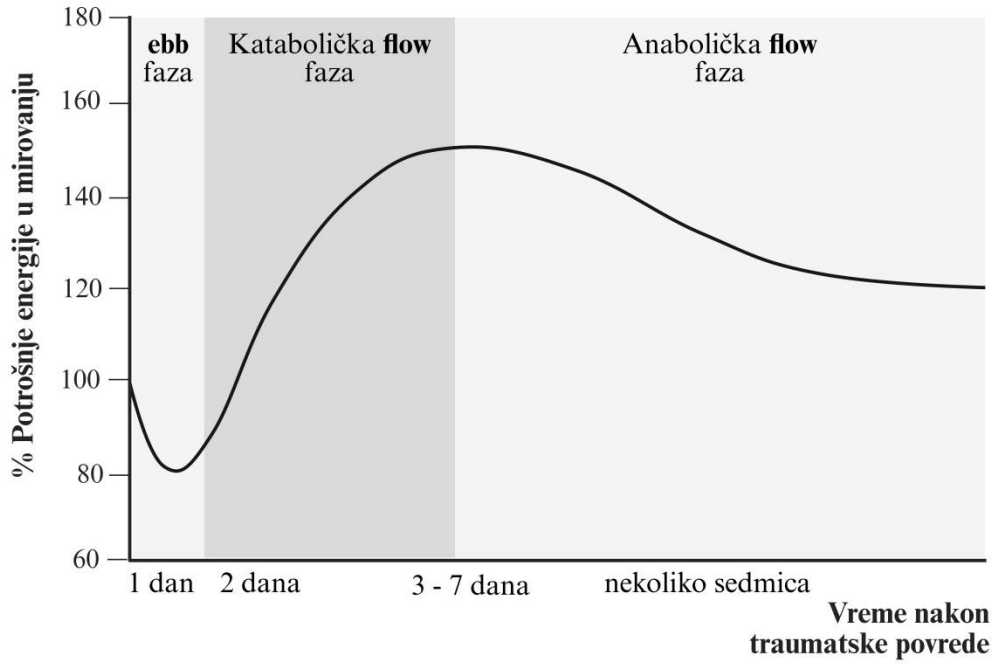
Antioksidativni kapacitet je smanjen kod septičnih pacijenata, a njegovo neobnavljanje snažno koreliše sa lošom prognozom sepse [94,95]. Na primer, kod pacijenata koji ne preživljavaju sepsu uočava se progresivno smanjenje koncentracije glutationa u krvi [95,96]. Takođe, i u animalnim studijama je antioksidativni kapacitet prepoznat kao jedan od ključnih faktora koji određuju ishod sepse. Kod miševa koji ne prežive sepsu uočava se raniji i intenzivniji porast oksidativnih oštećenja u poređenju sa preživelim jedinkama [97].

1.3.4. Izmene energetskog metabolizma

Sepsu karakteriše rana modulacija mehanizama uključenih u održavanje energetske homeostaze. Ovo je praćeno jasno izraženim vremenski zavisnim promenama stope metabolizama (**Slika 4**). Sir David Cuthbertson prvi je opisao karakteristične promene u stopi metabolizma koje se javljaju nakon traumatske povrede, bez obzira na njen tip [98]. Ove promene se klasično posmatrano dele u tri faze. Prva tzv. „ebb“ faza predstavlja inicijalnu

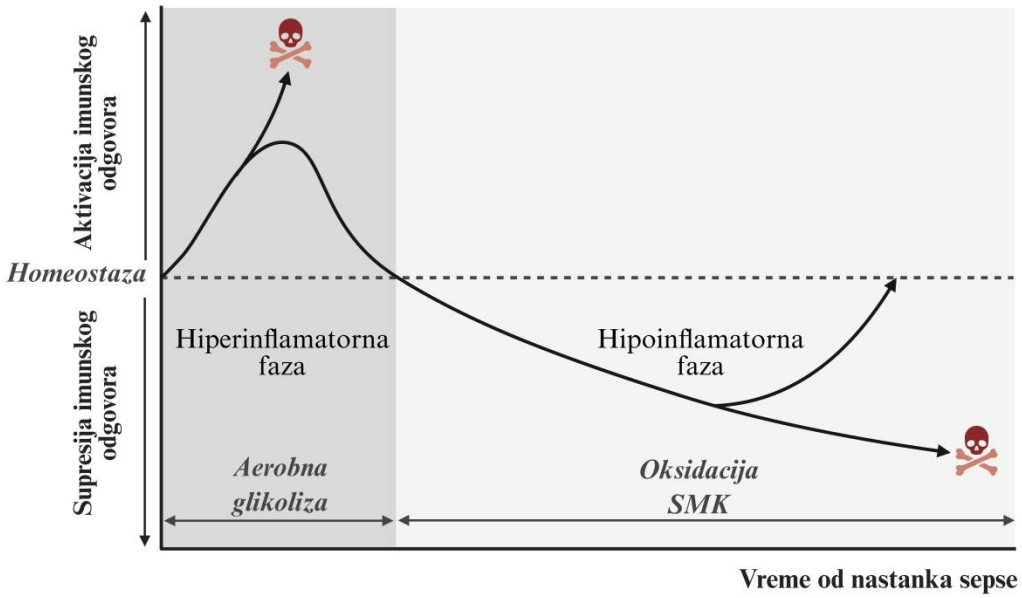
hipometaboličku fazu, koju karakterišu smanjena energetska potrošnja i hipoperfuzija tkiva (**Slika 4**) [98]. Nakon nje sledi katabolička „flow“ faza sa pojačanom metaboličkom aktivnošću i mobilizacijom energetskih supstrata. Konačno, treća faza je anabolička „flow“ faza tokom koje dolazi do obnove energetskih rezervi i oporavka organizma od povrede [98]. Ovaj koncept, uveden pre više od 80 godina, primenjen je i na sepsu, s tom razlikom da u sepsi „ebb“ faza nije jasno izražena, a dinamika bolesti se češće terminološki deli na rani hipermetabolički i kasni hipometabolički stadijum sepse [99].

Hipermetabolička faza sepse je razlog što se sepsa, u kontekstu metabolizma, slikovito opisuje terminima „*failed starvation response*“ i „*autocannibalism*“ [100]. Naime, u ovoj fazi, usled masovnog oslobađanja hormona stresa, dolazi do mobilizacije gotovo svih energetskih rezervi putem aktivacije glikogenolize, glukoneogeneze, Korijevog ciklusa, lipolize i proteolize. Klasični klinički pokazatelji ove faze je povećanje koncentracija glukoze, triglicerida (TG) i laktata u serumu [101]. Uprkos obilju dostupnih supstrata, u hipermetaboličkoj fazi dominira glikoliza, dok su oksidativni procesi inhibirani. Priroda preferencijalnog energetskog supstrata i način obezbeđivanja energije usko su povezani sa pravilnim funkcionisanjem imunskih ćelija tokom odgovora na infekciju.



Slika 4. Grafički prikaz promene metaboličke stope tokom vremena u odgovor na traumatsku povredu. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. Slika je preuzeta i prilagođena iz preglednog rada Delsoglio i sar. [102] korišćenjem alata BioRender.

Pojam imunometabolizma opisuje tesnu povezanost između prirode imunskog odgovora i metaboličkih procesa u njegovoj osnovi. Tokom protekle decenije on je prepoznat i intenzivno izučavan kao jedan od ključnih okvira za razumevanje patofiziologije sepse [103–105]. Neaktivirane (eng. *naïve*) imunske ćelije u fiziološkim uslovima energiju pretežno obezbeđuju β-oksidacijom. Nasuprot tome, u sepsi, ove ćelije se za pokretanje i održavanje hiperinflamatornog odgovora na infekciju oslanjaju na glikolizu, uz inhibiciju oksidativne fosforilacije (**Slike 5–6**) [85,100]. Prelazak ka antiinflamatornom odgovoru zahteva pravovremeno uspostavljanje aerobnog metabolizma (**Slika 5**). Stoga, prelazak između aerobnog i anaerobnog metabolizma usko je povezan sa pravilnim funkcionisanjem imunskih ćelija u sepsi, a odstupanje u bilo kom smeru dovodi do prolongirane hiperinflamacije ili imunosupresije i povećava verovatnoću letalnog ishoda (**Slika 5**) [85,100].



Slika 5. Grafički prikaz povezanosti prirode inflamatornog odgovora i preferencijalnog energetskog supstrata imunskih ćelija tokom progresije sepse. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. Slika je preuzeta i prilagođena iz preglednih radova Hotchkiss i sar. i Vachharajani i sar. [106,107] korišćenjem alata BioRender.

Konačno, kliničke manifestacije narušenog energetskog metabolizma u sepsi, poput anoreksije, hiperlaktatemije, pojačane lipolize i proteolize, tradicionalno se smatraju maladaptivnim odgovorima [108]. Ipak, važno je istaći da svi dosadašnji terapeutski pokušaji njihove korekcije nisu rezultovali poboljšanjem ishoda bolesti [108]. Prema važećim

međunarodnim smernicama za lečenje sepse, jedina eksplicitna preporuka koja se tiče modulacije energetskog metabolizma jeste održavanje glikemije u opsegu 8–10 mmol/L [109]. Lečenje sepse se i dalje u najvećoj meri oslanja na suportivnu terapiju, koja obuhvata rano prepoznavanje simptoma, pravovremenu primenu antibiotika i stabilizaciju hemodinamskih parametara radi adekvatne perfuzije vitalnih organa [109]. Ovaj podatak zabrinjava, jer je još pre više od decenije pokazano da se metabolomsko-proteomski profili preživelih septičnih pacijenata značajno razlikuje od profila pacijenata sa letalnim ishodom, naročito u markerima transporta masnih kiselina, β-oksidacije, glukoneogeneze i Krebsovog ciklusa [110]. Ove razlike se dodatno povećavaju kako se fatalni ishod približava [110].

1.3.4.1. Poremećaj metabolizma glukoze

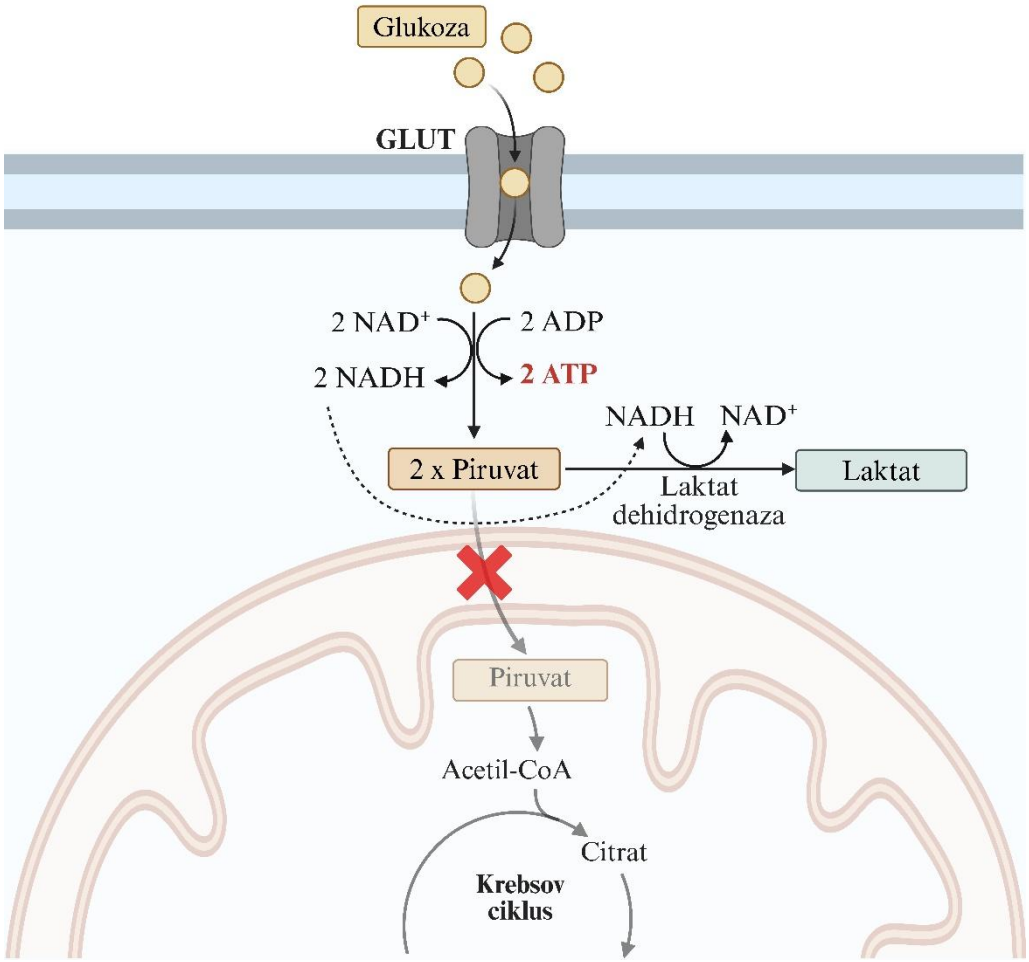
U fiziološkim uslovima, glukoza predstavlja univerzalni izvor energije za sve ćelije organizma. Određena količina glukoze skladišti se u jetri i skeletnim mišićima u obliku glikogena. Glikemija, odnosno koncentracija glukoze u krvi, homeostatski je regulisan parametar u čijoj regulaciji učestvuje niz hormona, među kojima centralnu ulogu imaju insulin i glukagon. Ključni organi u regulaciji glikemije su endokrini pankreas i jetra, koji eksprimiraju insulin-nezavisni bidirekcioni glukozni transporter 2 (eng. *glucose transporter* 2, GLUT2) [111]; kao i masno tkivo i skeletni mišići sa insulin-zavisnim GLUT4 transporterom [112].

Pad glikemije ispod fiziološkog opsega dovodi do pokretanja glikogenolize u jetri i oslobađanja glukoze u perifernu cirkulaciju. Kada su rezerve glikogena iscrpljene, glukoza se obezbeđuje i glukoneogenezom, koja se odvija u jetri i bubrezima polazeći od laktata, glicerola i glukogenih aminokiselina [113,114]. Sa druge strane, hiperglikemija se reguliše preuzimanjem glukoze u masno tkivo i mišiće putem GLUT4 transportera pod dejstvom insulina, kao i procesom glikogenosinteze u jetri [111,115].

Proces dobijanja energije iz glukoze započinje glikolizom, anaerobnim procesom koji se odvija u citosolu svih ćelija, pri čemu se adenozin-trifosfat (ATP) sintetiše fosforilacijom na nivou supstrata. Krajnji produkt glikolize je piruvat, čija sudbina određuje dalji tok metabolizma glukoze (**Slika 6**). U aerobnim uslovima, piruvat ulazi u mitohondrije, gde se dejstvom enzimskog kompleksa piruvat dehidrogenaze (eng. *pyruvate dehydrogenase complex*, PDC) prevodi u acetil-koenzim A (acetil-CoA) i upućuje u Krebsov ciklus, dok se ATP sintetiše oksidativnom fosforilacijom. Jedan od ključnih mehanizama inhibicije PDC je povećana

aktivnost kinaza PDC, koje fosforilišu i inaktiviraju PDC i favorizuju glikolitički tok [116].

U sepsi inicijalno nastupa hiperglikemija, koja se uočava u svim animalnim modelima sepse, dok se u kliničkoj praksi teže detektuje zbog aktivne kontrole primenom insulina [109]. Hiperglikemija u sepsi je posledica kombinovanih efekata glikogenolize, glukoneogeneze i razvoja insulinske rezistencije [100,101,117]. Daljim napredovanjem sepse nastupa hipoglikemija koja u najtežim slučajevima ne može da se koriguje ni primenom kateholamina i predstavlja jedan od prvih znakova otkazivanja jetre [101]. Dok se hiperglikemija može posmatrati kao deo potencijalno adaptivnog odgovora organizma, hipoglikemija ukazuje na dekompenzaciju, odnosno uznapredovali poremećaj mehanizama regulacije glikemije [118].



Slika 6. Shematski prikaz „aerobne“ glikolize i povećane produkcije laktata u sepsi. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. Slika je preuzeta i prilagođena iz preglednog rada Nuyttens i sar. [119] korišćenjem alata BioRender.

U sepsi, glukoza je supstrat za tzv. „aerobnu“ glikolizu, proces tako nazvan jer se laktat

proizvodi uprkos dostupnosti kiseonika (**Slika 6**). Naime, ova pojava posledica je tzv. „citopatske hipoksije“ koja podrazumeva narušenu mogućnost iskorišćavanja kiseonika usled poremećaja funkcije mitohondrija u sepsi, kao što su defektan transport elektrona, kolaps protonskog gradijenta međumembranskog prostora, NAD+ deplecija, itd [120]. Iako je energetski manje efikasna od aerobnog metabolizma glukoze, glikoliza brže obezbeđuje energiju za aktivirane imunske ćelije u sepsi. Ovakva metabolička „odluka“ ćelije prvobitno je opisana u tumorskim ćelijama i poznata je pod terminom Warburgov efekat [121].

U uslovima pojačanog glikolitičkog toka i inhibiranog ulaska piruvata u Krebsov ciklus, piruvat se redukuje u laktat (**Slika 6**). Oslobađanje laktata u krvotok rezultuje hiperlaktatemijom, karakterističnom za sepsu [122]. U okviru Korijevog ciklusa, laktat može da se koristi za glukoneogenezu, ali takođe može da funkcioniše i kao signalni molekul, jer može da poveća vaskularnu propustljivost i podstakne polarizaciju makrofaga ka M2 fenotipu. U kontekstu sepse, ove reakcije mogu da dovedu do maladaptivnog odgovora [123].

1.3.4.2. Poremećaj metabolizma masnih kiselina

Lipidi predstavljaju najveću endogenu rezervu energije, uskladištenu u obliku TG u masnom tkivu. U stanjima povećanih energetskih zahteva dolazi do razgradnje TG procesom lipolize, pri čemu se oslobađaju glicerol i slobodne masne kiseline (SMK) koje cirkulacijom dospevaju do perifernih tkiva u kojima se koriste kao energetski supstrati [124].

SMK se prema stepenu zasićenosti ugljenikovog lanca dele na zasićene (eng. *saturated fatty acids*, SFAs), mononezasićene (eng. *monounsaturated fatty acids*, MUFAs) i polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) [125]. Takođe, razlikuju se SMK sa parnim i neparnim brojem ugljenikovih atoma, pri čemu je pokazano da masne kiseline sa neparnim brojem C-atoma (eng. *odd-chain fatty acids*, OCFAs) uobičajeno ne služe kao energetski supstrati [125]. Miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0) i stearinska kiselina (C18:0) predstavljaju primere SFAs, dok su pentadekanska (C15:0) i heptadekanska kiselina (C17:0) primeri SFAs sa neparnim brojem C-atoma [125]. Palmitoleinska (C16:1) i oleinska kiselina (C18:1) spadaju u MUFAs, dok su linolna (C18:2) i dokozaheksaenoinska kiselina (C22:6) primeri PUFAs [125]. Kod nezasićenih masnih kiselina, konfiguracija dvostruke veze (cis ili trans) značajno utiče na njihova fizičko-hemijska svojstva i način ugradnje u ćelijske membrane, pri čemu trans konfiguracija daje molekulu linearniju strukturu [126].

Još tokom osamdesetih godina prošlog veka je pokazano da rano u sepsi nastupa lipoliza, kao odgovor na masovno oslobađanje hormona stresa [117,127]. Njenom intenzitetu doprinosi i razvoj insulinske rezistencije, usled koje je oslabljeno antilipolitičko dejstvo insulina [117,128]. Uprkos pojačanoj lipolizi, β-oksidacija SMK je inhibirana, što je dovedeno u vezu sa supresijom receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma-α (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor-α*, PPAR-α) i koaktivatora 1-α PPAR-γ (eng. *PPARγ coactivator 1-α*, PGC1-α). Pojedini autori smatraju ovu supresiju delimično adaptivnom, argumentujući da ćelija tako ograničava prekomernu produkciju ROS u mitohondrijama [100,117]. Ipak, produženo stanje lipolize uz inhibirano iskorišćavanje SMK rezultuje lipotoksičnošću [129]. Ovim pojmom se označava metaboličko stanje koje je posledica nakupljanja lipidnih intermedijera u ne-adipoznim tkivima i koje može rezultovati ćelijskom smrću [129]. Ektopična akumulacija lipida može tokom kratkog vremenskog perioda predstavljati adaptivni mehanizam „sekvestiranja“ viška cirkulišućih SMK [128]. Ipak, ako je produžena, vodi uključivanju lipida u neoksidativne puteve uz nastanak toksičnih lipidnih vrsta kao što su diacilglicerol (DAG) i ceramidi, čija je akumulacija povezana sa poremećajima ćelijske signalizacije i energetskog metabolizma [129].

1.4. Eksperimentalni modeli sepse

Tokom proteklih nekoliko decenija uspostavljen je veliki broj animalnih modela za proučavanje sepse, prvenstveno mišjih i pacovskih. Prema načinu izazivanja sepse, razlikuju se modeli (1) infekcije specifičnim bakterijskim ili gljivičnim sojevima, (2) implantacije kontaminiranih fibrinskih ugrušaka, (3) indukcije endotoksemije, (4) intraperitonealne polimikrobne sepse, (5) “dvostrukog udara” (eng. *two-hit models*), kao i (6) modeli zasnovani na upotrebi tzv. „humanizovanih“ miševa (**Tabela 1**) [130]. Pored toga što se metodološki razlikuju po načinu izazivanja sepse, svaki od ovih modela karakterišu određene prednosti i mane u modelovanju sepse (**Tabela 1**) [130].

U modelima koji se zasnivaju na indukovanju infekcije specifičnim bakterijskim ili gljivičnim sojevima primenjuju se pojedinačni patogeni poput *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* i *Candida albicans*, čime se omogućava ispitivanje imunskog odgovora na pojedinačne potencijalne uzročnike sepse, ali ne i kompleksne polimikrobne infekcije [131–134].

Implantacija fibrinskih ugrušaka kontaminiranih bakterijama omogućava kontrolisano

otpuštanje patogena, bolje modelujući porast brojnosti bakterija u peritonealnoj šupljini i time vernije odslikava tok humane sepse [135].

Model sepse	**Eksperimentalni pristup**	**Priroda imunskog odgovora**	**Translaciona vrednost modela**
Infekcija pojedinačnim patogenom	Inokulacija pojedinačnog bakterijskog (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae*) ili gljivičnog (*Candida albicans*) patogena (i.p., intravenoznim, intranazalnim ili intratrahealnim putem)	Akutni sistemski proinflamatorni odgovor, pri čemu njegov intenzitet zavisi od puta primene	**Niska** *(usled monomikrobne prirode infekcije)*
Implantacija kontaminiranih fibrinskih ugrušaka	Implantacija bakterijama (najčešće *Escherichia coli*) impregnisanih fibrinskih ugrušaka u peritoneum	Sporo otpuštanje bakterija rezultuje postepenim razvojem inflamacije uz produžene metaboličke i imunološke perturbacije	**Umerena** *(usled pretežno monomikrobne prirode infekcije)*
Modeli endotoksemije	Različiti modaliteti primene bakterijskih ili gljivičnih PAMPs	Brza i snažna aktivacija urođenog imuniteta sa izraženom citokinskom hiperinflamacijom	**Niska** *(usled odsustva živih patogena, ali nudi mogućnost standardizacije)*
Intraperitonealna polimikrobna sepsa	Izazivanje i.p. peritonitisa podvezivanjem i perforacijom cekuma (CLP model) / i.p. primenom suspenzije fecesa (FIP model)	Sistemski imunski odgovor sličan onom u kliničkoj sepsi	**Visoka** *(usled sličnosti sa kliničkom sepsom; FIP model nudi mogućnosti standardizacije)*
Modeli „dvostrukog udara“ (eng. *two-hit models*)	Indukovanje primarne sepse praćene sekundarnim izazovom primenom infektivnih ili neinfektivnih stimulusa	Bifazni imunski odgovor (hiperinflamacija praćena imunosupresijom)	**Umerena** *(oponaša razvoj sekundarnih infekcija ali modeli nisu standardizovani)*
Upotreba “humanizovanih” miševa	Primenom različitih infektivnih stimulusa nakon transplantacije humanih $CD34^+$ hematopoetskih matičnih ćelija u imunodeficijentne miševe	Imunski odgovor sličan humanom	**Visoka** *(usled prisustva humanih imunskih ćelija)*

Tabela 1. Pregled najčešće korišćenih eksperimentalnih modela sepse.

Indukcija endotoksemije podrazumeva primenu endotoksina, komponenti zida Gram-negativnih bakterija koje se, tokom infekcije, oslobađaju usled lize bakterija. Ovi modeli omogućavaju proučavanje inflamatornog odgovora koje pokreću bakterijske komponente, a bez

prisustva samog patogena. Najčešće se koristi LPS izolovan iz spoljašnje membrane Gram-negativnih bakterija, mada su nedavno razvijeni i modeli zasnovani na primeni komponenti Gram-pozitivnih bakterija [136,137]. LPS snažno aktivira imunski sistem preko TLR4 receptora, a zahvaljujući mogućnosti preciznog doziranja, LPS model obezbeđuje visoku reproducibilnost [136].

Indukovanje intraperitonealne polimikrobne sepse zasniva se na metodološkom pristupu koji imitira kliničke uslove koji nastaju kao komplikacija hirurških zahvata, usled kojih dolazi do izlivanja fekalnog sadržaja u peritoneum. Najčešće korišćen model, kako kod pacova tako i kod miševa, jeste podvezivanje cekuma i njegovo perforiranje iglom (eng. *cecal ligation and perforation*, CLP) [138]. Iako se CLP model i dalje smatra "zlatnim" standardom [138], njegova standardizacija je otežana zbog varijabilnosti količine fekalnog sadržaja koja se izliva u peritonealnu šupljinu nakon perforacije cekuma. Iz tog razloga, razvijeni su modeli koji se zasnivaju na fecesom indukovanom peritonitisu (FIP) u kojima se, u zavisnosti od telesne mase pacova, intraperitonealno (i.p.) ubrizgava definisana doza suspenzije fecesa što ovaj model čini reproducibilnijim u odnosu na CLP model.

Modeli "dvostrukog udara" razvijeni su s ciljem da se oponaša bifazni tok sepse, u kojem najpre dolazi do prekomerne i nekontrolisane aktivacije imunskog sistema, a zatim do prethodno pomenute imunološke "paralize". Ovi modeli podrazumevaju primenu dva uzastopna infektivna stimulusa – najpre se indukuje primarna sepsa, npr. CLP metodom, a potom se, nakon određenog perioda oporavka, životinja izlaže sekundarnom stimulusu, poput endotoksina ili infekcije definisanim bakterijskim sojem [139].

Za modelovanje humane sepse koriste se i tzv. „humanizovani" imunodeficijentni miševi, kojima se pre indukcije bolesti transplantiraju ljudske hematopoetske ćelije. Ovaj pristup omogućava formiranje imunskog odgovora koji je sličniji ljudskom, čime se stvara pouzdan eksperimentalni model za proučavanje patofizioloških mehanizama sepse i evaluaciju potencijalnih terapijskih strategija [140].

Imajući u vidu dati pregled, u ovoj tezi su korišćeni LPS i FIP modeli zbog mogućnosti standardizacije, kao i njihove komplementarnosti, budući da LPS model omogućava mehanističko ispitivanje inflamatornog odgovora, dok FIP model vernije oponaša kliničku sepsu.

1.5. Meldonijum

Meldonijum (3-(2,2,2-trimetilhidrazinijum) propionat; $C_6H_{14}N_2O_2$) je hidrofilni molekul molekulske mase 146,2 g/mol [141]. Aktivna je supstanca leka Mildronate® sa oralnom primenom, koji se u zemljama Istočne Evrope koristi u lečenju ishemijske bolesti srca i mozga. Nakon oralnog unosa, meldonijum se aktivnim transportom apsorbuje na nivou tankog creva posredstvom transportera organskih katjona/karnitina 2 (eng. *organic cation/carnitine transporter 2*, OCTN2). Ovaj transporter omogućava prolazak meldonijuma i kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) [141].

1.5.1. Biohemijski mehanizmi u osnovi dejstva meldonijuma

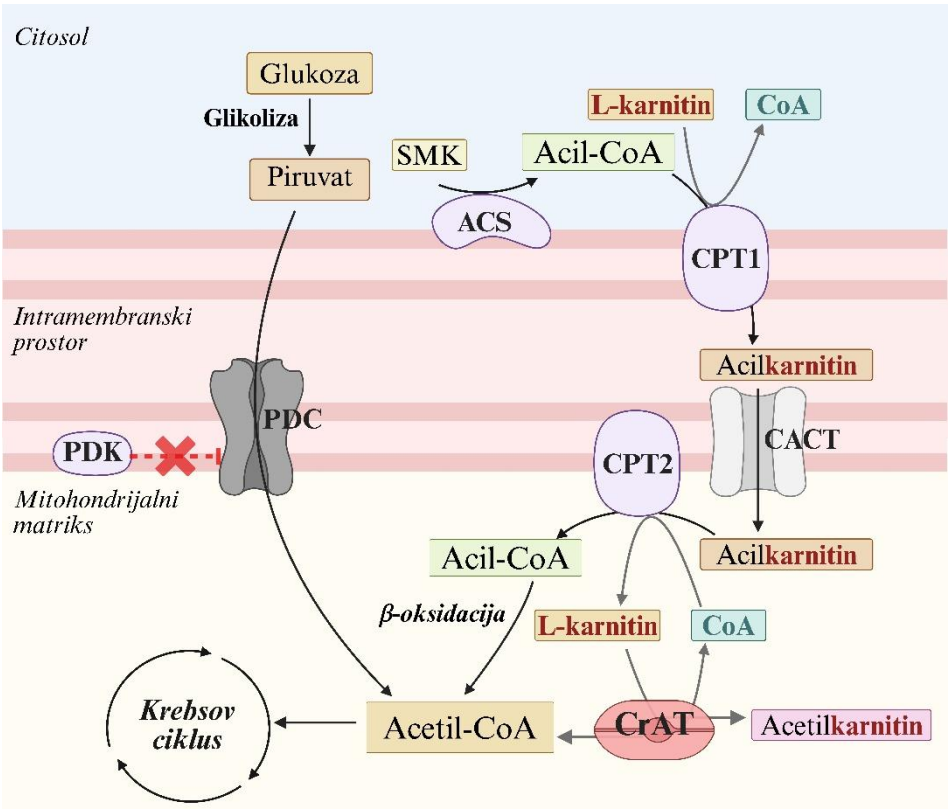
Nakon ulaska u ćeliju, meldonijum inhibira enzim γ-butirobetain-hidroksilazu [142,143], što je posledica njegove strukturne sličnosti sa supstratom ovog enzima – γ-butirobetainom. Ovaj enzim katalizuje završni korak biosinteze aminokiselinskog derivata L-karnitina, odnosno reakciju između γ-butirobetaina i 2-oksoglutarata u prisustvu kiseonika, pri čemu nastaju L-karnitin, sukcinat i ugljen dioksid [144]. Pored efekta na sintezu L-karnitina, meldonijum inhibira i njegov ulazak u ćeliju, budući da su u kompeticiji za transporter OCTN2 [145,146]. Pokazano je da meldonijum deluje i kao kompetitivni inhibitor karnitin-acilkarnitin-translokaze (CACT), transportera koji omogućava „reciklažu" L-karnitina iz mitohondrijskog matriksa izmenjujući ga za acilkarnitin iz citosola [147]. Kumulativno, ovi mehanizmi dovode do sniženja unutarćelijskog sadržaja L-karnitina. Ovo smanjenje je dozno zavisno, ali je utvrđeno da posle četiri nedelje primene meldonijuma koncentracija L-karnitina u tkivima pacova dostiže plato, koji se sa daljom primenom ne menja značajno [148].

1.5.2. Značaj L-karnitina i metabolički efekti meldonijuma

L-karnitin ima ključnu ulogu u mobilizaciji dugolančanih masnih kiselina kao energetskog supstrata (**Slika 7**) [149,150]. Dugolančane masne kiseline se u citosolu najpre aktiviraju u odgovarajući acil-koenzim A (acil-CoA) delovanjem acil-CoA sintetaze dugolančanih masnih kiselina (ACS). L-karnitin je neophodan za reakciju u kojoj enzim spoljašnje mitohondrijske membrane, karnitin-palmitoiltransferaza 1 (CPT1), konvertuje acil-koenzim A u odgovarajući acil-karnitin [149,150]. Nakon toga, dejstvom CPT1 i CACT, acil-karnitin dospeva u mitohondrijski matriks gde ulazi u β-oksidaciju [149,150]. Sa druge strane, masne kiseline kratkog i srednje dugog lanca nesmetano difunduju kroz mitohondrijske

membrane tj. upućuju se u β-oksidaciju bez učešća karnitinskog transportnog sistema.

Snižavanjem unutarćelijskog sadržaja L-karnitina, meldonijum inhibira karnitin-zavisnu komponentu β-oksidacije, tj. oksidaciju dugolančanih masnih kiselina u mitohondrijama (**Slika 7**). Prvobitno se smatralo da svoje povoljne efekte ispoljava inhibicijom β-oksidacije. Međutim, ova pretpostavka je dovedena u pitanje kada je zapaženo da meldonijum u srcu ne smanjuje neto stopu β-oksidacije [151]. Dalja istraživanja su pokazala da inhibicija karnitin-zavisne β-oksidacije pojačava peroksizomalnu aktivnost, uz preusmeravanje dugolančanih masnih kiselina



Slika 7. Shematski prikaz uloge L-karnitina u regulaciji metabolizma masnih kiselina i glukoze. Detaljno objašnjenje je dato u tekstu. Isprekidana crvena linija ilustruje inhibiciju. Skraćenice: ACS – acil-CoA sintetaza; CoA – koenzim A; SMK – slobodna masna kiselina; CPT1 – karnitin-palmitoiltransferaza 1; CPT2 – karnitin-palmitoiltransferaza 2; CACT – karnitin-acil-karnitin translokaza; CrAT – karnitin-acetiltransferaza; PDC – kompleks piruvat dehidrogenaze; PDK – kinaza PDC. Slika je preuzeta i prilagođena iz preglednog rada Dambrova i sar. [152] korišćenjem alata BioRender.

iz mitohondrija u ove organele [153]. Centralnu ulogu u aktivaciji ovih kompenzatornih mehanizama imaju PPAR-α i PGC1-α [153]. U peroksizomima se dugolančane masne kiseline skraćuju do masnih kiselina kratkog i srednje dugog lanca, koje se potom upućuju u mitohondrije na dalju oksidaciju [152,153]. Na ovaj način, meldonijum štiti mitohondrije od lipotoksičnih

intermedijera kao što su dugolančani acilkarnitini [152].

Važno je istaći da L-karnitin učestvuje u regulaciji ne samo metabolizma SMK, već i metabolizma ugljenih hidrata [152,154]. Za razumevanje ove regulacije neophodno je sagledati ulogu L-karnitina u održavanju odnosa acetil-CoA/slobodnog CoA u mitohondrijskom matriksu. Kada je ćelijski sadržaj L-karnitina nenarušen, održava se visok nivo slobodnog CoA u mitohondrijama, što je ključno za nesmetano odvijanje aerobnog metabolizma. U ovakvim uslovima, odnos acetil-CoA/CoA je nizak, a specifična kinaza PDC inhibirana. Posledično, fosforilacija PDC je smanjena, pa je ovaj kompleks aktivan i može da katalizuje konverziju piruvata, krajnjeg produkta glikolize, u acetil-CoA (**Slika 7**) [152,154]. Na taj način se omogućava efikasno oksidativno iskorišćavanje glukoze.

Najzad, za razumevanje metaboličkih efekata meldonijuma, važno je sagledati kako se ćelija adaptira u zavisnosti od prirode dostupnog energetskog supstrata. Ovi principi opisani su kroz tzv. Randleov ciklus, poznat i kao ciklus glukoze i masnih kiselina [155–157]. Kada dominira oksidacija masnih kiselina, u mitohondrijskom matriksu dolazi do akumulacije acetil-CoA i NADH, što rezultuje aktivacijom specifične kinaze PDC. Aktivnost PDC je stoga inhibirana čime se smanjuje oksidativna upotreba glukoze usled smanjenog prevođenja piruvata u acetil-CoA. Istovremeno, citrat nastao u prvom koraku Krebsovog ciklusa inhibira fosfofruktokinazu, enzim koji određuje stopu glikolize [155]. Kada je β-oksidacija smanjena, ova inhibicija nestaje i intenzivira se oksidativno iskorišćavanje glukoze [155]. Pored toga, u jetri glukoza može da se prevede u malonil-CoA koji inhibicijom CPT1 suprimira oksidaciju dugolančanih masnih kiselina [158].

Meldonijum, smanjujući L-karnitin i ograničavajući mitohondrijski transport dugolančanih masnih kiselina, inhibira njihovu β-oksidaciju a pojačava oksidaciju glukoze u skladu sa Randleovim ciklusom [152,157]. Ovo su potvrdila i direktna *in vivo* merenja koja su pokazala da u srcu meldonijum povećava protok C-atoma kroz PDC, tj. pojačava upućivanje piruvata u Krebsov ciklus [157].

1.5.3. Efekti meldonijuma u animalnim modelima i kliničkim studijama

Prvobitni animalni modeli u kojima su ispitivani efekti meldonijuma obuhvatali su infarkt miokarda i mozga, ishemijsko-reperfuziona oštećenja, kao i metaboličke poremećaje poput dijabetesa tipa 2. Ipak, poslednjih godina prepoznat je potencijal meldonijuma i u drugim patološkim stanjima, među kojima se posebno izdvajaju neurodegenerativni poremećaji, kao što

su Parkinsonova bolest (eng. *Parkinson's disease*, PD) i Alchajmerova bolest (eng. *Alzheimer's disease*, AD), ali i različiti tumori.

Na pacovskom modelu dijabetesa tipa 2, osmonedeljni tretman meldonijumom je održao glikemiju u fiziološkim granicama i sprečio razvoj kardiovaskularnih komplikacija [159]. Nakon ishemije-reperfuzije srca dijabetičnih pacova, površina infarktom zahvaćenog miokarda je bila značajno manja u grupi pacova tretiranih meldonijumom. Interesantno je da je meldonijum primenjivan u dozi od 100 i 200 mg po kg telesne mase (t.m.), a uočeni kardioprotektivni efekat je bio izraženiji pri nižoj dozi [159]. Unos meldonijuma u dozi od 100 mg/kg t.m., sedam dana uoči, kao i tokom intenzivne fizičke aktivnosti, snizio je parametre oksidativnog stresa u srcu miša. Analizirani su koncentracija konjugovanih diena i redukovanog glutationa, kao i stepen oštećenja mitohondrijske DNK (mtDNK) [160]. Slični efekti uočeni su i u nedavno objavljenoj studiji u kojoj su miševi dva meseca pili meldonijum u dozi 100 mg/kg t.m. Naime, uočeno je smanjenje oštećenja mtDNK i koncentracije konjugovanih diena u srcu kao i povećanje ekspresije GLUT4 i sniženje ekspresije PGC-1α. Za razliku od grupe koja je unosila L-karnitin, nije uočeno povećanje snage i izdržljivosti u meldonijumskoj grupi. U crevnom mikrobiomu miševa tretiranih meldonijumom povećana je zastupljenost bakterija koje produkuju masne kiseline kratkog lanca i dovode se u vezu sa očuvanjem mukozne barijere odnosno odbranom od različitih patogena. Ipak, treba istaći da se kod tretiranih životinja povećao i udeo bakterija čiji se porast zastupljenosti dovodi u vezu sa konzumiranjem masne hrane i njenim štetnim efektima [161].

Kod miševa, nakon 21 dana oralne primene meldonijuma uz ishranu bogatu ugljenim hidratima, uočen je razvoj steatoze jetre. Ovaj efekat doveden je u vezu sa povećanom aktivnošću delta-6 desaturaze i smanjenom elongacijom PUFAs, tj. poremećajem metabolizma masnih kiselina koji vodi akumulaciji TG u jetri [162]. Na mišjem modelu srpaste anemije, koja često rezultuje otkazivanjem bubrega, meldonijum je injeciran u dozi od 400 mg/kg t.m./dan tokom 10 dana i značajno poboljšao funkciju bubrega [163]. Ovaj efekat se pripisuje njegovom antiinflamatornom delovanju, koje se ogledalo u smanjenju nivoa proinflamatornih citokina [163].

Podaci o efektima meldonijuma u modelu povrede pluća, su malobrojni. Studija iz 2012. godine je ispitivala njegove efekte na ekspresiju markera inflamacije u modelu LPS-om indukovane akutne povrede pluća kod miševa. Meldonijum je primenjivan u dozama od 50, 100 i

200 mg/kg t.m./dan, šest dana pre primene LPS-a [164]. Pri svim ispitivanim dozama, meldonijum je značajno smanjio nivo IL-1β, IL-6 i ekspresiju NFκB p65 u tkivu pluća, infiltraciju neutrofila i razvoj plućnog edema [164]. Dodatno, farmakodinamski i farmakokinetički podaci ukazuju na sposobnost meldonijuma da u hipoksičnim uslovima moduliše metabolizam jabučne i 3-hidroksipropionske kiseline, tj. potencijalno i Krebsov ciklus [165]. Pretretman meldonijumom (50–200 mg/kg t.m., jednom dnevno tokom tri dana) ublažio je hipoksijom izazvanu povredu pluća preko fosfofruktokinaze tipa P, pospešujući glikolizu i podstičući translokaciju jedarnog eritroidnog faktora 2 (eng. *nuclear factor erythroid 2*, Nrf2) u jedro, kao ključnog transkripcionog faktora u zaštiti od oksidativnog stresa [166]. Inhibicija hemotakse neutrofila uočena je i u nedavnoj studiji iz 2024. godine, gde je meldonijum, primenjivan oralnom gavažom u dozi od 100 mg/kg t.m., svakog drugog dana tokom dve nedelje uoči infekcije miševa bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* [167]. Ovaj tretman je sprečio nagomilavanje neutrofila u plućima i time smanjio oštećenja tkiva pluća [167]. Pokazano je da tronedeljni tretman meldonijumom (200 mg/kg t.m. putem pijaće vode) poboljšava plućnu funkciju kod miševa sa narušenom produkcijom surfaktanta [168].

U modelu neurotoksičnosti, meldonijum je značajno smanjio infiltraciju inflamatornih ćelija i apoptozu u kori prednjeg mozga miševa [169]. Neuroprotektivno dejstvo meldonijuma pokazano je i u pacovskom modelu traumatske povrede mozga (TPM), kroz antiinflamatorno i proangiogeno dejstvo čime ograničava veličinu lezije i podržava funkciju KMB [170,171]. Interesantno je i da pretretman meldonijumom (50-200 mg/kg t.m.) kod pacova podržava funkciju cerebralnog krvotoka i pomaže preživljavanje hipoksijom indukovane akutne povrede mozga [172]. Nedavno je pokazano da je u osnovi ovih povoljnih dejstava meldonijuma njegova sposobnost direktne interakcije sa fosfoglicerat-kinazom 1 (PGK1), čime pojačava njenu aktivnost i pospešuje glikolizu [172]. Osim toga, meldonijum stimuliše translokaciju PGK1 u mitohondrije i utiče na aktivnost proteina asociranog sa TNF receptorom 1 (eng. *TNF receptor-associated protein 1*, TRAP1), molekulskog šaperona koji štiti mitohondrije od oksidativnog stresa [172]. Kod miševa koji su četiri nedelje injecirani meldonijumom (i.p. 100 mg/kg t.m./dan), uporedo sa stavudinom – antiretrovirusnim lekom koji kao nuspojavu izaziva oštećenje perifernih nerava – broj oštećenih neurona u sastavu išijadičnog nerva bio je značajno smanjen [173]. Osim toga, miševi tretirani meldonijumom su značajno manje ispoljavali ponašanje koje se dovodi u vezu sa prisustvom upale i bolom u ekstremitetima [173].

U ishemijsko-reperfuzionoj povredi kičmene moždine kod zečeva, preoperativna primena meldonijuma (100 mg/kg t.m., i.p.) doprinela je očuvanju motornih neurona i poboljšanju neuroloških funkcija u poređenju sa netretiranim životinjama [174]. Kod zečeva injeciranih meldonijumom uoči povrede, značajno su smanjeni inflamacija, oksidativni stres i apoptoza, kao i nivoi mijeloperoksidaze, MDA, kaspaze-3 i ksantin oksidaze, ali je povećana aktivnost CAT [174]. Povoljan uticaj meldonijuma na očuvanje motornih funkcija uočen je i kod pacova sa subhroničnom neuroinflamacijom izazvanom ponovljenom primenom LPS-a tokom deset dana. Naime, LPS-u paralelna oralna primena meldonijuma (100 mg/kg t.m./dan) povećala je lokomotornu aktivnost životinja i sprečila smanjenje eksploratornog ponašanja u poređenju sa pacovima tretiranim samo LPS-om [175]. U mišjem modelu AD, i.p. primena meldonijuma u dozama od 50 i 100 mg/kg t.m./dan tokom 28 dana, dovela je do poboljšanja kognitivnih funkcija [176]. Istovremeno, tretman je smanjio nakupljanje β-amiloidnih plakova u hipokampusu, kao i aktivnost acetilholinesteraze, dok je ekspresija markera mikroglije bila povećana [176].

U pacovskom modelu PD, i.p. primena meldonijuma (20 i 50 mg/kg t.m./dan) tokom dve nedelje pre indukcije lezija očuvala je ekspresiju proteina ključnih za preživljavanje i funkciju dopaminskih neurona. Ekspresija proteina toplotnog šoka 70 (eng. *heat shock protein 70,* Hsp70) i glijskog neurotrofnog faktora (eng. *glial cell line-derived neurotrophic factor*, GDNF) bila je na nivoima bliskim kontrolnoj grupi pri obe doze, dok je ekspresija adhezionog molekula neurona (eng. *neural cell adhesion molecule*, NCAM) u potpunosti očuvana višom dozom meldonijuma [177]. Na istom modelu, pri višim dozama (50 i 100 mg/kg t.m./dan), meldonijum je očuvao ekspresiju tirozin hidroksilaze, markera dopaminskih neurona, i smanjio nagomilavanje ubikvitina koje je prisutno u PD [178]. Uočeno je i da je meldonijum smanjio neuroinflamaciju i reaktivnu astrogliozu, kao i da je stimulisao populaciju progenitorskih ćelija [178].

Gureev i sar. su nedavno pokazali da meldonijum, primenjen nakon TPM, ograničava razvoj reaktivne astroglioze [171]. U nedavnoj studiji na mišjem modelu glioblastoma, meldonijum je značajno usporio rast tumora nakon dvonedeljne subkutane primene jednom dnevno u dozi od 250 mg/kg t.m. [179]. U studiji Zvejniece i sar. meldonijum je i.p. injeciran neposredno pred uspostavljanje različitih modela povrede mozga. U modelima epilepsije, intoksikacije etanolom kao i akutne fokalne moždane ishemije, meldonijum je ispoljio

antikonvulzivno dejstvo, uz očuvanje cerebralnog protoka krvi i saturacije kiseonikom [180]. Demir i sar. su pokazali da je meldonijum ispoljio antiapoptotsko, antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo kod pacova sa TPM. Naime, jedna i.p. injekcija meldonijuma (100 mg/kg t.m.) bila je dovoljna da u moždanom korteksu održi aktivnost mijeloperoksidaze, kaspaze 3, SOD i ROS na kontrolnom nivou [170]. Oralni unos meldonijuma u dozi od 200 mg/kg t.m./dan tokom tri nedelje, rezultovao je smanjenjem oštećenja mtDNK i koncentracije konjugovanih diena u hipokampusu miševa injeciranih LPS-om tokom 7 dana u dozi 375 μg/kg t.m. [181]. Autori su ovaj rezultat uočili i kod starih miševa koji nisu tretirani LPS-om, a kod kojih je unos meldonijuma trajao godinu dana. U istoj studiji, meldonijum je doveden u vezu sa poboljšanjem kratkotrajnog i dugotrajnog pamćenja. Pretpostavka je da je njegovo uočeno protektivno dejstvo rezultat povišene ekspresije gena uključenih u biogenezu mitohondrija [181].

Protektivna dejstva meldonijuma pokazana su i u kliničkim studijama. Još 2005. godine klinička studija na pacijentima sa bronhijalnom astmom i hroničnim opstruktivnim bronhitisom ukazala je na antiinflamatorno dejstvo meldonijuma i njegov povoljan uticaj na bronhijalnu prohodnost [182]. Klinička studija iz 2023. godine pokazala je da dodatak meldonijuma standardnoj terapiji tokom dvanaest nedelja kod pacijenata sa hroničnom srčanom insuficijencijom i hroničnom opstruktivnom bolešću pluća dovodi do smanjenja simpatičke hiperaktivnosti i normalizacije autonomne regulacije [183]. I kod pacijenata sa komorbiditetom hronične srčane insuficijencije i dijabetesa tipa 2 meldonijum je doprineo poboljšanju simptoma i kvaliteta života [184]. Klinička studija iz 2025. godine pokazala je da je meldonijum značajno poboljšao srčanu funkciju i kvalitet života pacijenata nakon akutnog infarkta miokarda, primenjivan intravenozno u dozi od 1000 mg/kg t.m./dan dnevno tokom prvih 10 dana, a potom oralno u istoj dozi naredna tri meseca [185].

U studiji iz 2011. godine, tokom dvanaestonedeljnog oralnog uzimanja meldonijuma, ispitivana je tolerancija fizičkog napora kod osoba sa hroničnom koronarnom bolešću srca [186]. Studija je obuhvatila ispitanike oba pola, starosti od 35 do 80 godina, a utvrđeno je dozno zavisno dejstvo meldonijuma, sa najpovoljnijim efektom pri dozi od 1000 mg, koje se ogledalo u tome da su ispitanici mogli da izdrže duže trajanje standardizovanog fizičkog opterećenja [186].

Mesec dana oralnog unosa meldonijuma u dozi od 1000 mg dnevno značajno je snizio nivo L-karnitina, a povećao koncentraciju njegovog prekursora, γ-butirobetaina, u plazmi zdravih individua [187]. Unos meldonijuma nije uticao na nivo TG, holesterola i alanin

transaminaze u plazmi ispitanika na osnovu čega su autori zaključili da je meldonijum bezbedan za upotrebu. Ipak, potrebno je istaći da je ova studija obuhvatila svega sedamnaest individua.

Meldonijum je takođe razmatran i kao potencijalna adjuvantna terapija rekurentnog glioblastoma u nedavno objavljenoj studiji slučaja [188]. Nakon oralne primene meldonijuma, dva puta dnevno u ukupnoj dozi od 1000 mg/kg t.m., kod jednog od tri pacijenta došlo je do zaustavljanja rasta tumora i održavanja klinički stabilnog stanja [188].

Na osnovu prikazanog pregleda literature može se zaključiti da su povoljna svojstva meldonijuma pokazana u brojnim i raznovrsnim animalnim modelima, kao i u pojedinim kliničkim ispitivanjima. Tome se pridružuju i rezultati naše istraživačke grupe o antiinflamatornim, antioksidativnim i antiapoptotskim dejstvima meldonijuma u modelima ishemijsko-reperfuzionog oštećenja jetre, odnosno bubrega [189,190]. Ipak, iako su patofiziološki mehanizmi koje je meldonijum modulisao prisutni i u patogenezi sepse, njegovo potencijalno delovanje u ovom kontekstu do sada nije sistematski istraženo. Uočava se da se dostupni podaci mahom zasnivaju na modelima inflamacije izazvane primenom LPS-a, često ograničenim na pojedinačne organe, uz značajne razlike u dozama i načinu primene LPS-a, odnosno meldonijuma.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opšti cilj ove doktorske disertacije bio je da se istraže potencijalna protektivna dejstva četvoronedeljnog oralnog pretretmana pacova meldonijumom na razvoj sepse izazvane LPS-om ili fecesom. Radi praćenja efekata pretretmana meldonijumom na tok sepse i potencijalnu prevenciju sepsom indukovanih oštećenja organa, specifični ciljevi su predviđali ispitivanje uticaja pretretmana meldonijuma na:

1. Kumulativno preživljavanje, telesnu temperaturu i očuvanost refleksne funkcije, kao standardnih pokazatelja toka sepse kod pacova;
2. Aktivnost ALT, AST i ALP u serumu kao markera oštećenja jetre; kardijačnog troponina T (cTnT) kao markera oštećenja srca; uree i kreatinina kao markera oštećenja bubrega septičnih pacova;
3. Sepsom indukovana oštećenja jetre, bubrega, srca i pluća pacova primenom histoloških analiza, kao i određivanjem sadržaja vode u mozgu i/ili plućima;
4. Kapacitet antioksidativne zaštite kod septičnih pacova, određivanjem aktivnosti i/ili nivoa CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GST, GR, ukupnog glutationa i/ili odnosa GSH/GSSG, LPO, PCO, PAB, AOPP i Nrf2 u jetri, bubrezima, srcu, plućima i izabranim strukturama mozga septičnih pacova;
5. Inflamatorni odgovor određivanjem nivoa ekspresije HMGB1, TNF, (p)-NFκB p65, Hp i vimentina (Vim) u krvi i/ili jetri, bubrezima, srcu, plućima i izabranim strukturama mozga septičnih pacova;
6. Odnos relativnih nivoa ekspresije proapoptotskog faktora Bax i antiapoptotskog faktora Bcl-2 u jetri, bubrezima, srcu i plućima septičnih pacova;
7. Aktivaciju simpatoadrenalno-medularnog (SAM) sistema, određivanjem koncentracije adrenalina i noradrenalina u krvi i nadbubrežnim žlezdama septičnih pacova;
8. Metabolizam glukoze i lipida određivanjem nivoa glukoze, laktata, L-karnitina, TG, ukupnih i pojedinačnih SMK, glicerola i PGC-1α/β u krvi i/ili jetri, bubrezima i srcu septičnih pacova;
9. Purinsku signalizaciju u izabranim strukturama mozga septičnih pacova određivanjem aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze (CD73);
10. Oštećenja membrana u izabranim strukturama mozga septičnih pacova, određivanjem odnosa nivoa PC i LPC.

3. MATERIJALI I METODE

Eksperimenti su sprovedeni prema odredbama Zakona o dobrobiti životinja Republike Srbije i Evropske direktive 2010/63/EU. Etička komisija za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je donela pozitivno mišljenje o dizajnu eksperimenta, a njegovu realizaciju je odobrila Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (br. rešenja 323-07-11574/2021-05, 323-07-05650/2021-05/1 i 323-07-11023/2023-05).

3.1. Eksperimentalne životinje

Za potrebe eksperimenata korišćeni su odrasli mužjaci soja Sprague-Dawley. Prosečna starost pacova je bila jedanaest nedelja, a telesna masa 312,71 ± 6,85 g. Pacovi su gajeni u standardnim uslovima za uzgoj u Vivarijumu Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Prosečna ambijentalna temperatura je iznosila 22 °C sa početkom svetle faze u 6 h ujutru i 12-časovnom svetlom odnosno tamnom fazom. Dve nedelje uoči početka eksperimenta, pacovi su u parovima nasumično raspoređivani po kavezima. Pacovima su vodootpornim markerom dodeljivane jedinstvene oznake na repu koje su održavane tokom eksperimenta. U svim opisanim eksperimentalnim procedurama, pacovima je bio obezbeđen *ad libitum* pristup vodi i hrani. Telesna masa kao i unos hrane i vode mereni su na nedeljnom nivou dve nedelje uoči početka eksperimenta i tokom celokupnog trajanja eksperimenta. Boce sa vodom su menjane na svaka 48 h dok je hrana dopunjavana jednom nedeljno.

3.2. Eksperimentalni dizajn

Rezultati ove doktorske teze prikupljeni su u dva nezavisna eksperimenta primenom dva različita eksperimentalna pristupa izazivanja sepse (označeni kao “FIP” ili “LPS” model sepse). U oba eksperimenta, pacovi su nasumično raspoređivani u tri eksperimentalne grupe:

a) **Kontrola** (označena sa “**C**”) je eksperimentalna grupa pacova kojima je, nakon četiri nedelje *ad libitum* pristupa vodi i hrani, i.p. u jednoj dozi injecirano 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0,9% NaCl) po kg t.m.
b) **Sepsa** (označena sa “**S**”) je eksperimentalna grupa pacova kojima je izazvana sepsa i.p. injekcijom rastvora LPS-a ili suspenzije fecesa, nakon četiri nedelje *ad libitum* pristupa

hrani i vodi.

c) **Meldonijum i sepsa** (označena sa "**M+S**") je eksperimentalna grupa pacova kojima je izazvana sepsa i.p. injekcijom rastvora LPS-a ili suspenzije fecesa, nakon četiri nedelje *ad libitum* pristupa hrani i vodi u kojoj je rastvoren meldonijum. Na osnovu merenja unosa vode i telesne mase pacova, na nedeljnom nivou je podešavana koncentracija vodenog rastvora tako da se postigne dnevni unos 300 mg meldonijuma po kg t.m. pacova.

U eksperimentima je korišćen komercijalno dostupan meldonijum proizvođača Shenzhen Calson Bio-Tech Co., Ltd. (Šenžen, Kina). Uoči eksperimenata, čistoća meldonijuma i njegova stabilnost u vodenom rastvoru tokom 48 sati potvrđene su tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom, u Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

U ovoj doktorskoj tezi korišćena su dva široko primenjivana modela za izazivanje sepse kod pacova: model endotoksemije zasnovan na i.p. aplikaciji LPS-a i model abdominalne polimikrobne sepse indukovane suspenzijom fecesa (FIP model). Mogućnost preciznog doziranja LPS-a čini odabrani model endotoksemije visoko reproducibilnim [83]. Sa druge strane, u FIP modelu se, u zavisnosti od telesne mase pacova, i.p. ubrizgava definisana doza suspenzija fecesa poznate koncentracije, čime se u abdomen pacova unose živi patogeni, a ne samo njihove komponente.

3.2.1. FIP model sepse

Dan uoči izazivanja sepse, iz kaveza je prikupljan feces pacova kontrolne eksperimentalne grupe ("C"). Feces je meren i rastvoran u komercijalno dostupnom sterilnom fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl) do finalne koncentracije od 0,5 g suve mase fecesa po ml, nakon prekonoćnog mešanja na temperaturi 4 °C. Nerastvoreni delovi fecesa su uklanjani filtriranjem kroz četvorostruko presavijenu gazu. Dobijena suspenzija je čuvana na 4 °C, a uoči injeciranja pacovima temperirana je na sobnu temperaturu. U cilju izazivanja sepse, pacovima S i M+S eksperimentalnih grupa je jednom i.p. injecirana suspenzija fecesa u dozi od 5 g po kg t.m. pacova. Korišćena je igla za jednokratnu upotrebu promera 25 G.

3.2.2. LPS model sepse

Na dan izazivanja sepse, pripreman je rastvor LPS-a koncentracije 5 mg/ml, rastvaranjem u komercijalnom fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl). Pripremljeni rastvor je čuvan na 4 °C i temperiran na sobnu temperaturu pred injeciranje. Pacovima S i M+S eksperimentalnih grupa je jednom i.p. injeciran pripremljeni rastvor u dozi od 5 mg LPS-a po kg t.m. pacova. Korišćena je igla za jednokratnu upotrebu promera 25 G.

3.3. Monitoring pacova po izazivanju sepse i prikupljanje tkiva za analizu

Po injeciranju odgovarajućih rastvora, pacovi su narednih devet sati bili pod stalnim nadzorom. Na svakih sat vremena merena im je telesna temperatura prislanjanjem sonde digitalnog infracrvenog termometra (Prizma, Kragujevac) na početak ušnog kanala.

Monitoring po izazivanju sepse je obuhvatio i procenu neurološkog statusa pacova. Naime, na svakih sat vremena testiran je set refleksa na osnovu kojih se procenjuje nivo očuvanosti somatomotorne funkcije kod pacova [21,22]. Praćeni su *pinna* refleks, kornealni refleks, refleks uspravljanja (eng. *righting reflex*) i refleks fleksije repa i bekstva (eng. *tail flexion and escape reflex*). *Pinna* refleks je testiran blagim dodirivanjem početnog dela spoljašnjeg ušnog kanala velikom metalnom pincetom, pri čemu se očekivao trzaj glave. Kornealni refleks je testiran prinošenjem pincete rožnjači pri čemu se očekivalo nevoljno zatvaranje oka. Ova dva refleksa predstavljaju jednostavne neposturalne somatomotorne odgovore. Refleks uspravljanja testiran je postavljanjem pacova na leđa, pri čemu bi normalna reakcija podrazumevala brz povratak pacova u položaj sa sve četiri šape na podlozi. Refleks fleksije repa i bekstva je testiran prihvatanjem repa pacova velikom metalnom pincetom uz primenu kratkotrajnog snažnog pritiska, pri čemu se očekivalo savijanje repa uz trzaj i bežanje životinje od izvora neprijatnog stimulusa. Ovim refleksima se procenjuje očuvanost posturalne somatomotorne funkcije pacova. Nivo očuvanosti svakog refleksa bodovan je ocenama: 0, 1 i 2, gde je ocena „0“ označavala izostanak refleksa, „1“ oslabljen refleks (odložena reakcija ≥ 10 sekundi), a „2“ potpunu očuvanost refleksnog odgovora.

Prema jedinstvenim oznakama na repu, vođena je evidencija vremena uginuća na osnovu koje su konstruisane Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja S i M+S eksperimentalnih grupa. Tkiva uginulih životinja nisu korišćena za analize.

U oba eksperimenta, preživeli pacovi su dekapitovani giljotinom između osmog i devetog

sata po injeciranju. Nakon dekapitovanja, krv iz trupa pacova (eng. *trunk blood*) je prikupljana i inkubirana na temperaturi 4 °C do formiranja krvnog ugruška. Uzorci seruma dobijeni su centrifugiranjem ukupne krvi 10 min pri brzini 2.000 g (Sorvall Super T21 Benchtop Superspeed®, Thermo Scientific, Voltam, SAD) i temperaturi 4 °C. Za potrebe analiza izolovani su jetra, srce, bubrezi, pluća, nadbubrežne žlezde i mozak pacova.

Disekcijom mozga su izolovane pojedinačne moždane strukture od interesa: mali mozak, produžena moždina i prefrontalni korteks. Po jedan isečak jetre, srca, bubrega i pluća približnih dimenzija 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm, kratko je ispiran u hladnom kupovnom fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl) i potapan u 10% puferovani formalin. Dalji postupak pripreme tkiva za histološka bojenja opisan je u potpoglavlju *3.4.*

Radi procene prisustva edema mozga, preostalo moždano tkivo je neposredno nakon disekcije moždanih struktura mereno na analitičkoj vagi, čime je određivana „vlažna" masa tkiva. Uzorci su zatim postavljani na zasebne komade aluminijumske folije i sušeni u sušnoj komori (Memmert GmbH, Nemačka) na 180 °C do postizanja konstantne „suve" mase tkiva. Na osnovu dobijenih vrednosti je računat odnos suve i vlažne mase tkiva, a rezultati su potom normalizovani u odnosu na kontrolnu grupu. Isti postupak primenjivan je i na uzorcima pluća iz FIP modela sepse, u cilju procene prisustva edema pluća. U ovu svrhu, od levog plućnog krila svakog pacova uziman je isečak približnih dimenzija 1 cm × 1 cm × 1 cm. Preostala izolovana tkiva i serum pacova su čuvani na - 80 °C do nastavka analiza.

3.4. Histološka analiza

3.4.1. Histološko bojenje preseka jetre, bubrega, srca i pluća hematoksilin-eozinom (HE) i perjodnom kiselinom-Šifovim reagensom (PAS)

Uzorci jetre, srca, bubrega i pluća fiksirani su tokom 48 h u 10% puferovanom formalinu. Naredna 24 h tkiva su ispirana pod mlazom česmenske vode, dehidrirana u razblaženjima etanola rastuće koncentracije (70, 96 i 100%) i lipofilizovana u apsolutnom ksilolu. Tkiva su zatim kalupljena u parafinske blokove i sečena standardnim mikrotomom na preseke debljine 5 μm.

Za hematoksilin-eozin (HE) bojenje, tkivni preseci su najpre dva puta po 5 min inkubirani u apsolutnom ksilolu, a zatim po 3 min u seriji rastvora etanola opadajuće koncentracije (100, 96 i 70%). Nakon bojenja u hematoksilinu tokom 5 minuta i ispiranja destilovanom vodom, preseci su bojeni 1% vodenim rastvorom eozina tokom 15 minuta i ponovo

ispirani destilovanom vodom. Preseci su potom ispirani po 2-3 min u seriji rastvora etanola rastućih koncentracija (70, 96 i 100%) uz završno ispiranje u 70% etanolu. Pre HE bojenja, preseci bubrega su najpre bojeni perjodnom kiselinom i Šifovim reagensom (PAS). PAS bojenje je uključivalo petominutnu inkubaciju u 0,5% rastvoru perjodne kiseline i sledstvenu 15-minutnu inkubaciju u Šifovom reagensu uz međukorake ispiranja destilovanom vodom.

Obojeni preseci su prekrivani DPX medijumom i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom Olympus BX43 (Olympus, Tokio, Japan). Na svakom preseku je analizirano najmanje deset različitih vidnih polja. Mikrografije su slikane kamerom Leica ICC50W (Leica, Veclar, Nemačka).

3.4.2. Prinicip histološke procene oštećenja jetre, bubrega, srca i pluća

U histopatološkoj analizi preseka jetre korišćen je sistem ocenjivanja po Suzukiju. Ovaj sistem ocenjivanja uzima u obzir stepen opstrukcije sinusoida, vakuolizacije hepatocita i nekroze parenhima jetre. Preseci bubrega su analizirani na osnovu zastupljenosti atrofije i nekroze tubulocita, gubitka njihovog četkastog pokrova i opstrukcije lumena bubrežnih tubula. U oba sistema ocenjivanja ocena “0” odgovara odsustvu navedenih promena dok ocena “4” odgovara najvišem stepenu zastupljenosti promena. Preseci srčanog tkiva su analizirani sistemom ocenjivanja po Dalasu koji uzima u obzir brojnost infiltriranih ćelija imunskog sistema (na skali od 0 do 3) kao i njihovu distribuciju (1 - fokalna, 2 - konfulentna, 3 - difuzna). Na presecima plućnog tkiva analizirano je prisustvo i stepen zastupljenosti hijalinih membrana, emfizema, zadebljanja alveolarnih septi, krvarenja, nekroze i inflamatornih infiltrata. Svaka od navedenih patohistoloških promena ocenjivana je na skali od 1 do 4, pri čemu je ocena „1“ označavala blage, a ocena „4“ izražene promene.

3.5. Biohemijske analize

3.5.1. Određivanje koncentracije glukoze, triglicerida (TG) i ukupnih slobodnih masnih kiselina (SMK) u serumu pacova

Koncentracije glukoze, TG i ukupnih SMK u serumu pacova određivane su uslužno u laboratoriji Centra za medicinsku biohemiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, korišćenjem komercijalno dostupnih kolorimetrijskih kompleta.

3.5.2. Određivanje aktivnosti enzima jetre, koncentracije kardijačnog troponina T (cTnT), uree i kreatinina u serumu pacova

Za procenu oštećenja jetre, u serumu pacova određivana je aktivnost enzima jetre ALT, AST i ALP. Očuvanost funkcije bubrega procenjivana je merenjem koncentracije uree i kreatinina, dok je povećanje nivoa cTnT-a u serumu korišćen kao indikator oštećenja srčanog mišića. Za potrebe ovih analiza korišćeni su komercijalno dostupni kompleti (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka), a merenja su izvršena na automatskom analizatoru Roche Cobas e601 (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka).

3.5.3. Određivanje markera oksidativnog stresa

U cilju procene nivoa oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta, u jetri, bubrezima i srcu, u oba modela sepse, određivana je aktivnost SOD, uključujući izoforme CuZnSOD i MnSOD, CAT i GSH-Px, kao i koncentracije LPO. U LPS modelu sepse, u ovim organima je određivan i odnos GSH/GSSG. U plućima, analiziranim u FIP modelu sepse, osim aktivnosti navedenih enzima, određivana je aktivnost GST, GR, ukupni sadržaj glutationa, kao i koncentracije PCO i LPO. U izolovanim moždanim regionima, u oba modela sepse, određivani su PAB, AOPP i LPO.

3.5.3.1. Postupak pripreme uzorka

Za potrebe određivanja markera oksidativnog stresa isečci jetre, bubrega, srca odnosno pluća mase oko 200 mg homogenizovani su u deset volumena hladnog saharoznog pufera (0,25 M saharoza; 0,05 M Tris; 0,1 M EDTA; pH 7,4) pomoću Ultra-Turrax ručnog homogenizera (IKA-Werke, Staufen, Nemačka). Dobijeni homogenati su zatim kratko sonifikovani (Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., SAD). Iz sonifikata je izdvojen deo za određivanje ukupnog glutationa (GSH), dok je preostali deo ultracentrifugiran 90 min pri 100.000 g i 4 °C (L7-55, Beckman, SAD). Alikvot dobijenog supernatanta je korišćen za određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Loriju [191], opisanom u potpoglavlju *3.8.2*., dok su preostali alikvoti čuvani na -80 °C do izvođenja analiza. Postupak pripreme uzoraka za određivanje markera oksidativnog stresa u izolovanim moždanim strukturama detaljno je opisan u potpoglavljima *3.8.1*. i *3.8.2*.

3.5.3.2. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost ukupne SOD određivana je adrenalinskom metodom zasnovanom na

sposobnosti enzima da inhibira autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u alkalnoj sredini [192]. Reakcija se prati spektrofotometrijski na 480 nm pri 25 °C (Shimadzu UV 1900i, Japan), a promena apsorbance odražava brzinu formiranja adrenohroma. Ukupna aktivnost SOD preračunavana je na osnovu procenta inhibicije autooksidacije u odnosu na slepu probu (eng. *blank*), pri čemu jedna jedinica aktivnosti (IU) odgovara količini enzima koja dovodi do 50% inhibicije reakcije. Za određivanje aktivnosti pojedinačnih izoformi, primenjivana je selektivna inaktivacija CuZnSOD dodatkom 2 mM NaCN u reakcionu smešu. Aktivnost MnSoD je merena u prisustvu inhibitora dok je aktivnost CuZnSOD dobijena oduzimanjem aktivnosti MnSOD od ukupne SOD aktivnosti.

3.5.3.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT određivana je metodom zasnovanom na sposobnosti enzima da razgradi vodonik-peroksid (H_2O_2) do vode i kiseonika [193]. Brzina razgradnje H_2O_2 praćena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 240 nm, pri čemu smanjenje apsorbance odražava aktivnost CAT. Reakcija je izvođena u kvarcnoj kiveti, u koju je najpre sipan rastvor H_2O_2, a reakcija je započinjana dodavanjem uzorka. Promena apsorbance merena je tokom 3 minuta na 37 °C (Shimadzu UV 1900i, Japan). Uz primenu molarnog ekstinkcionog koeficijenta H_2O_2 na 240 nm (43,6 M^{-1} cm^{-1}), preračunavana je aktivnost enzima u IU po mg proteina.

3.5.3.4. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost GSH-Px određivana je metodom koja se zasniva na spregnutoj aktivnosti ovog enzima sa aktivnošću GR [194]. Naime, GSH-Px katalizuje oksidaciju GSH u GSSG uz redukciju organskih hidroperoksida, dok GR redukuje GSSG nazad u GSH uz istovremenu oksidaciju NADPH. Aktivnost GSH-Px detektuje se spektrofotometrijski praćenjem smanjenja apsorbance NADPH na talasnoj dužini od 340 nm. U kivetu su dodavani pufer, GSH, NADPH, EDTA, NaN_3, terc-butil hidroperoksid, uzorak i GR. Reakcija je praćena 3 minuta na 37 °C (Shimadzu UV 1900i, Japan), a aktivnost GSH-Px je preračunavana u odnosu na slepu probu kao nmol oksidovanog NADPH po minutu i mg proteina.

3.5.3.5. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)

Aktivnost GST određivana je metodom koja se zasniva na sposobnosti enzima da katalizuje vezivanje 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) za sulfhidrilnu grupu GSH-a, pri čemu nastaje CDNB-GSH konjugat [195]. Apsorbanca ovog konjugata na 340 nm proporcionalna je

aktivnosti GST u uzorku. Za analizu su u kvarcnu kivetu dodavani 0,5 M fosfatni pufer (pH 6,5), CDNB, GSH i uzorak, a reakcija je praćena tokom 3 minuta na 37 °C (Shimadzu UV 1900i, Japan). Aktivnost enzima preračunavana je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta CDNB-GSH konjugata ($9,6 \times 10^3$ M^{-1} cm^{-1}). Jedinica aktivnosti GST definisana je kao broj nmol nastalog CDNB-GSH konjugata u toku jedne minute po mg proteina.

3.5.3.6. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)

Aktivnost GR određivana je metodom koja se zasniva na sposobnosti enzima da katalizuje redukciju GSSG u GSH, pri čemu dolazi do oksidacije koenzima NADPH u $NADP^+$ [196]. Pad apsorbance na 340 nm usled pada koncentracije NADPH, koristi se za određivanje aktivnosti enzima. U kvarcnu kivetu dodavani su 0,5 M fosfatni pufer (pH 7,4), GSSG, EDTA, H_2O, NADPH i uzorak. Reakcija je praćena spektrofotometrijski na 340 nm tokom 3 minuta na 37 °C *(*Shimadzu UV 1900i, Japan). Aktivnost GR preračunavana je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta NADPH ($6,22 \times 10^3$ M^{-1} cm^{-1}), a jedinica aktivnosti GR definisana je kao broj nmol oksidovanog NADPH u minuti po mg proteina.

3.5.3.7. Određivanje sadržaja glutationa (GSH/GSSG)

Koncentracija ukupnog GSH određivana je metodom zasnovanoj na cikličnoj reakciji u kojoj 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina) (DTNB) oksiduje GSH, pri čemu nastaju GSSG i 2-nitro-5-tiobenzoična kiselina (TNB), a zatim GR redukuje GSSG nazad u GSH uz oksidaciju NADPH [197]. Formiranje TNB jedinjenja prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm, a intenzitet apsorbance proporcionalan je ukupnoj koncentraciji GSH u uzorku. U kvarcnu kivetu su dodavani 0,3 mM NADPH, 6 mM DTNB, uzorak, ddH_2O do finalne zapremine od 1 mL i 5 μL GR. Apsorbanca je merena tokom 3 minuta na 37 °C (Shimadzu UV 1900i, Japan). Koncentracija ukupnog GSH preračunavana je u nmol po mg proteina. Za određivanje odnosa GSH/GSSG u deo uzorka je prethodno dodavan N-etiilmaleimid, koji inaktivira GSH, čime se selektivno meri samo GSSG.

3.5.3.8. Određivanje koncentracije LPO

Koncentracija LPO u jetri, bubrezima, srcu i plućima određivana je metodom po Rehncron i sar. [198]. Sonifikati tkiva su mešani sa 40% trihlorsirćetnom kiselinom i centrifugirani 10 minuta pri 10.000 g. Dobijeni supernatanti su prenošeni u nove epruvete, dodavana je 0,6% tiobarbiturna kiselina i smeša je inkubirana 10 minuta u vodenom kupatilu na

100 °C. Intenzitet boje koja se razvija je meren spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 532 nm (Shimadzu UV 1900i, Japan), a koncentracija LPO je preračunavana korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta od $1{,}56 \times 10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$.

Koncentracija LPO u moždanim strukturama određivana je metodom po Gérard-Monnier i sar. [199]. Uzorci su mešani sa 1-metil-2-fenilindolom i gvožđe hloridom u smeši acetonitril/metanol (3:1, v/v), a zatim inkubirani 1 h na 45 °C u mraku. Nakon centrifugiranja 15 min pri 13 000 g na 4 °C, dobijeni supernatanti su preneti u bunariće mikrotitar ploče, a apsorbanca je merena na 586 nm korišćenjem Wallac 1420 VICTOR2 čitača (PerkinElmer Inc., SAD). Za konstruisanje standardne krive korišćeni su rastvori 1,1,3,3-tetrametoksipropana poznate koncentracije, a koncentracija LPO u uzorcima je preračunavana u μM.

3.5.3.9. Određivanje koncentracije proteinskih karbonila (PCO)

Koncentracija PCO je određivana metodom zasnovanoj na reakciji 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) sa karbonilnim grupama proteina, pri čemu nastaje 2,4-dinitrofenilhidrazon [200]. Uzorak je najpre razblaživan destilovanom vodom, zatim je dodavan DNPH i smeša inkubirana 10 minuta u mraku. Nakon dodatka NaOH, smeša je inkubirana još 10 minuta na svetlu. Apsorbanca nastalog 2,4-dinitrofenilhidrazon je merena na 450 nm (Shimadzu UV 1900i, Japan), a vrednosti PCO su preračunavane na osnovu standardne krive.

3.5.3.10. Određivanje prooksidativnog-antioksidativnog balansa (PAB)

PAB je određivan metodom po Alamdari i sar. [201]. Standardna kriva je konstruisana korišćenjem rastvora H_2O_2 i mokraćne kiseline. Uzorci i standardi su dodavani u mikrotitar ploču, nakon čega je dodavan rastvor 3,3’,5,5’-tetrametilbenzidina i ploča inkubirana na 37 °C u mraku. Reakcija je zaustavljana hlorovodoničnom kiselinom, a apsorbanca merena na 450 nm korišćenjem Wallac 1420 VICTOR2 čitača (PerkinElmer Inc., SAD). Dobijene vrednosti PAB izražene su u ekvivalentima H_2O_2.

3.5.3.11. Određivanje koncentracije produkata napredne oksidacije proteina (AOPP)

Koncentracija AOPP u uzorcima određivana je modifikovanom metodom po Witko-Sarsat i sar. [202]. Ova metoda se zasniva na reakciji AOPP prisutnih u uzorku sa glacijalnom sirćetnom kiselinom i kalijum-jodidom u fosfatnom puferu. Ovom reakcijom se razvija bojeno jedinjenje čija je apsorbanca merena na 340 nm korišćenjem Wallac 1420 VICTOR2 čitača mikrotitar ploča (PerkinElmer Inc., SAD). Standardna kriva konstruisana je korišćenjem rastvora

hloramina T, a koncentracija AOPP u uzorcima izražena je u ekvivalentima hloramina T.

3.5.4. Određivanje aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze (CD73)

U izolovanim moždanim strukturama određivana je aktivnost ekto-5'-nukleotidaze (sin. CD73). Metoda se zasniva na merenju oslobađanja neorganskog fosfata (Pi) tokom konverzije adenozin monofosfata (AMP) u adenozin, koju katalizuje CD73. Za analizu su korišćeni uzorci ukupnih proteina, čiji su postupak ekstrakcije i određivanja koncentracije opisani u potpoglavljima *3.8.1.* i *3.8.2.*

Proteinskim uzorcima su dodavani 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) i 5 mM $MgCl_2$, nakon čega su inkubirani na 37 °C tokom 10 minuta. Za svaki uzorak pripremana je i odgovarajuća slepa proba (eng. *blank*) radi korekcije Pi koji ne potiče od aktivnosti CD73. U sve epruvete, osim u blank reakcije, dodavan je AMP, a reakcioni miks je inkubiran na 37 °C tokom 30 minuta. Enzimska reakcija je zaustavljana dodavanjem hladne 3M $HClO_4$, nakon čega su epruvete odmah stavljane na led. Sadržaj epruveta zatim je prenošen u bunariće mikrotitar ploče i mešan sa malahit zeleno reagensom, uz inkubaciju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 650 nm pomoću Wallac 1420 VICTOR2 čitača mikrotitar ploča (PerkinElmer Inc., SAD). Standardna kriva konstruisana je na osnovu apsorbanci serijskih razblaženja K_2HPO_4. Aktivnost CD73 preračunata je u nmol Pi/mg/min i izražena kao procenat vrednosti kontrolne grupe.

3.6. Hromatografske analize

Za određivanje koncentracija glukoze, laktata, L-karnitina, glicerola, triglicerida, ukupnih i pojedinačnih slobodnih masnih kiselina u tkivnim homogenatima i serumu korišćene su različite vrste hromatografskih analiza. Ova metode se zasnivaju na interakciji analita iz uzorka sa stacionarnom i mobilnom fazom, pri čemu vreme zadržavanja analita u hromatografskom sistemu varira u zavisnosti od njihovog afiniteta prema fazama. Bez obzira na način detekcije signala, koncentracija analita se preračunava na osnovu intenziteta signala dobijenog za rastvor standarda. Rastvori standarda su pripremani u istom puferu koji je korišćen za pripremu uzoraka.

3.6.1. Postupak pripreme uzorka

Za potrebe određivanja koncentracije L-karnitina, glukoze, glicerola i laktata u jetri, srcu i bubrezima, tkivo mase 50 mg je macerirano u ultračistoj vodi Ultra-Turrax ručnim homogenizerom (IKA-Werke, Štaufen, Nemačka) i inkubirano u ultrazvučnom kupatilu na

temperaturi 0 °C do potpune homogenizacije. Homogenati tkiva su zatim centrifugirani 30 min na 16.000 g (Sorvall Super T21 Benchtop Superspeed®, Thermo Scientific, Voltam, SAD). Izdvojeni supernatanti su čuvani na - 80 °C do opisanih analiza.

Za određivanje koncentracije adrenalina i noradrenalina, obe nadbubrežne žlezde su homogenizovane Ultra-Turrax ručnim homogenizerom (IKA-Werke, Štaufen, Nemačka) u DEPROT puferu (2% EGTA; 0,2 $HClO_4$; 0,2% $MgCl_2$). Homogenati su kratko sonifikovani i zatim centrifugirani 30 min na 18.000 g pri temperaturi 4 °C (Sorvall Super T21 Benchtop Superspeed®, Thermo Scientific, Voltam, SAD). Izdvojeni supernatanti su istog dana korišćeni za određivanje koncentracije adrenalina i noradrenalina.

Za određivanje koncentracije TG i masnokiselinskog profila jetre, bubrega i srce, tkivo mase 150 mg je macerirano u 2 ml smeše hloroforma i metanola (2:1 v/v). Nakon inkubacije u ultrazvučnom kupatilu na temperaturi 0 °C, u uzorke je dodavan 1 ml komercijalno dostupnog sterilnog fiziološkog rastvora (0,9% NaCl). Uzorci su centrifugirani pri brzini 12.000 g (Sorvall Super T21 Benchtop Superspeed®, Thermo Scientific, Voltam, SAD) i izdvojeni supernatant je prebacivan u nove epruvete radi koraka uparavanja azotom. Suvi ostatak izdvajan uparavanjem je resuspendovan u 3 ml heksana. Alikvot zapremine 1 ml je sačuvan na - 80 °C do analize opisane u potpoglavlju *3.6.5*. Ostatak uzorka je, nakon dodavanja 1 ml 2 M metanolnog rastvora KOH, inkubiran 2 min na 70 °C u ultrazvučnom kupatilu. Zaostali KOH je neutralisan dodavanjem 2 M metanolnog rastvora hlorovodonične kiseline. Za analizu opisanu u potpoglavlju *3.6.6*, u uzorke je dodavano po 3 ml heksana kako bi se izdvojila organska faza koja je potom uparavana. Dobijena suva supstanca je resuspendovana u 1 ml heksana. U heksan korišćen u završnom koraku je prethodno dodato 50 µl metilstearinske kiseline (C19:0) koja služi kao interna kontrola prilikom određivanja masnokiselinskog profila uzorka. Svi uzorci su sačuvani na - 80 °C do nastavka analiza.

3.6.2. Određivanje koncentracije L-karnitina

Koncentracija L-karnitina je određivana hromatografijom na tankom sloju. Kao stacionarna faza je korišćen sloj silike (kat. br. 5559, Merck, Darmštat, Nemačka), a kao mobilna faza smeša acetonitrila i vode (1:1 v/v). Uzorci su nanošeni na stacionarnu fazu u zapremini od 2 µl pomoću aparata CAMAG Linomat 5 (Camag, Mutenc, Švajcarska). Hromatografske trake su snimljene na talasnoj dužini 260 nm u uređaju CAMAG TLC Scanner 3 (Camag, Mutenc, Švajcarska). Dobijeni hromatogrami su analizirani upotrebom softvera WinCATS 1.4.2.8121

(Camag, Mutenc, Švajcarska). Koncentracija L-karnitina izračunata je na osnovu intenziteta traka dobijenih za standarde poznate koncentracije.

3.6.3. Određivanje koncentracije glukoze, glicerola i laktata

Koncentracija glukoze, glicerola i laktata je određivana jonoizmenjivačkom hromatografijom na hromatografskom sistemu Dionex ICS-3000 Chromatographic System (Thermo Scientific, Votlam, SAD). Koncentracije glukoze i glicerola su određivane iz istog uzorka na osnovu razlike u vremenu retencije, koje predstavlja period od injeciranja uzorka do detekcije analita po izlasku iz hromatografske kolone. Proces nanošenja 25 µl uzorka na kolonu je automatizovan pomoću autosemplera ICS AS-DV 50 (Dioneks, Sanivejl, SAD). Za detekciju signala korišćen je pulsni amperometrijski detektor sa Ag/AgCl radnom odnosno referentnom elektrodom. Dobijeni signal je analiziran i kvantifikovan u softveru Chromeleon 6.7.2 (Thermo Scientific, Voltam, SAD). U **Tabeli 2** su objedinjeni eksperimentalni uslovi primenjivani u izvođenju jonoizmenjivačke hromatografije. Koncentracija odgovarajućeg analita izračunata je na osnovu intenziteta signala dobijenih za standarde poznate koncentracije.

Analit	***Jonoizmenjivačka kolona***	***Mobilna faza***	***Gradijent koncentracije mobilne faze***	***Brzina protoka mobilne faze; Temperatura***
Glukoza i glicerol	CarboPac™ PA100 (kat. br. 043055, Dionex, Sanivejl, SAD)	A: utračista voda B: 600 mM NaOH C: 600 mM CH_3COONa	0–5 min: 85% A, 15% B; 5–12 min: 83%A, 15% B, 2%C; 12–20 min: 81% A, 15% B, 4% C; 20–30 min: 60% A, 20% B 20% C.	700 µl/min; 30 °C
Laktat	IonPac™ AS15 (kat. br. 053940, Dionex, Sanivejl, SAD)	smeša ultračiste vode i 100 mM KOH	0–15 min, 31–36 min: 10 mM KOH; 15–25 min: 10–45 mM KOH; 25-26 min: 45 mM KOH; 26–31 min: 45–10 mM KOH.	1000 ml/min; 30 °C

Tabela 2. Pregled eksperimentalnih uslova primenenih za jonoizmenjivačku hromatografiju

3.6.4. Određivanje koncentracije adrenalina i noradrenalina

U cilju analize aktivacije SAM sistema, određivana je koncentracija adrenalina i noradrenalina u serumu i nadbubrežnim žlezdama pacova.

Koncentracija adrenalina i u noradrenalina u serumu je izvršena uslužno u okviru komercijalno dostupne ponude biohemijske laboratorije BioMedica (Beograd, Republika Srbija). Za ove potrebe su korišćeni alikvoti seruma koji nisu prethodno odmrzavani za druge analize.

Koncentracija adrenalina i noradrenalina u nadbubrežnim žlezdama je određivana tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom na sistemu Dionex UltiMate 3000 HPLC System (Thermo Scientific, Voltam, SAD) spregnutom sa elektrohemijskom detekcijom. Nakon postupka pripreme opisanog u potpoglavlju *3.6.1*, 50 µl uzorka je nanošeno na HPLC kolonu Acclaim™ Polar Advantage II (kat. br. 063197, Thermo Scientific, Voltam, SAD). Mobilnu fazu je činila smeša 98% NH_4HCO_2 i 2% metanola, a brzina protoka mobilne faze iznosila je 500 µl/min. Dobijeni signal je analiziran i kvantifikovan u softveru Chromeleon 7 (Thermo Scientific, Voltam, SAD). Koncentracija adrenalina i noradrenalina u uzorcima su računate na osnovu intenziteta signala dobijenog za standarde poznate koncentracije.

3.6.5. Određivanje koncentracije triglicerida (TG)

Sadržaj TG je određivan hromatografijom na tankom sloju. Kao stacionarna faza je korišćen sloj silike (kat. br. 105641, Merck, Darmštat, Nemačka). Postupak nanošenja 2 µl uzorka na stacionarnu fazu je automatizovan upotrebom autosemplera Automatic TLC Sampler 4 (Camag, Mutenc, Švajcarska). U zavisnosti od pozicije uzoraka tokom migracije na stacionarnoj fazi, naredni rastvori su korišćeni kao mobilna faza:

1. *0–25* mm: smeša hloroforma, metanola i sirćetne kiseline u zapreminskim odnosima 90:10:1;
2. *25–70* mm: smeša heksana, deietiletra i acetona u odnosu 60:40:5;
3. *70–85* mm: smeša heksana i dietiletra u jednakim zapreminskim odnosima;
4. *85–90* mm: apsolutni heksan.

Po završetku migracije uzoraka, stacionarna faza je sušena u mraku. U cilju povećanja osetljivosti analize, pristupljeno je derivatizaciji uzoraka smešom metanola i koncentrovane sumporne kiseline u odnosu 9:1 (v/v). Hromatografske trake koje su se pojavile inkubiranjem stacionarne faze na 80 °C snimane su uređajem CAMAG TLC Scanner 3 (Camag, Mutenc,

Švajcarska). Dobijeni hromatogrami su analizirani upotrebom softvera WinCATS 1.4.2.8121 (Camag, Mutenc, Švajcarska). Koncentracija triglicerida u uzorcima izračunata je na osnovu intenziteta traka dobijenih za standarde poznate koncentracije.

3.6.6. Određivanje masnokiselinskog profila

Separacija i detekcija pojedinačnih masnih kiselina vršena je gasnom hromatografijom spregnutom sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Uzorci su u zapremini od 1 μl injecirani u gasnohromatografski sistem Focus GC (Thermo Scientific, Voltam, SAD) spregnut sa masenim spektrometrom PolarisQ (Thermo Scientific, Voltam, SAD). Injeciranje uzoraka vršeno je u „split" režimu 50:1 čime je postignuto koncentrovanje uzorka uz sprečavanje preopterećenja kolone. Kao noseći gas korišćen je helijum brzine protoka 1 ml/min. Temperatura u sistemu je iznosila najpre 50 °C nakon čega je sledilo postepeno povećanje temperature do 230 °C. Primenjivan je sledeći temperaturni režim: 50 °C prvih 1 min, a zatim linearni porast temperature do 200 °C uz gradijent promene 25 °C/min i najzad 230 °C poslednjih 18 min. Temperatura injektora je iznosila 250 °C. Izvršeni su separacija i određivanje koncentracije ukupno 13 različitih masnih kiselina. U slučaju gde *cis*- i *trans*- izoforma masne kiseline poseduju suviše bliska vremena retencije, koncentracija je izražena kao suma dve izoforme.

3.7. Maseno-spektrometrijske analize

Za detekciju pikova PC i LPC u izolovanim moždanim strukturama korišćena je masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa (eng. *matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight*, MALDI-TOF). Uzorci tkiva su najpre homogenizovani pomoću Ultra-Turrax ručnog homogenizatora (IKA-Werke, Štaufen, Nemačka) u smeši hloroforma i metanola (2:1 v/v), a potom centrifugirani 10 min (Microcentrifuge 5417R, Eppendorf, Nemačka) na brzini 3.000 g i temperaturi od 4 °C. Centrifugiranjem je postizavano izdvajanje gornjeg vodenog sloja, koji sadrži proteine i polarne molekule, i donjeg organskog sloja, bogatog lipidima. Organski sloj je pažljivo prikupljan pipetom i prenošen u čistu epruvetu, sušen pod protokom gasovitog azota i potom resuspendovan u 0,5M 2,5-dihidroksibenzojevoj kiselini.

Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na pločicu od nerđajućeg čelika i ostavljani da se osuše. Maseni spektri dobijani su pomoću Voyager DE-Pro MALDI-TOF masenog spektrometra (Sciex, SAD), korišćenjem azotnog lasera talasne dužine 337 nm, u "reflektor" modu pod

uslovima „odložene ekstrakcije“ (vreme kašnjenja od 100 ns). Dobijeni spektri obrađeni su u softveru Data Explorer verzija 4.9 (Applied Biosystems, SAD). Najinteznivniji pikovi PC i LPC su korišćeni za izračunavanje odnosa PC/LPC.

3.8. Molekularno-biološke analize

3.8.1. Izolacija ukupnih proteina

Za izolaciju ukupnih proteina jetre, bubrega, srca i pluća na analitičkoj vagi je odmeravan isečak tkiva mase oko 200 mg. Tkivo je potom sitnjeno Ultra-Turrax ručnim homogenizerom (IKA-Werke, Štaufen, Nemačka) u hladnom RIPA puferu (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1% SDS; 0,5% Triton X-100; 1% NP-40; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA). U RIPA pufer je prethodno dodavan koktel proteaznih (Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets, Thermo Scientific, Voltam, SAD) i fosfataznih inhibitora (1 mM Na-ortovanadat). Tkivo jetre je homogenizovano u deset volumena RIPA pufera, dok je za uzorke srca, bubrega i pluća korišćeno pet volumena pufera. Nakon homogenizacije, uzorci su kratko sonifikovani i inkubirani na ledu 10 min. Centrifugiranjem 20 min na 17.200 g (Sorvall Super T21 Benchtop Superspeed®, Thermo Scientific, Voltam, SAD) pri temperaturi 4 °C, izdvajan je supernatant koji je alikvotiran i čuvan na - 80 °C.

Za pripremu proteinskih uzoraka iz izolovanih moždanih struktura, tkiva su homogenizovana u 10 volumena hladnog saharoza/Tris-HCl pufera (250 mM saharoza, 50 mM Tris-HCl pH 7,4) pomoću Ultra-Turrax ručnog homogenizatora (IKA-Werke, Štaufen, Nemačka). Homogenati su zatim centrifugirani 10 minuta pri 1.000 g na 4 °C (Microcentrifuge 5417R, Eppendorf, Nemačka). Dobijeni supernatanti su prebacivani u nove epruvete i držani na ledu, dok su preostali peleti odvajani od zidova epruveta pažljivim pipetiranjem, resuspendovani u polovini početnog volumena homogenizacionog pufera i ponovo centrifugirani na isti način. Supernatanti iz oba ciklusa centrifugiranja su spajani i centrifugirani 20 minuta pri 10.000 g na 4 °C. Konačno dobijen supernatant je odbacivan, dok je pelet pažljivo resuspendovan u hladnom 5 mM Tris-HCl puferu (pH 7,4), alikvotiran i čuvan na - 80 °C do daljeg korišćenja.

3.8.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina homogenata analiziranih tkiva je određivana kolorimetrijski, metodom po Loriju [191]. Uzorci ukupnih proteina su razblaživani 50-100x dejonizovanom vodom (ddH_2O). Za konstruisanje standardne krive korišćena su razblaženja

albumina goveđeg seruma. Prema metodi po Loriju, u 100 µl razblaženog uzorka dodavano je 100 µl 2% SDS i 1 ml radnog reagensa (0,4% NaOH; 0,02% Na-K tartarat; 0,01% $CuSO_4$ u 2% Na_2CO_3). Nakon 10-minutne inkubacije na dnevnoj svetlosti, dodavano je 100 µl Folinovog reagensa i uzorci su inkubirani dodatnih 20 min u mraku. Koncentracija ukupnih proteina određivana je prema Lamber-Berovom zakonu, na osnovu vrednosti apsorbance izmerene na 750 nm.

3.8.3. Western blot analiza

Western blot metodom elektroforetskog razdvajanja i imunodetekcije proteina izvršena je relativna kvantifikacija proteina od interesa u tkivnim homogenatima i krvnom serumu.

3.8.3.1. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Ukupni proteini jetre, bubrega, srca, pluća i izolovanih moždanih struktura su razblaživani dodavanjem ddH_2O i 2x Lemli pufera (120 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% glicerol; 4% SDS; 0,02% bromfenol plavo) do finalne koncentracije 3 mg/ml. Uzorci seruma, izolovani procedurom opisanom u potpoglavlju *3.5*, razblaživani su u odnosu 1:1 v/v Tricin puferom (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 40% glicerol; 0,04% komasi plavo). Uoči korišćenja, u Lemli i Tricin pufere je dodavan redukujući agens 2-merkaptoetanol.

Ukupni proteini su elektroforetski razdvajani na osnovu molekulske mase u sistemu Mini Protein 2 (Bio Rad, Herkules, SAD). U zavisnosti od molekulske mase proteina od interesa (**Tabela 3**), pripreman je gel za razdvajanje koncentracije 8, 12 ili 15%. Na gel je nalivano 20-30 µg ukupnih proteina tkivnog homogenata, odnosno 2 µl razblaženog seruma. Pred nalivanje na gel, vršena je denaturacija proteina inkubacijom uzoraka u termobloku na temperaturi 95 °C u trajanju od 5 min.

Uzorci tkivnih homogenata su analizirani SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE) dok je za analizu uzoraka seruma korišćena Tricin SDS-PAGE. Ova modifikacija SDS-PAGE metode obezbeđuje višu rezoluciju u razdvajanju proteina male molekulske mase što je naročito korisno u analizi proteina seruma.

3.8.3.2. Transfer proteina sa gela na membranu

Transfer proteina sa gela na polivinilidifluorid (PVDF) membranu vršen je na 4 °C pomoću Trans-Blott® Cell sistema (Bio Rad, Herkules, SAD), pri konstantnoj voltaži od 100 V tokom 60 min. Korišćena je PVDF membrana promera pora 0,2–0,45 µm (Merck Millipore,

Burlington, SAD) u zavisnosti od molekulske mase proteina od interesa. Radi provere uspešnosti transfera, membrane su inkubirane u rastvoru Ponceau S boje koja nespecifično boji proteine.

3.8.3.3. Imunodetekcija i relativna kvantifikacija proteina

U cilju sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela, membrane su najpre inkubirane u 5% nemasnom mleku ili 5% albuminu goveđeg seruma pripremljenom u TBST puferu (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,2% Tween-20). U rastvoru primarnog antitela (**Tabela 3**) membrane su inkubirane preko noći na 4 °C. Membrane su ispirane TBST puferom od viška primarnog antitela i inkubirane sa sekundarnim antitelom (**Tabela 3**) na sobnoj temperaturi, u trajanju od 90 min. Nakon ispiranja viška sekundarnog antitela, na membrane je nanošen supstrat za vizualizaciju Clarity Western ECL (Bio Rad, Herkules, SAD). Pomoću uređaja ChemiDocTM Imager (Bio Rad, Herkules, SAD) i iBright CL1500 Imaging System (Thermo Scientific, Voltam, SAD), detektovan je i slikan hemiluminiscentni signal koji se razvija reakcijom između supstrata i peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP), kojom je konjugovano sekundarno antitelo. Sa membrana je zatim uklanjano sekundarno antitelo kako bi se omogućila inkubacija sa primarnim antitelima za β-aktin ili gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), u skladu sa već opisanim protokolom. U **Tabeli 3** je objedinjen spisak korišćenih antitela, zajedno sa detaljima eksperimentalnih uslova.

Signal je kvanitifikovan denzitometrijski, merenjem optičke gustine traka u programu ImageJ Software (National Institutes of Health, Merilend, SAD). Izmerene vrednosti su izražavane u odnosu na vrednosti izmerene za GAPDH ili β-aktin.

PRIMARNA ANTITELA			
Target protein	***Molekulaska masa***	***Kataloški broj i proizvođač antitela***	***Razblaženje***
HMGB1	24 kDa	*U serumu:* K-12 (Santa Cruz Biotechnology, SAD); *U tkivima:* (ab18256, Abcam, UK)	1:1000
p-NFκB p65 *(Ser311)*	65 kDa	ab194926 (Abcam, UK)	1:750
NFκB p65	65 kDa	CS-8242 (Cell Signaling Technology, SAD)	1:1000

Bax	21 kDa	CS-2772 (Cell Signaling Technology, SAD); sc-7480 (Santa Cruz Biotechnology, SAD)	1:1000 - 1:5000
Bcl-2	26 kDa	NB100-56098 (NovusBiologicals, SAD); sc-492 (Santa Cruz Biotechnology, SAD)	1:500 - 1:5000
Hp	38 kDa	ab256454 (Abcam, UK)	1:1000
CAT	60 kDa	ab16731 (Abcam, UK)	1:2000
CuZnSOD	17 kDa	ab16831 (Abcam, UK)	1:2000
MnSOD	26 kDa	ab13533 (Abcam, UK)	1:1000
Vim	57 kDa	M7020 (Agilent Dako, SAD)	1:500
Nrf-2	60 kDa	sc-365949 (Santa Cruz Biotechnology, SAD)	1:1000
PGC-1α/β	113 kDa	ab188102 (Abcam, UK)	1:1000
β-actin-HRP	42 kDa	ab49900 (Abcam, UK)	1:1000
GAPDH	36 kDA	MAB374 (Merck Millipore, SAD)	1:10 000
SEKUNDARNA ANTITELA		***Kataloški broj i proizvođač antitela***	***Razblaženje***
Goat anti-mouse IgG-HRP		ab97240 (Abcam, UK)	1:10 000
Goat anti-rabbit IgG-HRP		ab6721 (Abcam, UK)	1:30 000

Tabela 3. Spisak antitela i pregled eksperimentalnih uslova korišćenih za Western blot analizu

3.8.4. Enzimski imunoadsorbentni test (ELISA)

Koncentracija TNF u serumu pacova određivana je enzimskim imunoadsorbentnim testom (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Ovaj test se zasniva na specifičnoj reakciji između antitela na dnu bunarića mikrotitar ploče i ciljnog proteina. Kvantifikacija proteina se vrši razvijanjem bojene reakcije dodavanjem konjugovanog sekundarnog antitela i supstrata, pri čemu je intenzitet nastale boje direktno proporcionalan koncentraciji ciljnog proteina. Korišćen je komercijalno dostupan komplet (kat. br. E-EL-R2856, Elabscience, SAD). Uzorci seruma su prethodno razblaživani prema uputstvu proizvođača i nalivani u bunariće

mikrotitar ploče. Na mikrotitar ploču su nalivana i razblaženja TNF poznate koncentracije radi konstruisanja standardne krive. Nakon inkubacije mikrotitar ploče na 37 °C, dodavani su biotinilovano sekundarno antitelo i kompleks streptavidin-HRP. Dodavanjem supstrata 3',5',5'-tetrametilbenzidina, razvijana je bojena reakcija, a apsorbanca čitana na talasnoj dužini od 450 nm pomoću čitača mikrotitar ploča (Epoch, BioTek, SAD). Koncentracije TNF u uzorcima izračunate su na osnovu standardne krive.

3.9. Statistička analiza podataka

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji statistički su analizirani pomoću softverskog paketa GraphPad Prism, verzija 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., SAD). Na kraju eksperimenta sa LPS modelom sepse, veličina svih eksperimentalnih grupa iznosila je n = 8. U FIP modelu, usled mortaliteta, broj uzoraka korišćen za analize moždanih struktura, srca, jetre i bubrega bio je: 8 za C grupu, 12 za S grupu i 8 za M+S grupu. Za analize pluća, kao i za biohemijske i hematološke analize krvi, broj uzoraka u C, S i M+S grupama iznosio je redom 9, 8 i 7.

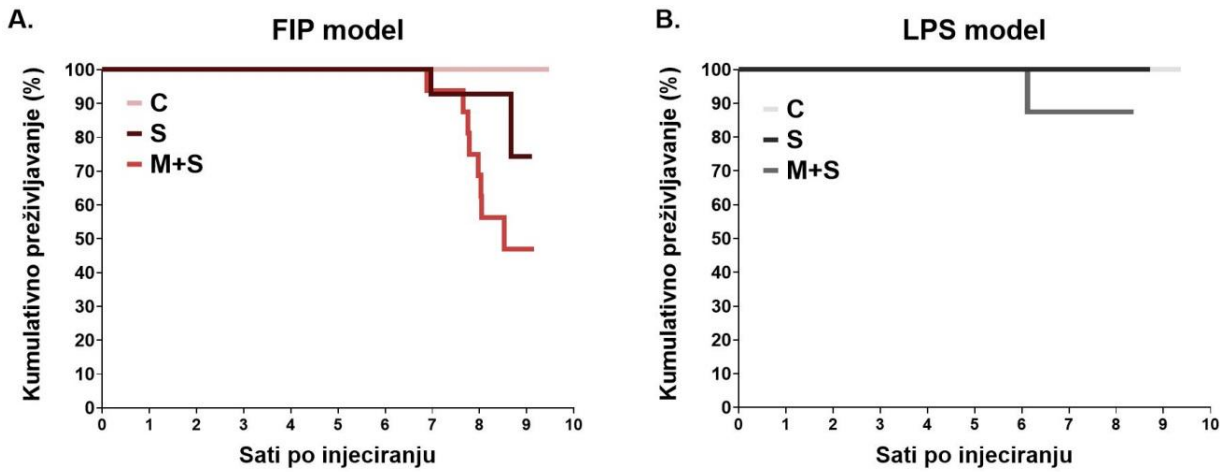
U svakom setu podataka najpre je ispitivano prisustvo autlajera, primenom ROUT testa, pri Q vrednosti od 1%. Nakon eliminacije autlajera, normalnost distribucije testirana je Šapiro-Vilk testom. Setovi podataka koji su pokazali normalnu distribuciju analizirani su pomoću jednofaktorskog (eng. *one-way*) ANOVA testa, dok je u *post hoc* analizi korišćen Tukijev test. Podaci koji nisu zadovoljavali uslove normalne distribucije analizirani su neparametarskim Kruskal-Volis testom, uz post hoc Dunov test. Kaplan-Meier krive preživljavanja poređene su primenom Log-rank testa. Kod krivih promene telesne temperature tokom vremena najpre je računata površina ispod krive (eng. *area under the curve*, AUC), nakon čega su dobijene numeričke vrednosti analizirane na prisustvo autlajera i normalnost distribucije, te su, u skladu sa tim, obrađene primenom odgovarajućih statističkih testova. Krive promene prosečnog skora refleksa analizirane su tako što su ocene refleksne funkcije sve tri eksperimentalne grupe upoređivane u svakom satu od injeciranja rastvora. Prag statističke značajnosti za sve statističke testove određen je kao $P < 0,05$. Ukoliko nije drugačije naglašeno, podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM) i grafički prikazani u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu.

4. REZULTATI

4.1. Uticaj pretretmana meldonijumom na preživljavanje pacova u FIP i LPS modelima sepse

Na **Slici 8** prikazane su krive preživljavanja pacova C, S i M+S eksperimentalnih grupa u FIP i LPS modelima sepse.

U FIP modelu, u S grupi pacova u sedmom i devetom satu su uginule dve od ukupno 16 životinja u grupi, dok je u M+S grupi uginulo osam od 16 jedinki (**Slika 8A**). U M+S grupi je takođe prvo uginuće zabeleženo u sedmom satu, a do devetog sata smrtnost je dostigla 50% (**Slika 8A**). Kako je tokom devetočasovnog praćenja, u S grupi zabeležena smrtnost od 12,5%, uočena razlika u smrtnosti između ove dve eksperimentalne grupe bila je statistički značajna prema Log-Rank testu.



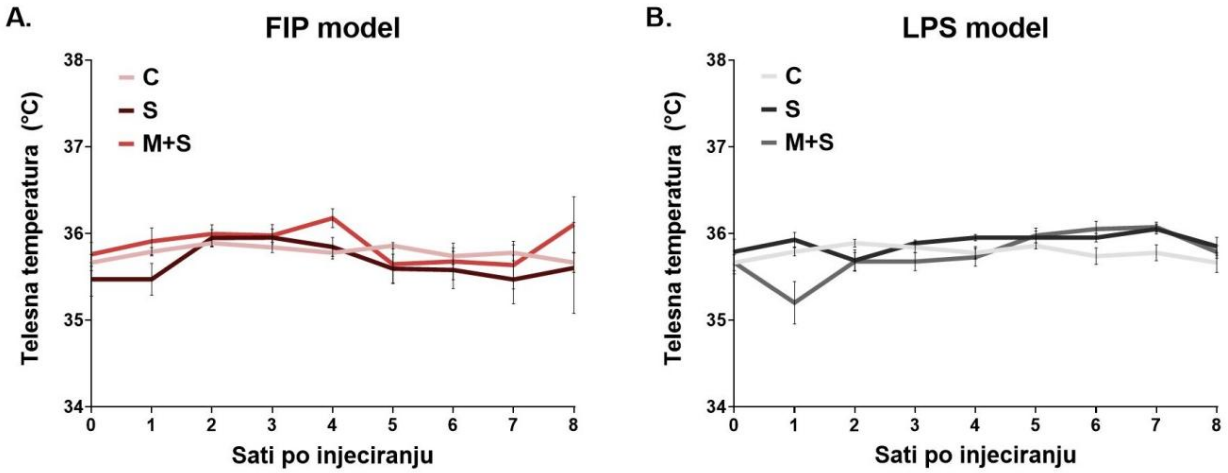
Slika 8. Krive preživljavanja pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse.

U LPS modelu nije zabeleženo uginuće pacova S grupe, dok je u M+S grupi u sedmom satu, uginula jedna jedinka od ukupno osam (**Slika 8B**). Stoga, smrtnost pacova u M+S grupi u ovom modelu sepse iznosila je 12,5%. Prema Log-Rank testu, razlika u smrtnosti između S i M+S grupe u LPS modelu nije bila statistički značajna.

Pretretman meldonijumom je povećao smrtnost FIP-septičnih pacova, dok nije uticao na preživljavanje pacova sa LPS-om indukovanom sepsom.

4.2. Uticaj pretretmana meldonijumom na telesnu temperaturu pacova u FIP i LPS modelima sepse

Krive na **Slici 9** prikazuju vrednosti telesne temperature pacova C, S i M+S grupa tokom vremena u dva modela sepse. Poređenjem površine ispod krive, u FIP modelu sepse nije uočena statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa (**Slika 9A**), dok je u LPS modelu sepse, telesna temperatura pacova u M+S grupi bila statistički značajno niža u odnosu na S grupu (srednje vrednosti AUC ± standardna greška srednje vrednosti: C = 286,2 ± 0,24; S = 287,3 ± 0,20; M+S = 285,8 ± 0,49$^{\#}$; Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$; # označava poređenje sa S) (**Slika 9B**).



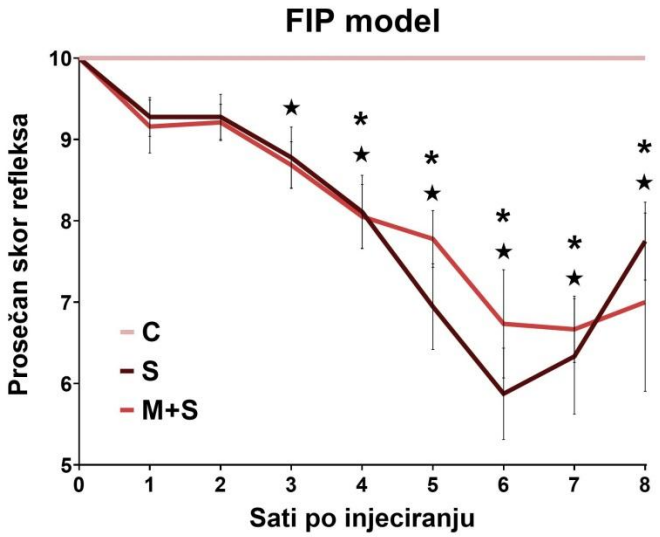
Slika 9. Krive promene telesne temperature pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM).

Pretretman meldonijumom nije uticao na telesnu temperaturu FIP-septičnih pacova, dok je u LPS sepsi doveo do njenog sniženja.

4.3. Uticaj pretretmana meldonijumom na očuvanost refleksa kod septičnih pacova

Na **Slici 10** prikazane su prosečne vrednosti skora refleksa tokom vremena kod pacova u FIP modelu. Po injeciranju suspenzije fecesa, nezavisno od pretretmana meldonijumom, zapažen je pad prosečnog skora refleksa u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovaj pad je kod pacova M+S grupe, u poređenju sa kontrolnom, dostigao statističku značajnost već u trećem satu po

injeciranju, dok od četvrtog sata bio statistički značajan kod pacova obe septične grupe. Od šestog sata pa do kraja perioda praćenja uočena je tendencija oporavka refleksnih funkcija pacova obe grupe, s tim da je oporavak pacova M+S grupe bio nešto sporiji. U LPS modelu sepse nije zabeleženo narušavanje refleksne funkcije pacova nijedne eksperimentalne grupe, te su vrednosti dobijene u ovom modelu izostavljene iz prikaza rezultata doktorske disertacije.



Slika 10. Kriva promene prosečnog skora refleksa pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP modelu sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje C sa S; ★ označava poređenje M+S sa C).

Refleksna funkcija je narušena u FIP sepsi nezavisno od pretretmana meldonijumom.

4.4. Uticaj pretretmana meldonijumom na markere oštećenja jetre, srca i bubrega u serumu septičnih pacova

U cilju procene oštećenja jetre izazvanog sepsom, kao i evaluacije potencijalnog zaštitnog efekta meldonijuma, u serumu pacova je analizirana aktivnost enzima jetre ALT, AST i ALP. U svrhu procene bubrežne funkcije, u serumu su određivane koncentracije uree i kreatinina. Kao marker oštećenja srčanog mišića određivana je koncentracija cTnT. Dobijene vrednosti su prikazane u **Tabeli 4**.

U FIP modelu, aktivnost AST i ALT u serumu bila je povišena kod septičnih pacova u

poređenju sa kontrolnim životinjama. Kod pacova prethodno tretiranih meldonijumom, aktivnost ovih enzima bila je značajna snižena u odnosu na pacove septične grupe bez pretretmana meldonijumom. Aktivnost ALP bila je značajno povišena u obe septične grupe u poređenju sa kontrolnom, bez razlike između S i M+S grupe. Isti obrazac promena u aktivnosti ovih enzima zabeležen je i u LPS modelu sepse.

U FIP modelu sepse, koncentracije uree i kreatinina bile su značajno povišene u serumu pacova obe septične grupe u poređenju sa kontrolnom, bez obzira na pretretman meldonijumom. U LPS modelu, koncentracija uree bila je povišena u S grupi u odnosu na kontrolnu. U M+S grupi LPS modela, koncentracija uree je bila snižena u odnosu na S grupu, ali i dalje značajno povišena u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija kreatinina u serumu u LPS modelu sepse nije se značajno razlikovala između ispitivanih grupa.

U oba modela sepse, koncentracija cTnT u serumu bila je povećana u obe septične grupe u odnosu na kontrolnu. U M+S grupi oba modela, koncentracija ovog parametra je bila značajno niža nego u S grupi.

	FIP model sepse			**LPS model sepse**		
Eksp. grupa / **Parametar**	**C**	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
AST (IU/l)	266,88 ± 19,34	345,17 ± 25,3*	243,50 ± 21,7$^{\#}$	271,15 ± 13,93	288,10 ± 18,12*	212,83 ± 4,11$^{*,\#}$
ALT (IU/l)	102,13 ± 2,57	172,00 ± 12,00*	103,00 ± 5,59$^{\#}$	65,18 ± 3,88	91,71 ± 2,32*	62,45 ± 1,62$^{\#}$
ALP (IU/l)	150,50 ± 5,67	227,83 ± 23,92*	244,50 ± 18,22*	122,25 ± 4,49	164,50 ± 5,49*	166,67 ± 3,86*
Urea (mmol/l)	5,78 ± 0,25	20,28 ± 1,45*	19,78 ± 0,65*	5,19 ± 0,13	11,76 ± 0,42*	7,83 ± 0,35$^{*,\#}$
Kreatinin (mmol/l)	23,67 ± 2,37	76,85 ± 9,86*	68,48 ± 17,16*	45,03 ± 0,67	50,69 ± 1,62	47,88 ± 0,73
cTnT (ng/l)	53,00 ± 5,79	141,17 ± 3,07*	91,67 ± 5,19$^{*,\#}$	31,25 ± 1,93	124,28 ± 2,99*	64,66 ± 1,62$^{*,\#}$

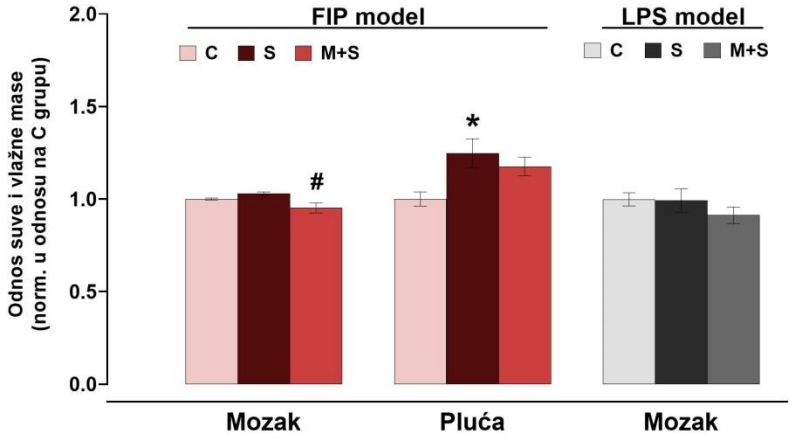
Tabela 4. Aktivnost enzima jetre: alanin-aminotransferaze (ALT), aspartat-aminotransferaze (AST) i alkalne fosfataze (ALP), kao i koncentracije uree, kreatinina i troponina T (cTnT) u serumu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

Pretretman meldonijumom je snizio markere hepatocelularnog (AST, ALT) i miokardnog oštećenja (cTnT), ali ne i markere holestatskog oštećenja (ALP) i narušene funkcije bubrega (povišene koncentracije uree i kreatinina).

4.5. Uticaj pretretmana meldonijumom na sadržaj vode u mozgu i plućima septičnih pacova

Sadržaj vode u mozgu i plućima septičnih pacova prethodno netretiranih ili tretiranih meldonijumom procenjivan je odnosem suve i vlažne mase tkiva. U FIP modelu sepse, odnos suve i vlažne mase mozga pacova bio je značajno niži kod pacova M+S grupe u poređenju sa S grupom. U LPS modelu sepse je uočen sličan trend, ali bez statističke značajnosti.

Kod pacova kojima je fecesom indukovana sepsa, a nisu prethodno tretirani meldonijumom, zabeležen je značajan porast odnosa suve i vlažne mase pluća u poređenju sa kontrolama, dok blagi porast uočen u M+S grupi nije bio statistički značajan (**Slika 11**).



Slika 11. Odnos suve i vlažne mase mozga i pluća pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

Analiza sadržaja vode u mozgu i plućima pacova u dva modela sepse pokazala je da je pretretman meldonijumom značajno povećao sadržaj vode samo u mozgu FIP-septičnih pacova.

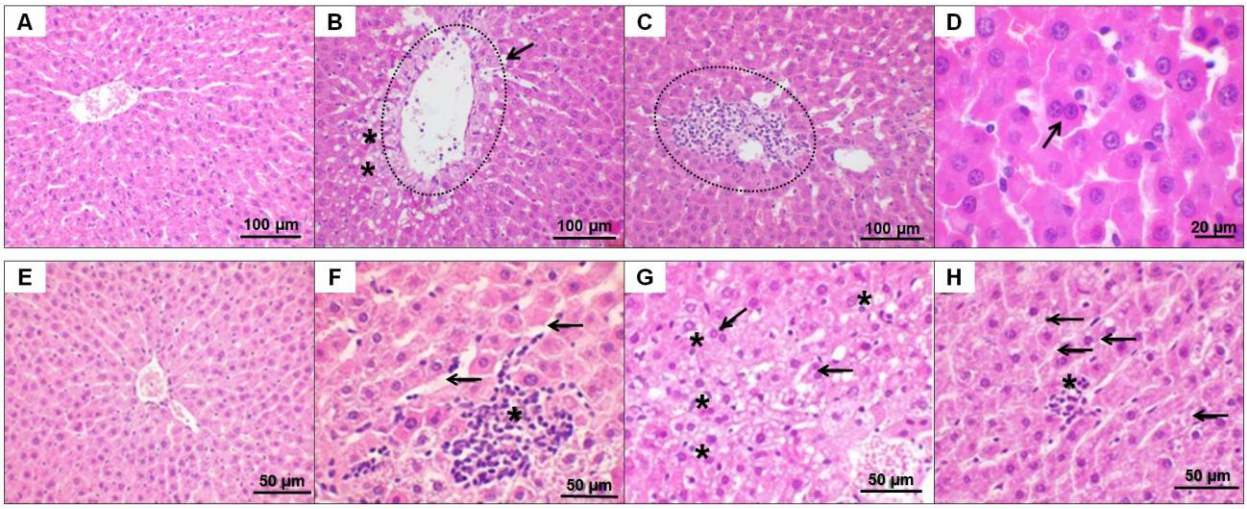
4.6. Uticaj pretretmana meldonijumom na histološke pokazatelja oštećenja jetre, bubrega, srca i pluća septičnih pacova

Radi procene histoloških promena izazvanih sepsom, kao i ispitivanja uticaja pretretmana meldonijumom, analizirani su histološki preseci tkiva jetre, bubrega, srca i pluća, uz primenu odgovarajućih sistema ocenjivanja (eng. *scoring*) histoloških parametara. U LPS modelu sepse analizirani su tkiva jetre, bubrega i srca, dok je u FIP modelu ispitivano i tkivo pluća. Rezultati primenjivanih sistema ocenjivanja objedinjeni su u **Tabeli 4**.

4.6.1. Jetra

Mikrografije tkiva jetre pacova kontrolnih grupa, u oba eksperimentalna modela, prikazuju očuvanu lobularnu arhitekturu ovog organa (**Slike 12A i 12E**).

U oba modela sepse, uočene su izražene patohistološke promene jetre septičnih pacova, i to: vakuolizacija i nekroza hepatocita, steatoza (nakupljanje masnih kapi u citoplazmi hepatocita), kao i izražena venska kongestija – nakupljanje venske krvi (**Slike 12B–C, F–G**). Prema Suzuki sistemu ocenjivanja histoloških promena u jetri, ove promene su bile izraženije u LPS modelu sepse (**Tabela 5**). U oba modela, pretretman meldonijumom je ublažio uočene patohistološke promene na jetri, pri čemu je taj efekat bio izraženiji u LPS modelu sepse (**Slike 12D i 12H**; **Tabela 5**).



Slika 12. Histološka analiza tkiva jetre nakon HE bojenja. Gornji red: Mikrografije tkiva jetre kontrolne grupe **(A)**, septične grupe bez pretretmana meldonijumom **(B–C)** i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom **(D)** u FIP modelu sepse. **B** – zvezdice označavaju vakuolizaciju hepatocita, zaokružen prostor prikazuje sinusoidnu kongestiju i nekrozu; **C** – zaokruženo je tkivo zahvaćeno nekrozom; **D** – strelica označava binuklearni hepatocit. Donji red: Mikrografije kontrolne grupe **(E)**, septične grupe bez

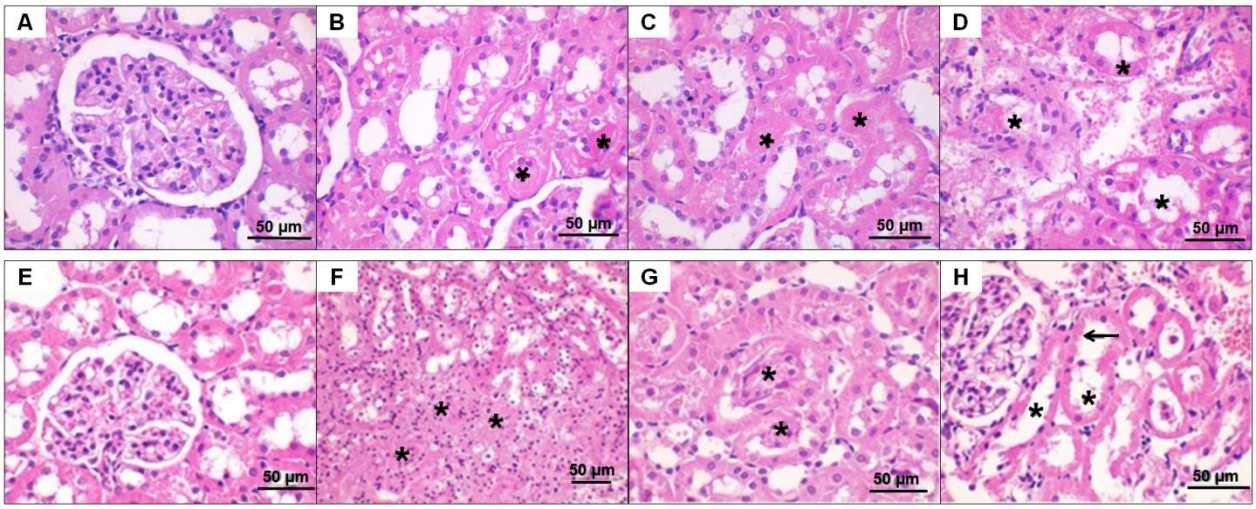
pretretmana meldonijumom **(F–G)** i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom **(H)** u LPS modelu sepse. **F** – strelice označavaju sinusoidnu dilataciju, zvezdica tkivo zahvaćeno nekrozom; **G** – zvezdice vakuolizaciju hepatocita, strelice binuklearne hepatocite; **H** – zvezdica deo tkiva zahvaćenog nekrozom, strelice prisustvo steatoze (nakupljanje masnih kapi). Skala razmere je prikazana u donjem desnom uglu svake mikrografije.

4.6.2. Bubrezi

Mikrografije tkiva bubrega pacova kontrolnih grupa, u oba eksperimentalna modela sepse, prikazuju očuvanu arhitekturu bubrežnih glomerula i tubula, bez patohistoloških promena (**Slike 13A i 13E**).

Fecesom indukovana sepsa je uzrokovala pojavu sitnih izbočina (eng. *blebs*) na apikalnoj membrani tubulocita koje su doprinele uočenoj opstrukciji lumena tubule (**Slika 13B**); gubitak četkastog pokrova proksimalnih tubulocita kao i promenu njihove karakteristične morfologije (karakterističnog spljoštenog oblika), a u izvesnoj meri i nekrozu tubulocita (**Tabela 4**). Sve navedene patološke promene su uočene i na presecima bubrega pacova M+S grupe, pri čemu su bile još izraženije (**Slike 13C–D**; **Tabela 5**).

LPS-om indukovana sepse je, nezavisno od pretretmana meldonijumom, izazvala nekrozu tubulocita uz gubitak apikalnog četkastog pokrova i karakteristične morfologije, kao i opstrukciju tubularnog lumena (**Slike 13F–H**; **Tabela 5**). Prema rezultatima primenjenog sistema ocenjivanja, u LPS modelu sepse nije uočena značajna razlika u zastupljenosti opisanih patohistoloških promena u bubrezima pacova M+S grupe u odnosu na S grupu (**Slika 13H**; **Tabela 5**).

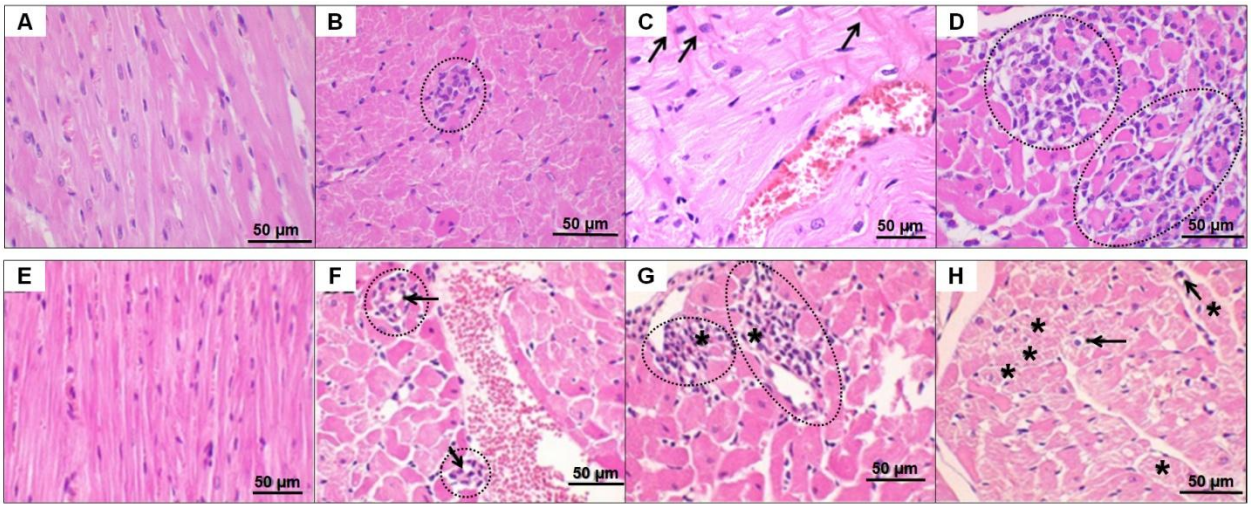


Slika 13. Histološka analiza tkiva bubrega nakon PAS i HE bojenja. Gornji red: Mikrografije tkiva bubrega pacova kontrolne grupe **(A)**, septične grupe bez pretretmana meldonijumom **(B)** i septične grupe

prethodno tretirane meldonijumom **(C–D)** u FIP modelu sepse. **B, C** – zvezdice pokazuju na sitne izbočine u lumenu tubula (*eng.* blebs); **D** – zvezdice označavaju opstrukciju lumena tubula. Donji red: Mikrografije kontrolne grupe **(E)**, septične grupe bez pretretmana meldonijumom **(F–G)** i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom **(H)** u LPS modelu sepse. **F** – zvezdice označavaju tubularnu nekrozu; **G** – zvezdice označavaju opstrukciju lumena tubula; **H** – strelica pokazuje gubitak četkaste ivice, zvezdice pokazuju spljoštavanje tubulocita. Skala razmere je prikazana u donjem desnom uglu svake mikrografije.

4.6.3. Srce

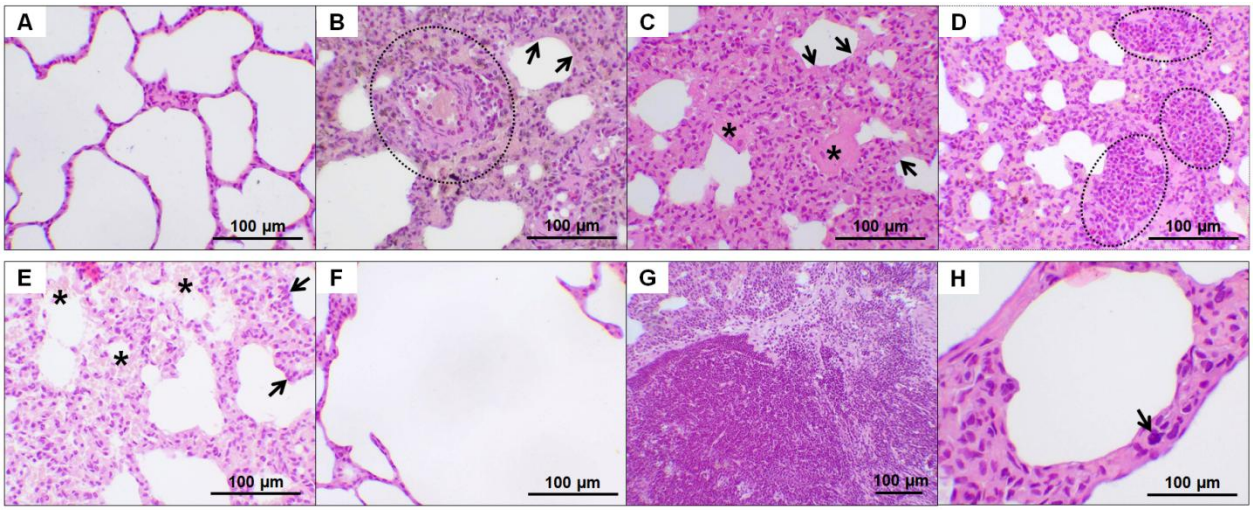
Slike 14A i **E** prikazuju očuvan miokard pacova kontrolnih grupa, u oba modela sepse. Nasuprot tome, na mikrografijama tkiva srca septičnih pacova, u oba modela, uočeni su inflamatorni infiltrati u intersticijumu miokarda, mestimično praćeni nekrozom kardiomiocita (**Slika 14B, F**; **Tabela 5**). U oba modela, inflamatorni infiltrati bili su zastupljeniji u srčanom tkivu septičnih pacova prethodno tretiranih meldonijumom (**Slike 14C–D, G-H**; **Tabela 5**). U M+S grupi uočene su vakuolizacija, izražena nekroza kardiomiocita kao i miocitoliza – gubitak poprečne prugavosti kardiomiocita (**Slike 14C–D, G–H**).



Slika 14. Histološka analiza tkiva srca nakon HE bojenja. Gornji red: Mikrografije miokarda pacova kontrolne grupe **(A)**, septične grupe bez pretretmana meldonijumom **(B)** i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom **(C–D)** u FIP modelu sepse. **B** – zaokruženi inflamatorni infiltrati, uz gubitak kardiomiocita; **C** – zvezdice označavaju nekrozu kardiomiocita; **D** – zaokruženi inflamatorni infiltrati. Donji red: Mikrografije kontrolne grupe **(E)**, septične grupe bez pretretmana meldonijumom, **(F)** i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom **(G–H)** u LPS modelu sepse. **F** – zaokruženi i strelicama označeni inflamatorni infiltrati; **G** – zaokruženi i zvezdicama označeni inflamatorni infiltrati; **H** – strelica označava vakuolizaciju kardiomiocita, a zvezdice gubitak poprečne prugavosti. Skala razmere je prikazana u donjem desnom uglu svake mikrografije.

4.6.4. Pluća

Na **Slici 15** prikazane su reprezentativne mikrografije tkiva pluća pacova kojima je fecesom indukovana sepsa. Na uzorcima tkiva pluća pacova kontrolne grupe zapaža se očuvanost tkiva, sa tankim alveolarnim septama i bez znakova inflamacije ili krvarenja (**Slika 15A**). Kod pacova sa FIP sepsom uočene su izražene patološke promene, i to: formiranje hijalinih membrana, emfizem pluća, zadebljanje alveolarnih septi, intraalveolarna hemoragija, nekroza i inflamatorni infiltrati (**Slike 15B–D; Tabela 5**). Navedene histološke promene uočene su i u plućima pacova M+S grupe (**Slike 15E–H**; **Tabela 5**). Na **Slici 15F** uočava se veliki vazdušni prostor usled oštećenih septi, tj. prisustvo emfizema, dok **Slika 15H** prikazuje difuznu reaktivnu limfoidnu hiperplaziju u plućima pacova M+S grupe. Prema primenjenom sistemu ocenjivanja, histološke promene izazvane sepsom su bile manje izražene u M+S grupi u poređenju sa S grupom, naročito kada je reč o zastupljenosti hijalinih membrana, nekroze i hemoragije (**Tabela 5**).



Slika 15. Histološka analiza tkiva pluća nakon HE bojenja. Gornji red: Mikrografije tkiva pluća kontrolne grupe **(A)**, septične grupe bez pretretmana meldonijumom **(B–D)** i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom **(E–H)** u FIP modelu sepse. **B** – strelice označavaju zadebljanje septi, zaokružen je alveolarni prostor sa kongestijom, intraalveolarnom hemoragijom i inflamatornim infiltratima; **C** – zvezdice i strelice pokazuju formiranje hijalinih membrana; **D** – zaokruženi su inflamatorni infiltrati; **E** – zvezdice označavaju nakupljanje fibrina, a strelice infiltraciju neutrofila; **F** – mikrografija prikazuje veliki vazdušni prostor, tj. razvoj emfizema usled oštećenja alveolarnih septi; **G** – mikrografija prikazuje prisustvo velikog broja limfocita u plućnom tkivu (reaktivna limfoidna hiperplazija); **H** – strelica pokazuje prisustvo megakariocita. Skala razmere je prikazana u donjem desnom uglu svake mikrografije.

Organ / Histološki parametar	Eksperimentalna grupa	FIP model sepse			LPS model sepse		
		C	S	M+S	C	S	M+S
JETRA	Kongestija	1,00	1,33	1,12	1,00	2,71	1,25
	Vakuolizacija	0,38	1,33	0,62	0,50	2,29	1,13
	Nekroza	0,25	1,42	1,12	0,50	2,14	1,13
BUBREZI	Narušenost morfologije epitela	2,87	7,33	8,25	4,25	7,57	6,38
	Gubitak četkastog pokrova	2,25	6,58	9,50	4,13	12,29	11,50
	Nekroza	1,37	7,00	14,75	1,25	8,57	7,88
	Opstrukcija lumena bubrežnih tubula	1,37	6,00	14,50	0,00	9,86	6,38
SRCE	Prisustvo inflamatornih infiltrata	0,25	0,58	1,75	0,00	0,25	0,88
	Distribucija inflamatornih infiltrata	0,00	0,33	1,25	0,00	0,25	0,63
PLUĆA	Prisustvo hijalinih membrana	0,05	0,86	0,07			
	Emfizem	1,33	1,75	1,29			
	Zadebljanje alveolarnih septi	1,22	3,12	2,29			
	Krvarenje	0,06	0,87	0,10			
	Nekroza	0,05	0,50	0,07			
	Prisustvo inflamatornih infiltrata	0,89	3,00	2,29			

Tabela 5. Srednje vrednosti histoloških skorova tkiva jetre, bubrega, srca i pluća pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prema primenjenim sistemima ocenjivanja, histološki skor 0 odgovara odsustvu promene, dok ocena 4 ukazuje da je promena veoma izražena i visoko zastupljena.

U oba modela sepse, pretretman meldonijumom doveo je do ublažavanja histološkog oštećenja jetre, ali bez značajnog poboljšanja histološkog nalaza bubrega. U plućnom tkivu FIP-septičnih pacova je redukovao razvoj pojedinih histoloških lezija, dok je u srčanom tkivu, u oba modela sepse, pretretman meldonijumom bio praćen izraženijim patohistološkim promenama.

4.7. Uticaj pretretmana meldonijumom na markere oksidativnog stresa kod septičnih pacova

Radi procene uticaja pretretmana meldonijumom na kapacitet antioksidativne zaštite kod septičnih pacova, u homogenatima organa analizirani su relevantni biohemijski parametri. U jetri, bubrezima i srcu, u oba modela sepse, merena je aktivnost antioksidativnih enzima CuZnSOD, MnSOD, CAT i GSH-Px, kao i koncentracija LPO, dok su u LPS modelu ispitivani i odnos GSH/GSSG. Radi potpunijeg razumevanja uticaja LPS-om indukovane sepse i pretretmana meldonijumom na markere oksidativnog stresa, ispitivana je ekspresija

transkripcionog faktora Nrf2. Pluća su analizirana u FIP modelu sepse, gde je, pored aktivnosti pomenutih enzima, određivani i aktivnost GST i GR, ukupni sadržaj glutationa, koncentracija PCO i LPO, kao i proteinska ekspresija CAT, CuZnSOD, MnSOD i Nrf2. U moždanim regionima od interesa, u oba modela sepse, određivani su PAB, AOPP i LPO.

4.7.1. Jetra

U FIP modelu sepse, aktivnost CuZnSOD, MnSOD i CAT u homogenatima jetre nije se statistički značajno razlikovala između ispitivanih grupa, dok su aktivnost GSH-Px i koncentracija LPO bile značajno povišene u jetri pacova S i M+S grupa u odnosu na kontrolne pacove (**Slika 16A**).

U jetri pacova kojima je sepsa indukovana LPS-om, aktivnost CuZnSOD je bila snižena, a aktivnost MnSOD povišena u odnosu na kontrolnu grupu, dok je meldonijum održao aktivnosti obe SOD izoforme na kontrolnom nivou (**Slika 16A**). Aktivnost CAT, GSH-Px i odnos GSH/GSSG bili su značajno sniženi u jetri septičnih pacova u odnosu na kontrolu. U jetri pacova iz M+S grupe, meldonijum je dodatno snizio aktivnost CAT i odnos GSH/GSSG u odnosu na kontrolnu grupu, dok je aktivnost GSH-Px bila bliža kontrolnim vrednostima, i statistički značajno viša u odnosu na S grupu. Koncentracija LPO je i u jetri LPS septičnih pacova bila povišena u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u M+S grupi bila značajno snižena u odnosu na S grupu (**Slika 16A**). Proteinski sadržaj Nrf2 je nezavisno od pretretmana meldonijumom bio povišen u homogenatima jetre pacova sa LPS-indukovanom sepsom, ali bez značajne razlike između dve septične grupe (**Slika 17**).

4.7.2. Bubrezi

U bubrezima pacova S i M+S grupa u FIP modelu sepse, aktivnost enzima CuZnSOD, CAT i GSH-Px bila je značajno smanjena u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je aktivnost MnSOD bila povišena (**Slika 16B**). U ovom modelu sepse, koncentracija LPO u bubrezima se nije statistički značajno razlikovala između grupa.

U LPS modelu sepse, u bubrezima, među grupama nije bilo značajnih promena u aktivnosti CuZnSOD i CAT među grupama (**Slika 16B**). Renalna aktivnost MnSOD septičnih pacova je takođe bila na kontrolnom nivou, ali je meldonijum značajno povećao aktivnost ove izoforme SOD. Aktivnost GSH-Px, kao i odnos GSH/GSSG, bili su sniženi u bubrezima pacova S i M+S grupa u odnosu na kontrolne pacove, a meldonijum je statistički značajno smanjio

odnos GSH/GSSG i u poređenju sa pacovima septične grupe. I u LPS modelu sepse, koncentracija LPO u bubrezima nije pokazala statistički značajne razlike između grupa (**Slika 16B**). LPS sepsa je povećala renalni sadržaj Nrf2, ali bez statistički značajnih razlika između dve septične grupe (**Slika 17**).

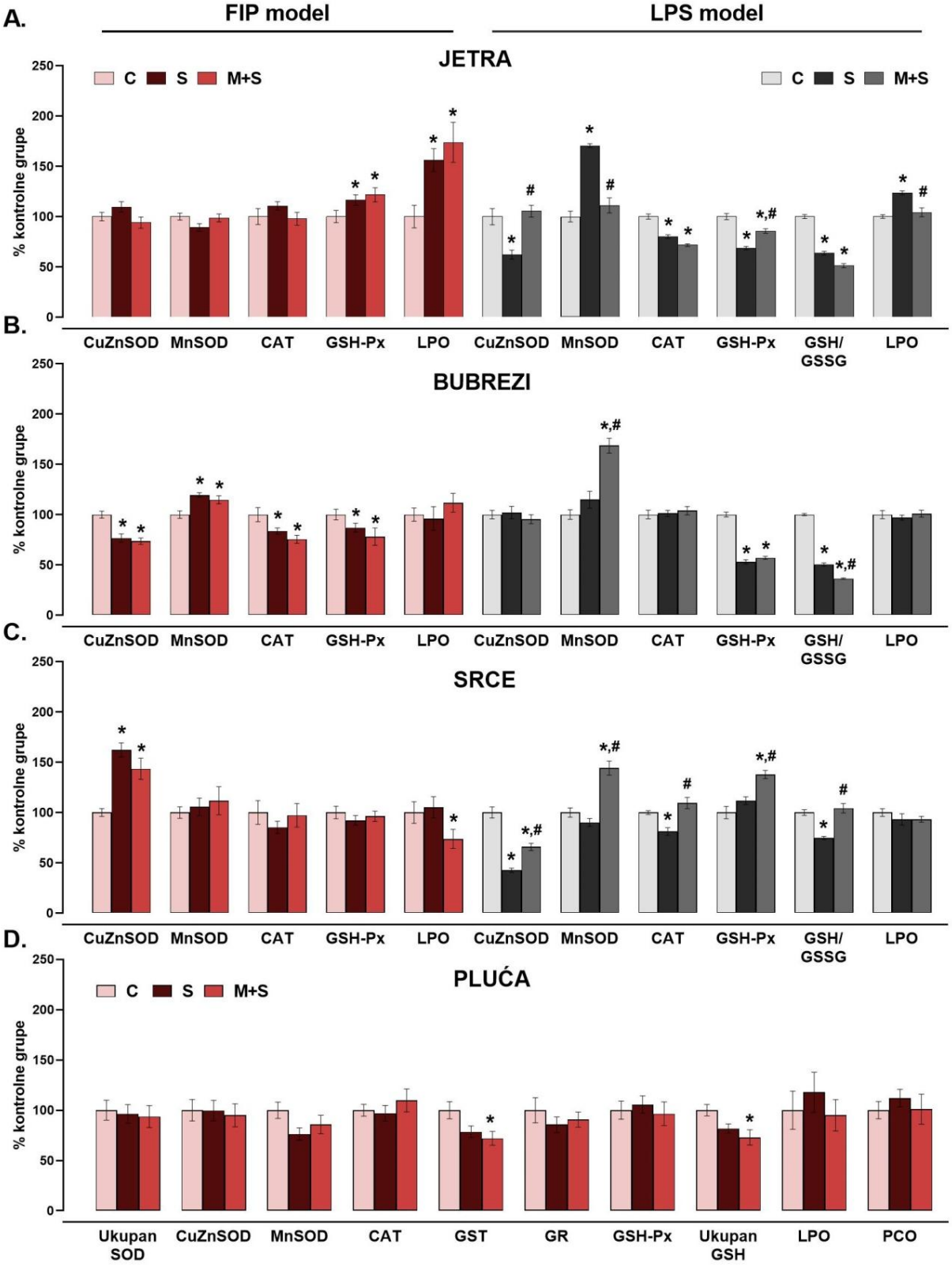
4.7.3. Srce

U FIP modelu sepse, u srcu nisu zabeležene statistički značajne razlike u aktivnosti MnSOD, CAT i GSH-Px među grupama (**Slika 16C**). Nasuprot tome, aktivnost CuZnSOD bila je povišena u odnosu na kontrolu, kako u srcu septičnih pacova, tako i kod pacova prethodno tretiranih meldonijumom. Koncentracija LPO u srcu nije bila promenjena kod septičnih pacova u poređenju sa kontrolom, dok je meldonijum značajno snizio ovaj parametar u odnosu na kontrolnu grupu.

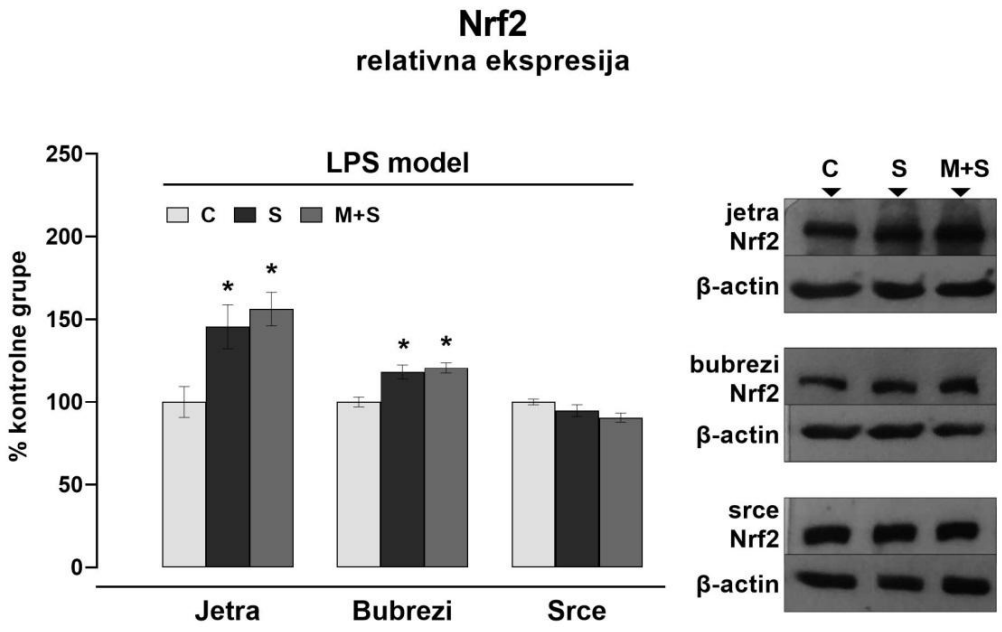
U LPS modelu sepse, aktivnost MnSOD i GSH-Px nije bila značajno promenjena u srcu pacova S grupe u odnosu na kontrolu, dok je u M+S grupi bila značajno povišena (**Slika 16C**). Aktivnost CuZnSOD je u srcu septičnih pacova bila snižena u poređenju sa kontrolnom grupom, a bila je snižena i u grupi pretretiranoj meldonijumom, iako značajno povećana u odnosu na S grupu. Aktivnost CAT i vrednost GSH/GSSG su bili sniženi u srcu septičnih pacova u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je meldonijum uticao na porast vrednosti ovih parametara u odnosu na S grupu. U LPS modelu, koncentracija LPO, kao ni sadržaj proteina Nrf2 u srcu, nisu pokazali značajne promene među grupama (**Slike 16–17**).

4.7.4. Pluća

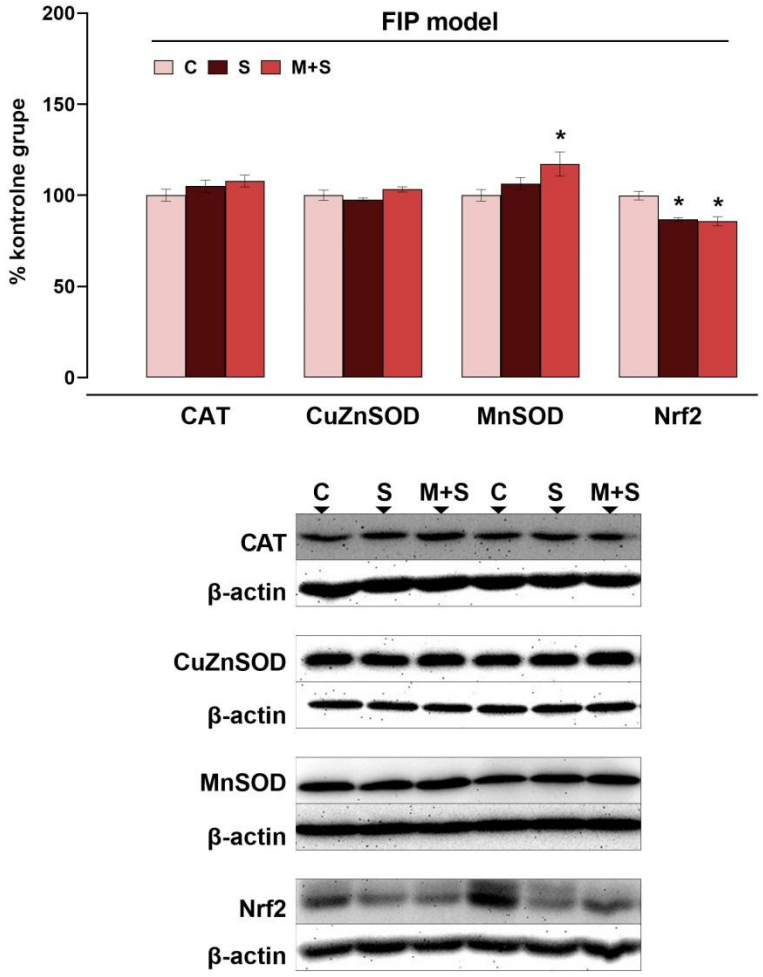
U plućima FIP-septičnih pacova, u poređenju sa kontrolnom grupom, nije zabeležena statistički značajna promena u nivou enzimskih i neenzimskih komponenti AOS sistema, iako je primećen trend smanjenja aktivnosti MnSOD, GST, GR i koncentracije GSH (**Slika 16D**). Meldonijum je dodatno smanjio aktivnost GST i koncentraciju glutationa u poređenju sa kontrolnom, ali ne i sa S grupom pacova. U poređenju sa kontrolnim životinjama, primećen je trend povećanja nivoa LPO i PCO u plućima pacova S grupe, ali bez statističke značajnosti, dok meldonijum nije menjao vrednosti ovih parametara u odnosu na kontrolu (**Slika 16D**). Ekspresija CAT, CuZnSOD i MnSOD nije se menjala u plućima pacova S grupe, dok je u M+S grupi zabeleženo statistički značajno povećanje nivoa MnSOD u odnosu na kontrolu **(Slika 18)**. Ekspresija Nrf2 bila je snižena u obe septične grupe u odnosu na kontrolnu (**Slika 18**).



Slika 16. Relativan nivo markera oksidativnog stresa u jetri (A), bubrezima (B), srcu (C) i plućima (D) pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao P < 0,05 (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).



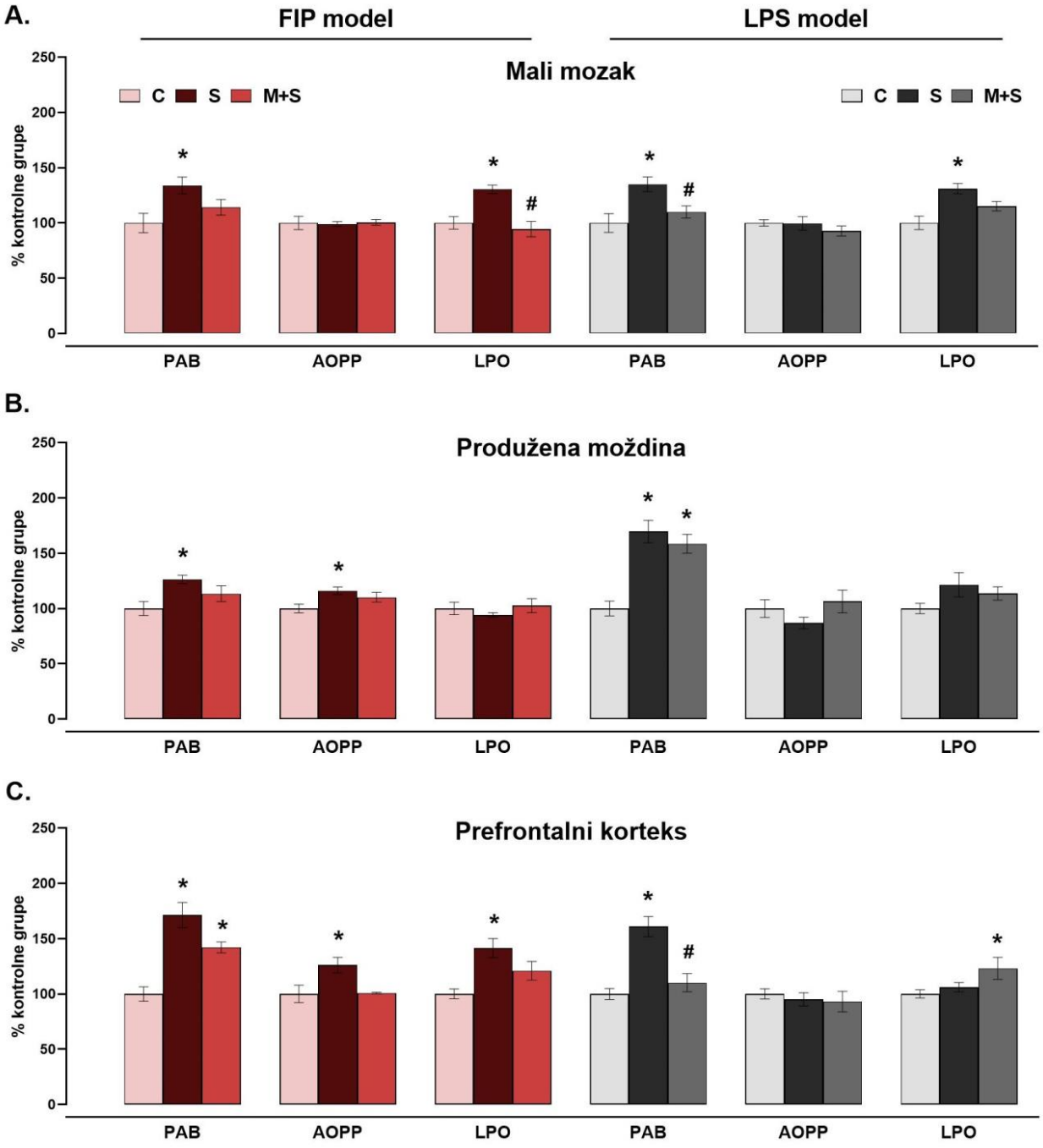
Slika 17. Ekspresija Nrf 2 u homogenatima jetre, bubrega i srca pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u LPS modelu sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje S vs. C).



Slika 18. Ekspresija markera oksidativnog stresa u plućima pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP modelu sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C).

4.7.5. Mali mozak, produžena moždina i prefrontalni korteks

Fecesom indukovana sepsa je statistički značajno povećala PAB u malom mozgu, produženoj moždini i prefrontalnom korteksu u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 19**). Kod pacova prethodno tretiranih meldonijumom vrednosti PAB u malom mozgu i produženoj moždini bile su slične onima zabeleženim u kontrolnoj grupi (**Slika 19A-B**). Međutim, u prefrontalnom korteksu meldonijum je statistički značajno povećao nivo PAB u odnosu na kontrolne životinje, ali bez značajnih razlika u odnosu na septične (**Slika 19C**). U LPS modelu sepse, nivo PAB je u odnosu na kontrolu, bio statistički značajno povećan u sva tri analizirana



Slika 19. Relativan nivo markera oksidativnog stresa u malom mozgu **(A)**, produženoj moždini **(B)** i prefrontalnom korteksu **(C)** pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

regiona mozga: malom mozgu, produženoj moždini i prefrontalnom korteksu (**Slika 19A-C**), a nakon pretretmana meldonijumom samo u produženoj moždini (**Slika 19B**).

Nivo AOPP bio je povišen u produženoj moždini i prefrontalnom korteksu pacova kojima je fecesom indukovana sepsa, u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 19B-C**), dok LPS nije imao efekta na ovaj parametar u sve tri moždane strukture. U oba modela sepse, u sva tri ispitivana moždana regiona pacova iz M+S grupe, nivo AOPP zadržao se na nivou kontrolne grupe (**Slika 19A-C**).

U oba modela sepse, nivo LPO je bio značajno povišen u malom mozgu u odnosu na kontrolne grupe (**Slika 19A**). Meldonijum je ovu vrednost statistički snizio u FIP modelu, dok u LPS modelu ova promena nije bila statistički značajna (**Slika 19A**). U produženoj moždini, ni u jednom od ispitivanih modela sepse nisu zabeležene statistički značajne promene nivoa LPO među grupama (**Slika 19B**). LPS nije imao uticaja na nivo LPO u prefrontalnom korteksu, ali fecesom indukovana sepsa je uzrokovala povećanje u poređenju sa kontrolnim pacovima (**Slika 19C**). Meldonijum nije imao efekte na ovaj parametar u prefrontalnom korteksu u FIP modelu sepse, ali ga je povećao u LPS modelu u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 19C**).

Pretretman meldonijumom je ispoljio izraženiji i konzistentniji antioksidativan efekat u LPS modelu, naročito u jetri i srcu, dok u bubrezima i plućima nije doveo do jasnog poboljšanja oksidativnog profila ni u jednom modelu sepse. Njegovi efekti u mozgu bili su heterogeni i bez jedinstvenog obrasca odgovora.

4.8. Uticaj pretretmana meldonijumom na proteinsku ekspresiju proinflamatornih markera kod septičnih pacova

U cilju ispitivanja antiinflamatornog potencijala meldonijuma kod septičnih pacova oba modela, analiziran je proteinski sadržaj HMGB1, fosforilisane ili ukupne NFκB p65, Hp i TNF u serumu, odnosno u homogenatima organa od interesa. U plućima je u FIP modelu analiziran i proteinski sadržaj Vim radi sticanja potpunijeg uvida u oštećenje i remodelovanje tkiva.

4.8.1. Serum

Tabela 6 prikazuje rezultate merenja nivoa HMGB1 odnosno TNF u serumu pacova eksperimentalnih grupa. Uočeno je povećanje nivoa HMGB1 u serumu S grupe pacova FIP modela sepse u poređenju sa pacovima kontrolne grupe, dok je pretretman meldonijumom

rezultovao smanjenjem nivoa HMGB1 u serumu u odnosu na S grupu.

U LPS modelu sepse, vrednosti TNF bile je značajno povišene u serumu pacova S i M+S grupe u poređenju sa kontrolom, ali je u grupi M+S nivo TNF bio značajno niži u odnosu na vrednosti izmerene u serumu pacova S grupe.

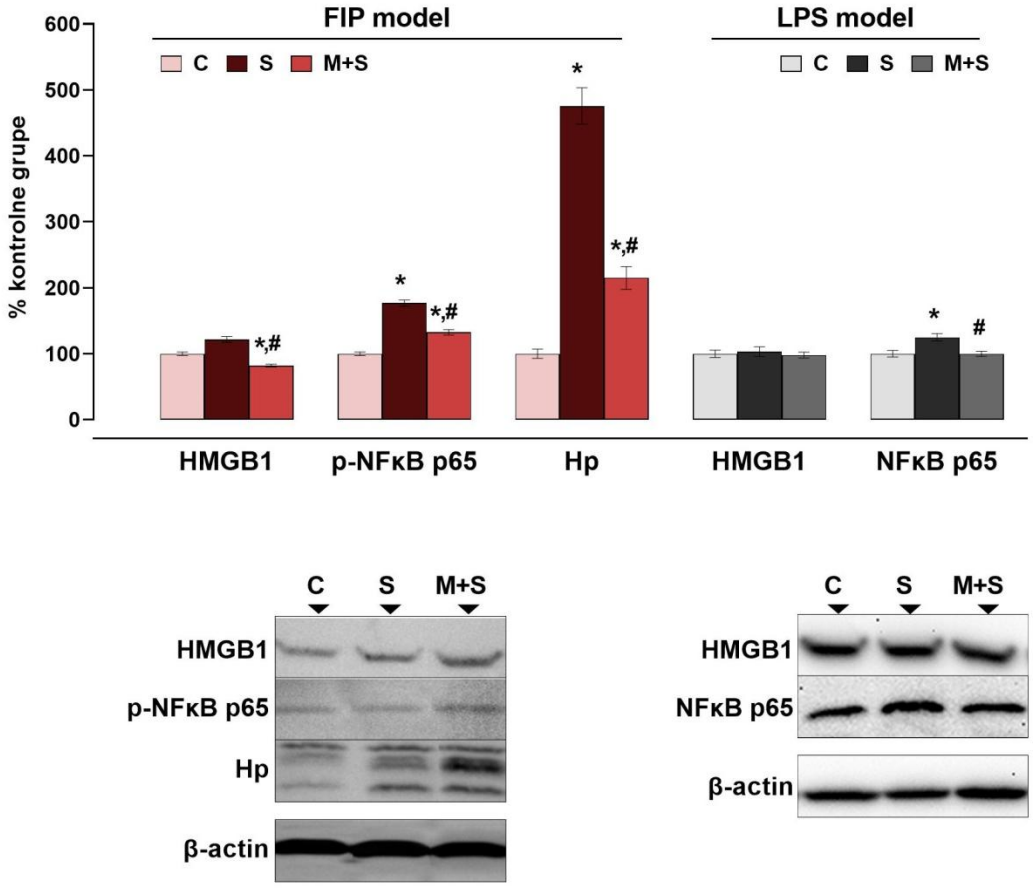
		FIP model sepse				**LPS model sepse**	
Eksp. grupa / SERUM	**C**	**S**	**M+S**	**Eksp. grupa / SERUM**	**C**	**S**	**M+S**
HMGB1 (norm. u odnosu na C grupu)	1,00 ± 0,22	1,46 ± 0,22*	1,1 ± 0,26#	**TNF** (pg/ml)	11,32 ± 1,73	34,13 ± 2,57*	17,60 ± 2,11*,#

Tabela 6. Nivoi HMGB1 i TNF u serumu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP, odnosno LPS modelu sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

4.8.2. Jetra

Na **Slici 20** prikazani su rezultati ispitivanja markera inflamacije HMGB1, (p-)NFκB p65 i Hp u jetri pacova svih eksperimentalnih grupa oba modela sepse. U sepsi indukovanoj fecesom nije ustanovljena promena nivoa HMGB1 u homogenatima jetre pacova, međutim pretretman meldonijumom je statistički značajno smanjio ovaj parametar. U LPS modelu sepse nije zabeležena značajna promena nivoa HMGB1 u homogenatima jetre pacova svih eksperimentalnih grupa.

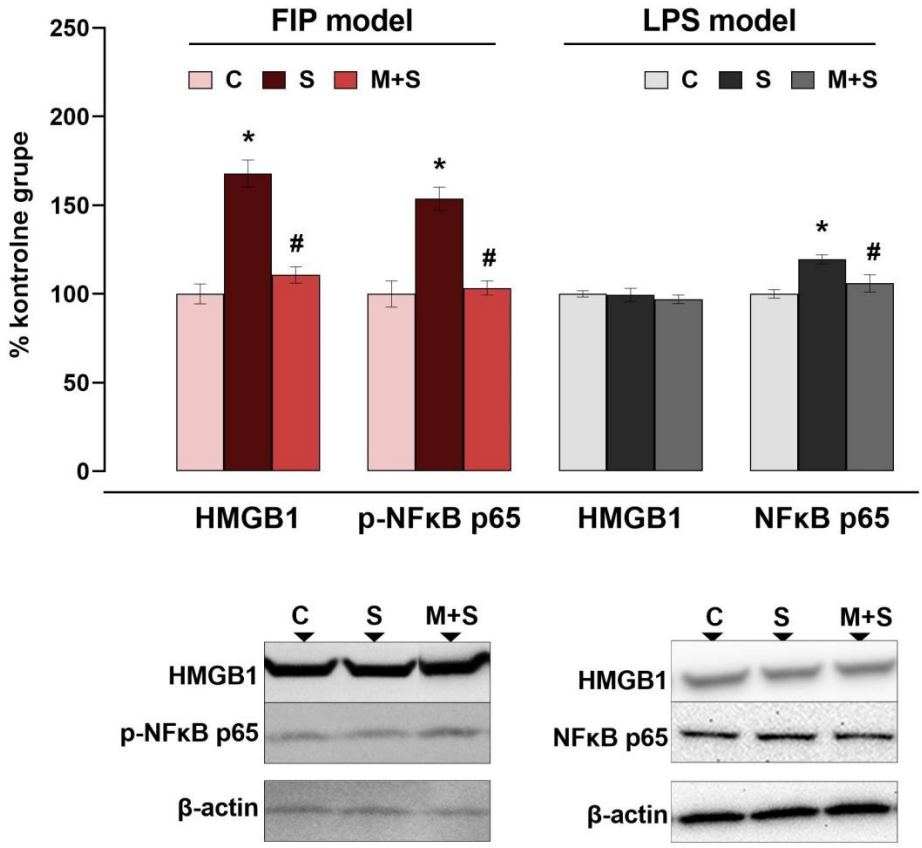
Zabeležen je porast nivoa fosforilisane NFκB p65 subjedinice u FIP-indukovanoj sepsi, odnosno nefosforilisane forme u LPS-indukovanoj sepsi, dok je pretretman meldonijumom doveo do njihovog značajnog smanjenja u odnosu na odgovarajuće S grupe. Isti trend uočen je merenjem nivoa Hp u jetri pacova FIP modela sepse.



Slika 20. Ekspresija proinflamatornih markera HMGB1, (p-)NFκB p65 i Hpu jetri pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

4.8.3. Bubrezi

Fecesom indukovana sepsa je dovela do povećanja nivoa HMGB1 i p-NFκB p65 subjedinice u homogenatima bubrega u poređenju sa kontrolnom grupom. Pretretman meldonijumom je oba parametra inflamacije vratio na kontrolni nivo. Isti trend uočen je i praćenjem nivoa NFκB p65 subjedinice u LPS modelu sepse, dok se nivo HMGB1 u homogenatima bubrega u istim uslovima nije menjao (**Slika 21**).

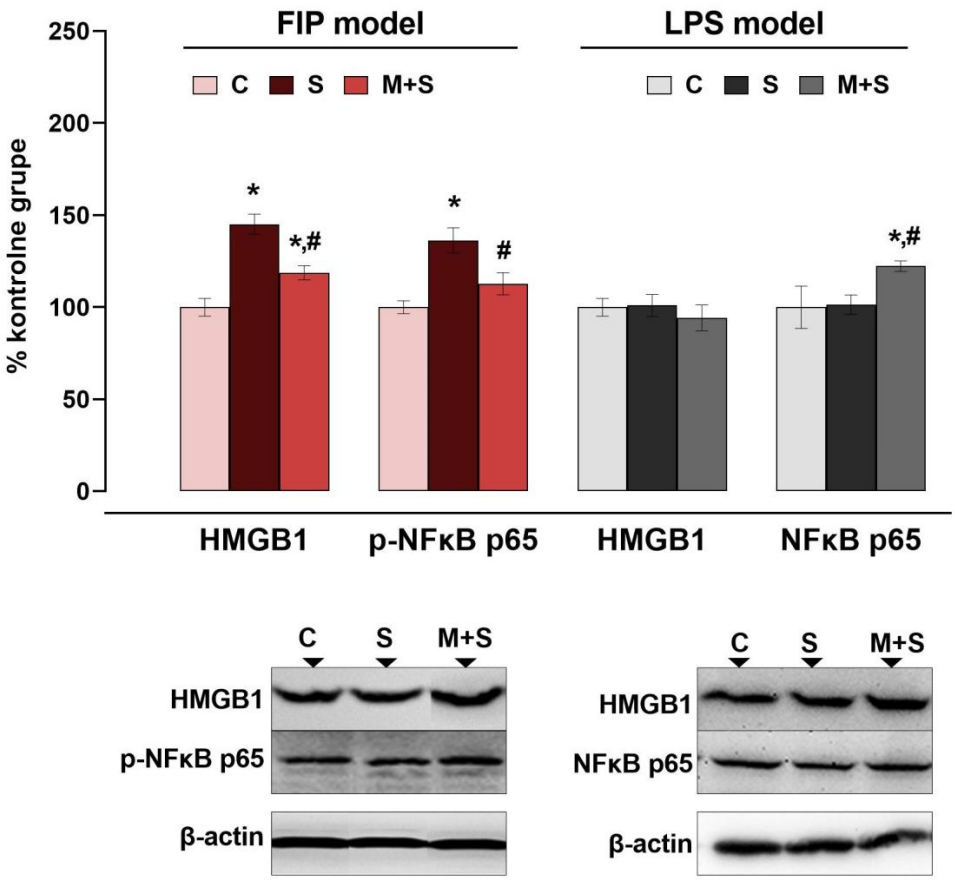


Slika 21. Ekspresija proinflamatornih markera HMGB1 i (p-)NFκB p65 u bubrezima pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S)

4.8.4. Srce

Kao u bubrezima, fecesom indukovana sepsa je dovela do povećanja nivoa HMGB1 i p-NFκB p65 u homogenatima srca, a pretretman meldonijumom do smanjenja obe vrednosti u poređenju sa S grupom.

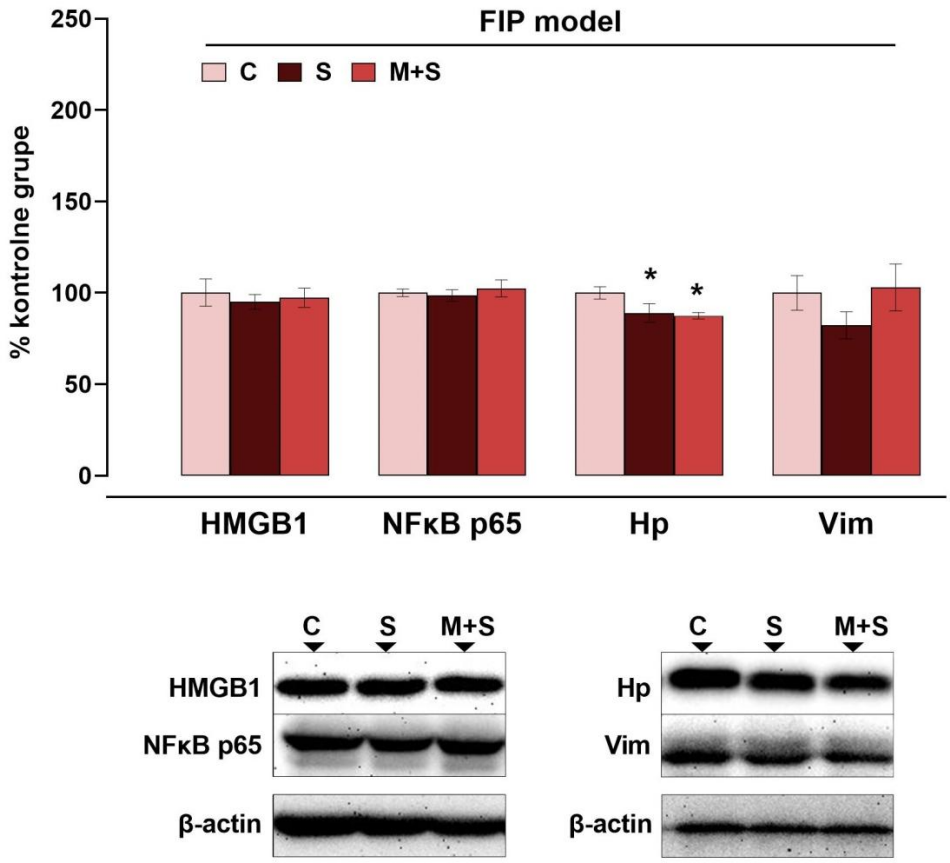
U LPS modelu sepse, nivo oba proteina u srčanom tkivu nije se značajno razlikovao između ispitivanih grupa. Pretretman meldonijumom je doveo do povećanja nivoa NFκB p65 u ovom modelu sepse, i to kako u odnosu na C, tako i na S grupu (**Slika 22**).



Slika 22. Ekspresija proinflamatornih markera HMGB1 i (p-)NFκB p65 u srcu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

4.8.5. Pluća

U FIP modelu sepse, uočeno je samo smanjenje nivoa Hp u plućima, dok se ekspresija HMGB1, Vim i NFκB p65 subjedinice nije menjala. Nivo Hp bio je značajno niži kako u plućima pacova S grupe, tako i M+S grupe, u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 23**).

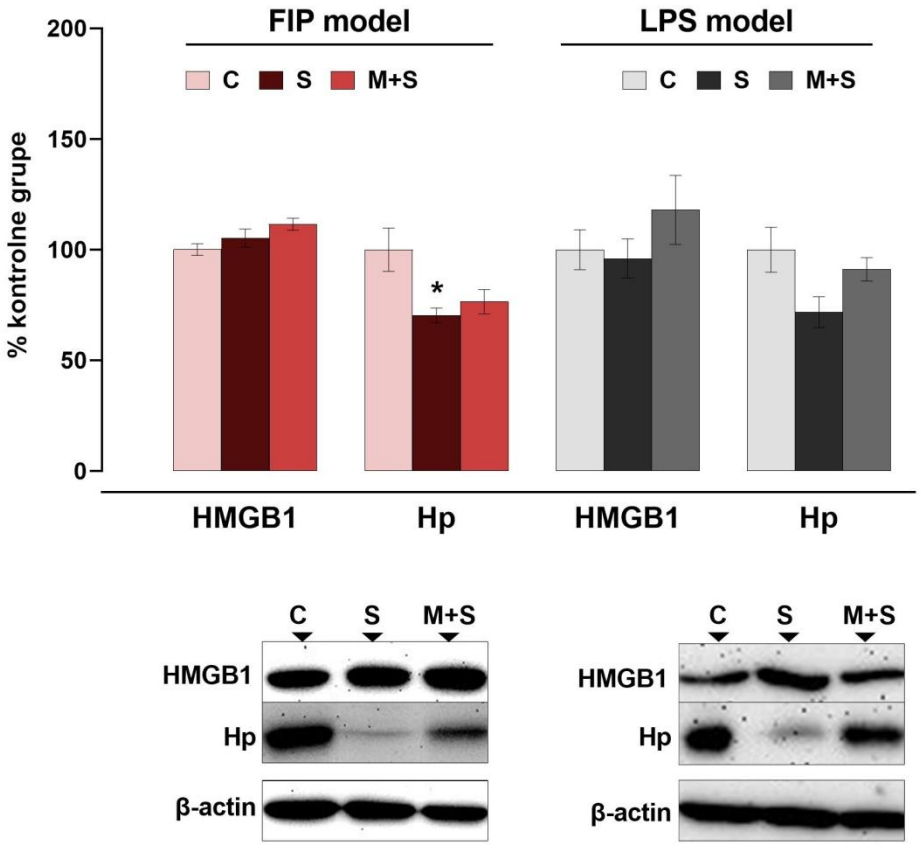


Slika 23. Ekspresija proinflamatornih markera HMGB1, NFκB p65, Vim i Hp u plućima pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP modelu sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C).

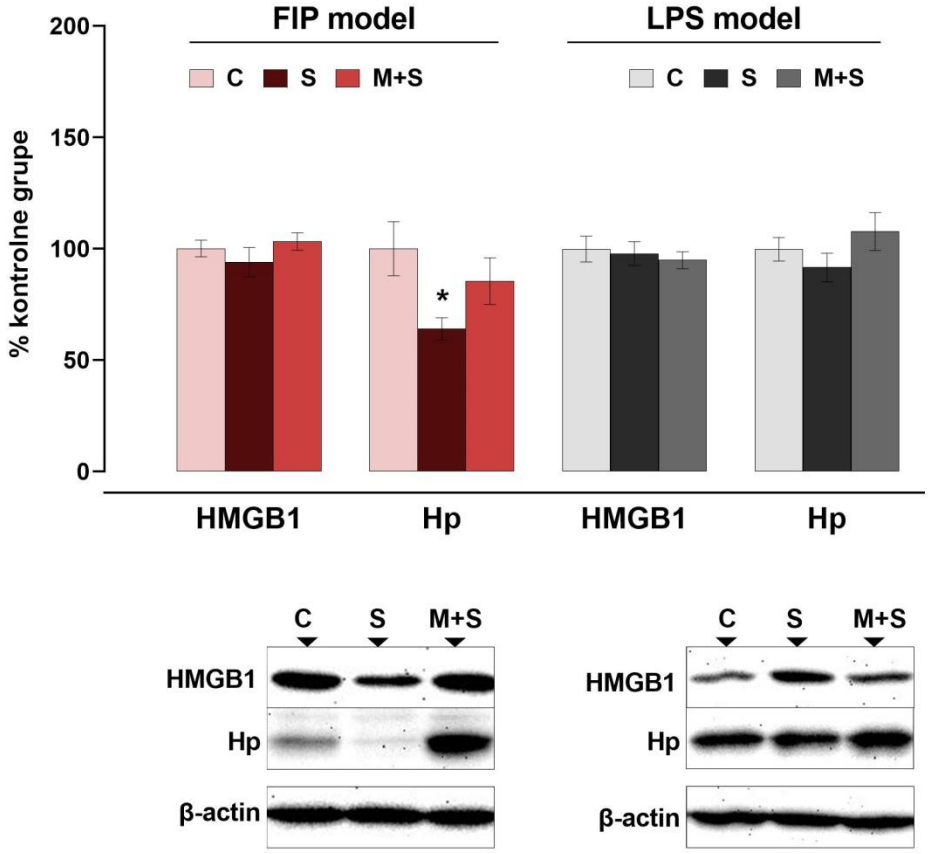
4.8.6. Mali mozak, produžena moždina i prefrontalni korteks

Ekspresija HMGB1 u sve tri analizirane moždane strukture nije se značajno razlikovala između svih eksperimentalnih grupa u oba modela sepse, kao ni ekspresija Hp u LPS modelu sepse. Naime, u LPS modelu su primećeni trendovi smanjenja nivoa Hp u svim ispitivanim moždanim strukturama pacova S grupa i vraćanja nivoa ovog proteina u M+S grupi, ali ove promene nisu bile statistički značajne (**Slike 24-26**).

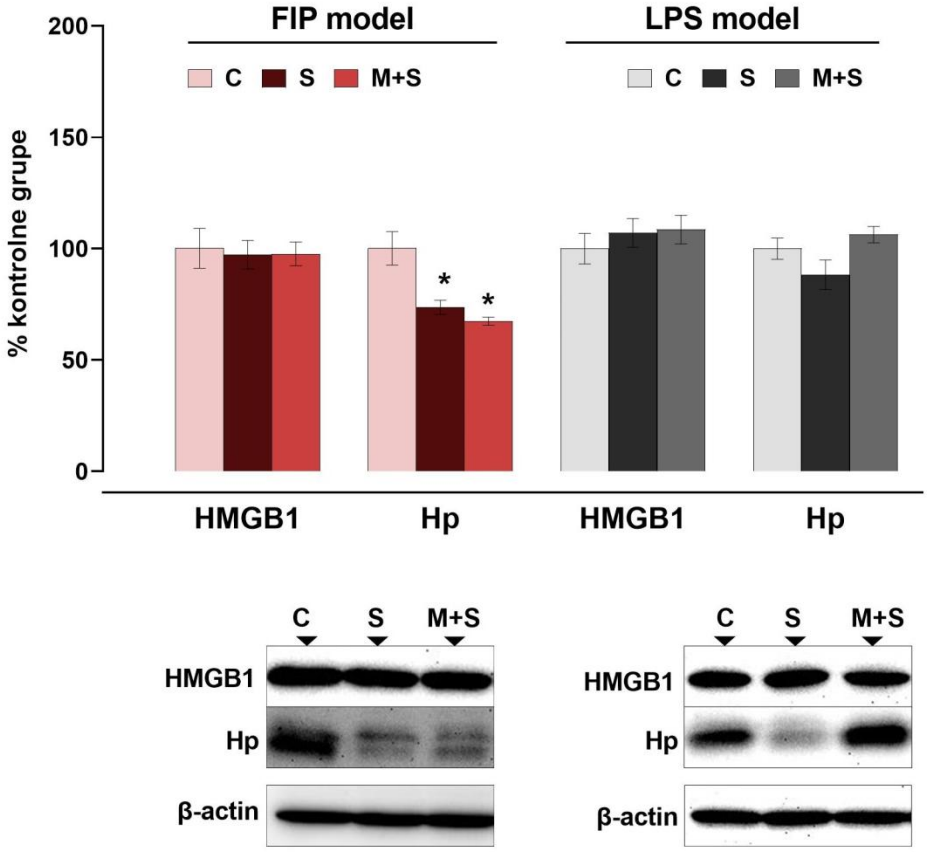
Fecesom indukovana sepsa uzrokovala je smanjenje ekspresije Hp u sva tri ispitivana moždana regiona, dok je pretretman meldonijumom u malom mozgu (**Slika 24**) i produženoj moždini (**Slika 25**) vratio Hp na nivo približan kontrolnom. Samo u prefrontalnom korteksu pacova M+S grupe ekspresija Hp ostala je smanjena u poređenju sa kontrolom (**Slika 26**).



Slika 24. Ekspresija proinflamatornih markera HMGB1 i Hp u malom mozgu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C).



Slika 25. Ekspresija proinflamatornih markera HMGB1 i Hp u produženoj moždini pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C).

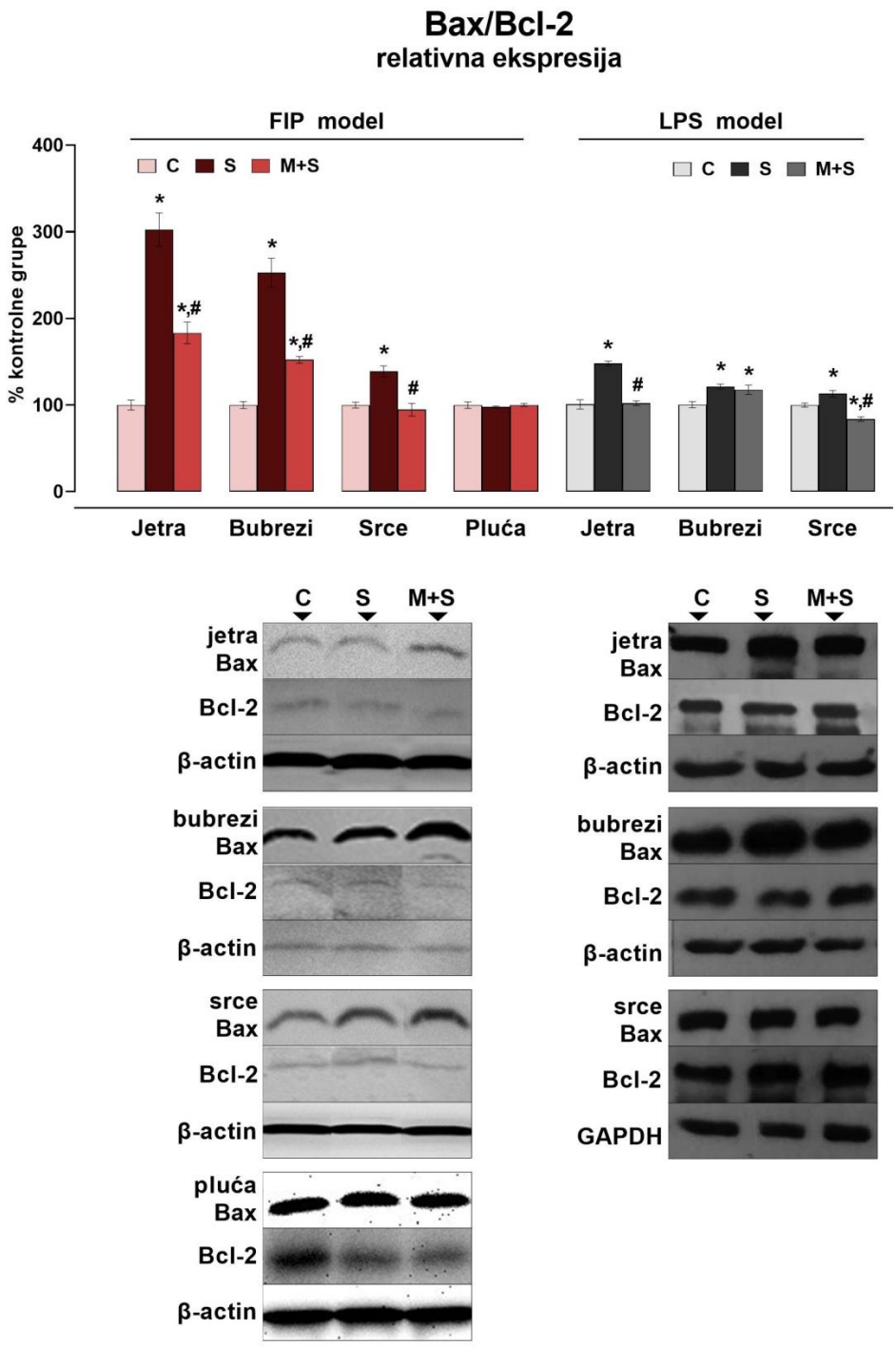


Slika 26. Ekspresija proinflamatornih markera HMGB1 i Hp u prefrontalnom korteksu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C).

Perturbacije proinflamatornih markera u jetri, bubrezima i srcu bile su izraženije u FIP sepsi i značajno ublažene meldonijumom. Nasuprot tome, u LPS sepsi, analiza srčanog tkiva ukazala je na izraženiju inflamaciju kod septičnih pacova pretretiranih meldonijumom. U moždanim strukturama perturbacije su takođe bile izraženije u FIP sepsi, gde je njihova prevencija meldonijumom izostala u prefrontalnom korteksu.

4.9. Uticaj pretretmana meldonijumom na odnos nivoa proteina Bax i Bcl-2 kod septičnih pacova

Radi sagledavanja antiapoptotskog potencijala meldonijuma u FIP i LPS modelima sepse,



Slika 27. Ekspresija i relativan odnos proapoptotskog Bax i antiapoptotskog Bcl-2 proteina u jetri, bubrezima, srcu i plućima pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin je korišćen kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

Western blot metodom je u jetri, bubrezima, srcu i plućima analizirana ekspresija antiapopoptskog Bax i proapoptotskog Bcl-2 proteina, a njihov odnos korišćen je kao indikator apoptotske aktivnosti. Rezultati ovih eksperimenata prikazani su na **Slici 27**.

Fecesom indukovana sepsa nije dovela do promene odnosa Bax/Bcl-2 samo u plućima, dok je u ostalim ispitivanim organima, u oba modela sepse, odnos Bax/Bcl-2 bio značajno povišen u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

U FIP modelu pretretman meldonijumom je u svim organima doveo do značajnog smanjenja Bax/Bcl-2 u odnosu na septične životinje, ali je njegova vrednost u jetri i bubrezima ostala povišena u poređenju sa kontrolama. U LPS modelu, odnos Bax/Bcl-2 je nakon pretretmana meldonijumom u bubrezima i dalje bio povišen u odnosu na kontrolu, dok je u jetri snižen do kontrolnih nivoa, a u srcu čak ispod nivoa kontrole (**Slika 27**).

Antiapoptotsko dejstvo pretretmana meldonijumom je uočeno u oba modela, ali je izostalo u bubrezima pacova sa LPS-indukovanom sepsom.

4.10. Uticaj pretretmana meldonijumom na koncentraciju kateholamina u nadbubrežnim žlezdama i serumu septičnih pacova

Da bi se ispitao efekat pretretmana meldonijumom na aktivaciju SAM sistema septičnih pacova, merena je koncentracija kateholamina u nadbubrežnim žlezdama i serumu. Rezultati ovih istraživanja prikazani su u **Tabeli 7**.

Fecesom indukovana sepsa je značajno smanjila koncentraciju adrenalina u nadbubrežnim žlezdama u poređenju sa kontrolnom grupom, pri čemu je meldonijum dodatno snizio ovu vrednost u odnosu na pacove S grupe. U isto vreme, koncentracija noradrenalina nije se menjala u nadbubrežnim žlezdama pacova sa FIP sepsom, dok je u M+S grupi bila značajno snižena u odnosu na pacove C i S grupe. Koncentracija adrenalina u serumu u istom modelu sepse bila je značajno niža kod pacova obe septične grupe u poređenju sa kontrolom, bez razlike između S i M+S grupe. Nasuprot tome, koncentracija noradrenalina bila je značajno povišena u serumu pacova S grupe u odnosu na kontrolnu, a snižena u M+S grupi u odnosu na C i S grupu (**Tabela 7**).

Tkivo / Parametar \ Eksp. grupa		FIP model sepse			LPS model sepse		
		C	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
Nadbubrežne žlezde [μg/g]	**Adrenalin**	100,00 ± 4,94	60,59 ± 2,95*	29,06 ± 0,96*,#	720,92 ± 28,16	484,77 ± 14,27*	510,22 ± 22,26*
	Noradrenalin	100,00 ± 3,22	98,36 ± 2,39	83,70 ± 3,23*,#	165,32 ± 4,30	139,71 ± 4,03*	129,54 ± 2,34*
Serum [pg/ml]	**Adrenalin**	1651,98 ± 66,58	1238,07 ± 53,21*	1354,90 ± 17,08*	1968,47 ± 92,01	4091,45 ± 229,69*	4159,28 ± 202,22*
	Noradrenalin	1297,67 ± 21,24	1475,20 ± 24,20*	957,23 ± 46,87*,#	1764,27 ± 85,68	3116,62 ± 144,72*	1765,05 ± 98,65#

Tabela 7. Koncentracije kateholamina adrenalina i noradrenalina u homogenatima nadbubrežnih žlezda i u serumu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

U LPS modelu sepse, koncentracije i adrenalina i noradrenalina bile su značajno niže u nadbubrežnim žlezdama pacova obe septične grupe u poređenju sa kontrolom, bez značajnih razlika među njima. U serumu pacova kojima je LPS-om indukovana sepsa, vrednosti oba kateholamina bile su značajno povišene u poređenju sa kontrolnom grupom. U ovom modelu, meldonijum je značajno smanjio koncentraciju noradrenalina u serumu u odnosu na septične pacove, ali nije imao efekta na adrenalin (**Tabela 7**).

Pretretman meldonijumom je u FIP sepsi dodatno iscrpeo adrenalne rezerve kateholamina, uz sniženje i njihovih serumskih koncentracija ispod kontrolnih vrednosti. Ovakvi efekti meldonijuma nisu uočeni u LPS modelu sepse.

4.11. Uticaj pretretmana meldonijumom na koncentraciju glukoze i laktata u tkivima septičnih pacova

Radi ispitivanja efekata pretretmana meldonijuma na metabolizam glukoze kod septičnh pacova u oba modela, određivana je glikemija i merene su koncentracije glukoze i laktata u jetri, bubrezima i srcu. Rezultati su prikazani **Tabelom 8**.

4.11.1. Serum

U FIP modelu sepse, koncentracija glukoze u serumu je u poređenju sa kontrolama bila

značajno snižena u S i M+S grupi, a bez razlike između njih. Nasuprot tome, u LPS je uzrokovao porast koncentracije glukoze u serumu pacova S grupe u odnosu na kontrolnu, dok je meldonijum značajno smanjio glikemiju, kako u poređenju sa C, tako i S grupom (**Tabela 8**).

4.11.2. Jetra

U FIP modelu sepse, koncentracija glukoze u jetri bila je povećana u poređenju sa kontrolnom grupom, a pretretman meldonijumom je ovu vrednost smanjio u odnosu na S grupu. U LPS modelu, koncentracija glukoze u jetri bila je smanjena u obe grupe (S i M+S) u poređenju sa kontrolom, bez razlike između njih.

U oba modela sepse nivo laktata u jetri bio je povećan u poređenju sa kontrolom, dok je meldonijum uzrokovao smanjenje i to do kontrolnih vrednosti u LPS modelu sepse, a u FIP modelu i dalje značajno iznad kontrolnih (**Tabela 8**).

		FIP model sepse			**LPS model sepse**		
Eksp. grupa / Parametar		**C**	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
Glukoza	**Serum**	6,84 ± 0,16	3,28 ± 0,56*	3,27 ± 0,67*	4,23 ± 0,02	6,47 ± 0,05*	2,19 ± 0,01$^{*,\#}$
	Jetra	2,35 ± 0,02	3,46 ± 0,04*	2,59 ± 0,02$^{\#}$	1,22 ± 0,01	1,09 ± 0,01*	1,08 ± 0,02*
	Bubrezi	1,27 ± 0,01	3,31 ± 0,10*	0,70 ± 0,01$^{*,\#}$	0,73 ± 0,01	0,67 ± 0,01*	0,69 ± 0,02*
	Srce	0,79 ± 0,01	0,55 ± 0,01*	0,13 ± 0,01$^{*,\#}$	0,79 ± 0,01	1,85 ± 0,02*	0,74 ± 0,01$^{*,\#}$
Laktat	**Jetra**	1,94 ± 0,01	4,19 ± 0,15*	2,47 ± 0,02$^{*,\#}$	2,63 ± 0,02	2,78 ± 0,02*	2,42 ± 0,01$^{*,\#}$
	Bubrezi	1,93 ± 0,13	3,47 ± 0,18*	2,72 ± 0,16$^{*,\#}$	2,46 ± 0,01	3,24 ± 0,01*	2,93 ± 0,01$^{*,\#}$
	Srce	0,31 ± 0,01	1,32 ± 0,01*	0,31 ± 0,01$^{\#}$	4,40 ± 0,01	4,87 ± 0,02*	4,71 ± 0,01$^{*,\#}$

Tabela 8. Koncentracije glukoze i laktata u serumu i homogenatima jetre, bubrega i srca pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Koncentracije u serumu su izražene u pg/ml, dok je koncentracija u tkivnim homogenatima izražena u mg/g. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje S vs. C; # označava poređenje M+S vs. S).

4.11.3. Bubrezi

Isti obrazac promena uočen u jetri zabeležen je i u bubrezima, odnosno povećanje koncentracije glukoze u FIP sepsi i njeno smanjenje u LPS sepsi. U bubrezima FIP-septičnih pacova pretretiranih meldonijumom koncentracija glukoze bila je značajno snižena u odnosu na S grupu, dok u LPS modelu takav efekat nije uočen.

U oba modela sepse, nivo laktata u bubrezima bio je povećan u poređenju sa odgovarajućim kontrolama, dok je meldonijum značajno smanjio ovaj parametar poređenju sa odgovarajućim septičnim grupama (**Tabela 8**).

4.11.4. Srce

Nasuprot jetri i bubrezima, u FIP modelu sepse sadržaj glukoze u srčanom tkivu bio je snižen, dok je u LPS modelu bio značajno povišen u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. U oba modela je pretretman meldonijumom, smanjio koncentraciju glukoze u srcu kako u poređenju sa kontrolnom, tako i sa S grupom (**Tabela 8**).

U poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom, koncentracija laktata bila je povišena u srcu septičnih pacova oba modela. Pretretman meldonijumom u FIP modelu rezultovao je vraćanjem nivoa laktata na kontrolne vrednosti, a u LPS modelu, iako značajno sniženi laktati su ostali povišeni u odnosu na kontrolnu grupu (**Tabela 8**).

Pretretman meldonijumom je sprečio FIP sepsom izazvano povećanje sadržaja glukoze u jetri, bubrezima i srcu, ali ne i hipoglikemiju. Kod LPS-septičnih pacova sprečio je sepsom indukovanu hiperglikemiju i povećanje sadržaja glukoze u srcu. U oba modela je u svim ispitivanim organima snizio sadržaj laktata u odnosu na vrednosti septične grupe bez pretretmana.

4.12. Uticaj pretretmana meldonijumom na koncentraciju L-karnitina u jetri, bubrezima i srcu septičnih pacova

Budući da meldonijum direktno utiče na sintezu L-karnitina, aminokiselinskog derivata značajnog za metabolizam masti i ugljenih hidrata, određivana je njegova koncentracija u jetri, bubrezima i srcu septičnih pacova. U oba modela sepse, koncentracija L-karnitina u jetri, bubrezima i srcu bila je povišena u odnosu na kontrolne vrednosti (**Tabela 9**).

Eksp. grupa / L-karnitin	FIP model sepse			LPS model sepse		
	C	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
Jetra	6,60 ± 0,02	17,26 ± 0,92*	4,63 ± 0,05$^{*,\#}$	0,57 ± 0,01	0,62 ± 0,01*	0,68 ± 0,01$^{*,\#}$
Bubrezi	1,76 ± 0,02	8,51 ± 0,66*	1,55 ± 0,18$^{\#}$	0,62 ± 0,01	0,69 ± 0,01*	0,73 ± 0,01$^{*,\#}$
Srce	0,99 ± 0,01	3,98 ± 0,04*	0,76 ± 0,01$^{\#}$	0,88 ± 0,01	0,98 ± 0,01*	1,02 ± 0,01$^{*,\#}$

Tabela 9. Koncentracije L-karnitina (mg/g) u homogenatima jetre, bubrega i srca pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

Pretretman meldonijumom je u FIP modelu značajno snizio koncentracije L-karnitina, dok je u LPS modelu zabeleženo njeno povećanje u poređenju sa vrednostima izmerenim u jetri, bubrezima i srcu pacova S grupe.

4.13. Uticaj pretretmana meldonijumom na lipidni status u tkivima septičnih pacova

Uticaj meldonijuma na lipidni status procenjivan je merenjem koncentracija TG i ukupnih SMK u serumu (**Tabela 10**), dok su u jetri (**Tabela 11**), bubrezima (**Tabela 12**) i srcu (**Tabela 13**) septičnih pacova dodatno analizirani koncentracija glicerola i profil pojedinačnih masnih kiselina.

4.13.1. Serum

U FIP modelu je uočen trend sniženja nivoa TG u serumu pacova obe grupe, koje je u LPS modelu bilo statistički značajno u poređenju sa kontrolnom. Meldonijum je u LPS modelu dodatno snizio TG u odnosu na S grupu.

Koncentracija ukupnih SMK u serumu pacova obe septične grupe je u FIP modelu bila značajno povišena, a u LPS modelu značajno snižena u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. U oba modela, pak, nije zabeležena razlika u nivou SMK između septičnih S i M+S grupa (**Tabela 10**).

	FIP model sepse			LPS model sepse		
Eksp. grupa / SERUM	**C**	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
TG (mmol/l)	1,24 ± 0,17	0,85 ± 0,02	0,85 ± 0,11	1,19 ± 0,01	0,86 ± 0,01*	0,52 ± 0,01*,#
SMK (mmol/l)	0,89 ± 0,17	2,73 ± 0,14*	2,98 ± 0,20*	1976,77 ± 38,60	1428,85 ± 2,61*	1399,51 ± 1,32*

Tabela 10. Koncentracije triglicerida (TG) i slobodnih masnih kiselina (SMK) u serumu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

4.13.2. Jetra

U FIP sepsi su zabeležene značajno povišene koncentracije glicerola, TG i ukupnih SMK u jetri poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, uočeno je i povećanje koncentracija SFAs: C14:0 (miristinska), C15:0 (pentadekanska), C16:0 (palmitinska), C17:0 (heptadekanska), C18:0 (stearinska); MUFAs: C16:1 (palmitoleinska) i C18:1 *cis* i *trans* (oleinska) i PUFAs: C18:2 *cis* i *trans* (linolna) i C22:6 (dokozaheksaenska kiselina, DHA). Kod pacova prethodno tretiranih meldonijumom, vrednosti koncentracija svih navedenih masnih kiselina bile su značajno niže u poređenju sa S grupom.

I u LPS sepsi su u jetri zabeležene značajno povišene koncentracije TG, glicerola, ukupnih SMK, kao i većine SFAs (C14:0, C15:0, C17:0, C18:0, C20:0), MUFAs (C18:1 *cis* i *trans*), i PUFAs (C22:6). Međutim, pretretman meldonijumom je u ovom modelu sepse dodatno povećao koncentraciju glicerola, ukupnih SMK, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1 *cis* i *trans* i C22:6, samo je koncentracija TG bila snižena (**Tabela 11**).

4.13.3. Bubrezi

U bubrezima pacova kojima je sepsa indukovana fecesom detektovane su povišene koncentracije glicerola i ukupnih SMK, kao i sledećih SFAs: C14:0, C16:0, C18:0, ali snižene koncentracije TG, C15:0 i C17:0 u poređenju sa kontrolom. Od nezasićenih masnih kiselina, u bubrezima pacova S grupe su bile povišene koncentracije C18:1 (*cis* i *trans*) i C18:2 (*cis* i *trans*), dok je koncentracija C22:6 bila snižena, u odnosu na kontrole. Kod septičnih pacova prethodno tretiranih meldonijumom, koncentracije skoro svih ispitivanih parametara bile su značajno niže u

poređenju sa S grupom, osim TG, čija je koncentracija ostala nepromenjena i masne kiseline C22:6, čija je koncentracija bila povećana u odnosu na S grupu.

U LPS sepsi su u bubrezima značajno bile povišene koncentracije TG, glicerola i ukupnih SMK, kao i svih analiziranih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C16:1, C18:1 (*cis* i *trans*), C18:2 (*cis* i *trans*) i C22:6). Pretretman meldonijumom je kod septičnih pacova doveo do daljeg porasta svih navedenih parametara, sa izuzetkom TG čija je koncentracija bila niža u odnosu na S i kontrolnu grupu (**Tabela 12**).

4.13.4. Srce

U FIP sepsi u srčanom tkivu su značajno bile povišene koncentracije glicerola, TG, ukupnih SMK, kao i navedenih zasićenih odnosno nezasićenih masnih kiselina: C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 (*cis* i *trans*) i C18:2 (*cis* i *trans*), dok su koncentracije C15:0, C17:0, C16:1 i C22:6 bile snižene. U M+S grupi, svi navedeni parametri su bili sniženi u odnosu na S grupu, izuzev polinezasićene masne kiseline C22:6 čija je koncentracija bila dodatno povišena.

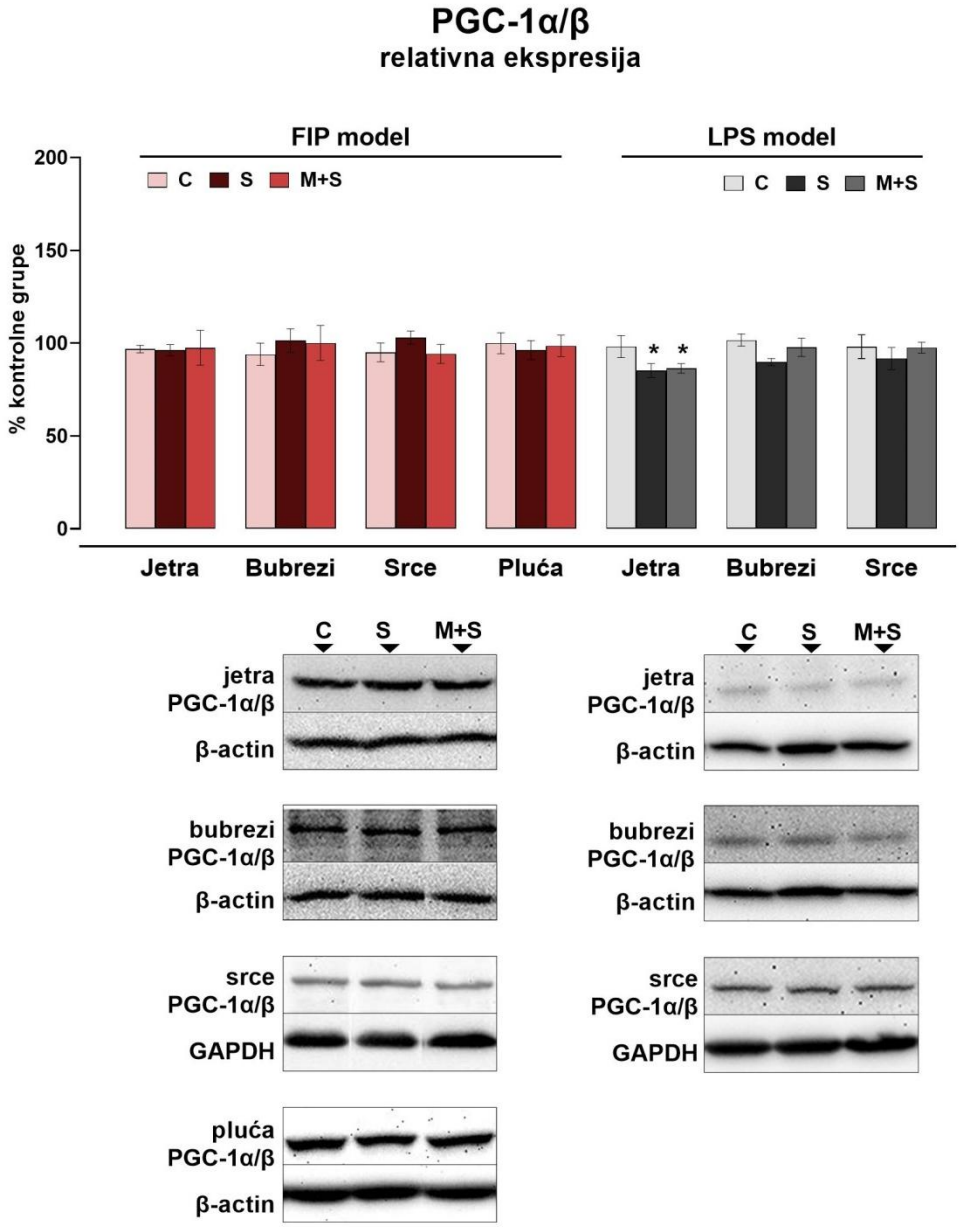
Kod septičnih pacova LPS modela je, u odnosu na kontrolnu grupu, bila povišena koncentracija TG i pojedinih masnih kiselina (C15:0, C18:1 (*cis*), C22:6), dok je koncentracija preostalih analiziranih pojedinačnih masnih kiselina, glicerola i ukupnih SMK bila značajno snižena. Svi navedeni parametri su u homogenatu srcu septičnih pacova prethodno tretiranih meldonijumom bili dodatno značajno sniženi u odnosu na S grupu, sa izuzetkom masnih kiselina C16:0 i C22:6 čija se koncentracija nije značajno razlikovala između dve septične grupe (**Tabela 13**).

Meldonijum je u FIP modelu snizio sadržaj sepsom povišenih lipidnih vrsta u jetri i bubrezima, pri čemu su vrednosti većine bile snižene i ispod kontrolnih, dok ih je u LPS sepsi dodatno povećao, uz istovremeno sniženje cirkulišućih lipida. U srčanom tkivu je u oba modela sepse doveo do sniženja lipidnih vrsta u odnosu i na septične i na kontrolne vrednosti.

4.14. Uticaj pretretmana meldonijumom na ekspresiju PGC-1α/β kod septičnih pacova

Western blot metodom analizirana je ekspresija transkripcionog faktora PGC-1α/β u jetri, bubrezima, srcu i plućima septičnih pacova.

U FIP modelu sepse, ekspresija PGC-1α/β nije se značajno razlikovala između ispitivanih grupa u svim analiziranim tkivima, dok je u LPS modelu sepse, nivo ovog proteina bio je značajno snižen samo u jetri i to kako netretiranih, tako i meldonijumom tretiranih pacova u odnosu na kontrolnu grupu pacova (**Slika 28**).



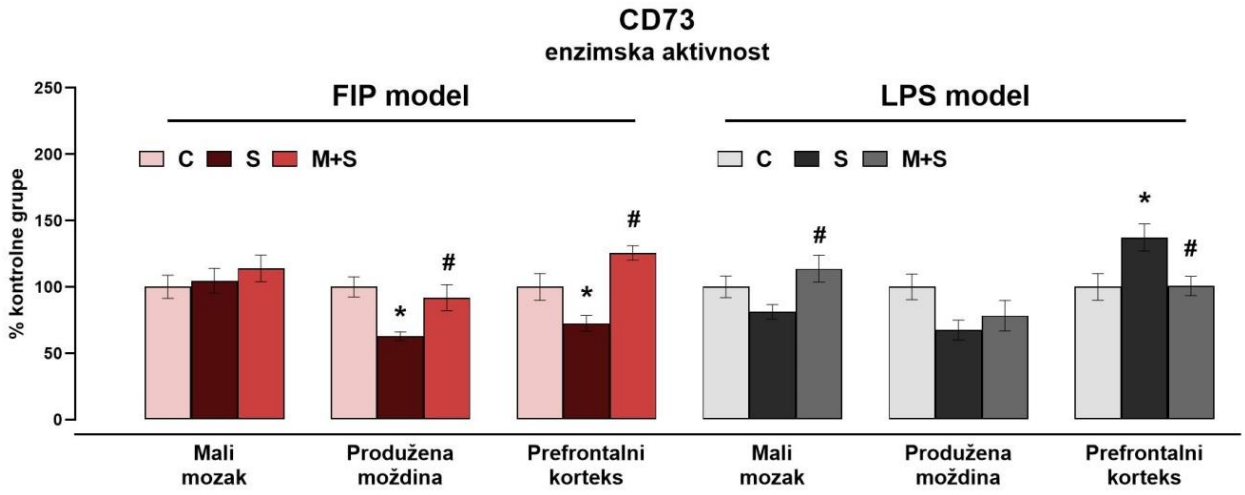
Slika 28. Ekspresija PGC-1α/β u jetri, bubrezima, srcu i plućima pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Prikazani su reprezentativni blotovi. β-aktin i GAPDH su korišćeni kao kontrola nalivanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C).

U analiziranim modelima sepse, pretretman meldonijumom nije uticao na ekspresiju PGC-1α/β, transkripcionog faktora sa ključnom ulogom u regulaciji energetskog metabolizma. Smanjenje njegove ekspresije zapaženo je jedino u jetri LPS-septičnih pacova, nezavisno od pretretmana.

4.15. Uticaj pretretmana meldonijumom na aktivnost ekto-5'-nukleotidaze (CD73) u moždanim regionima septičnih pacova

U cilju sagledavanja uticaja pretretmana meldonijumom na purinsku signalizaciju u mozgu septičnih pacova, stopa hidrolize AMP-a merena je u malom mozgu, produženoj moždini i prefrontalnom korteksu, kao pokazatelj aktivnosti enzima ekto-5'-nukleotidaze (CD73).

U FIP modelu sepse, aktivnost CD73 u malom mozgu nije se razlikovala između ispitivanih grupa. Nasuprot tome, u produženoj moždini i prefrontalnom korteksu, aktivnost ovog enzima bila je značajno snižena kod septičnih pacova u poređenju sa kontrolnom grupom. Pretretman meldonijumom doveo je do značajnog porasta aktivnosti CD73 u oba regiona, u odnosu na septične pacove koji nisu prethodno tretirani meldonijum (**Slika 29**).



Slika 29. Aktivnost ekto-5'-nukleotidaze (sin. CD73) u malom mozgu, produženoj moždini i prefrontalnom korteksu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

U LPS modelu sepse, aktivnost CD73 u malom mozgu i produženoj moždini septičnih pacova nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u prefrontalnom

korteksu zabeležen značajan porast aktivnosti ovog enzima. Kod septičnih pacova prethodno tretiranih meldonijumom, u poređenju sa S grupom, aktivnost ovog enzima bila je povećana u malom mozgu, smanjena u prefrontalnom korteksu, dok u produženoj moždini nije pokazivala značajne promene (**Slika 29**).

Prefrontalni korteks se izdvojio kao moždani region naročito osetljiv na sepsom indukovane perturbacije purinske signalizacije, koje su, ukupno posmatrano, bile izraženije u FIP modelu, gde su zahvatale i produženu moždinu. Pretretman meldonijumom sprečio je ove promene u oba modela, ali je u LPS sepsi povećao aktivnost ekto-5'-nukleotidaze (CD73) u malom mozgu, što je promena koja nije uočena u samoj sepsi.

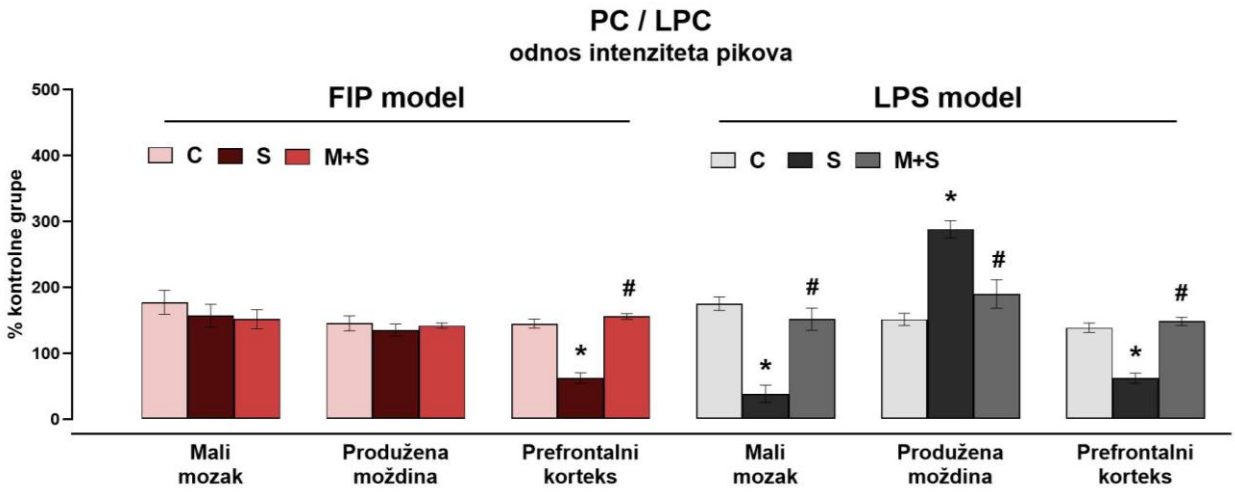
4.16. Uticaj pretretmana meldonijumom na odnos intenziteta pikova PC i LPC u malom mozgu, produženoj moždini i prefrontalnom korteksu septičnih pacova

Uticaj pretretmana meldonijumom na oštećenja membrana ćelija malog mozga, produžene moždine i prefrontalnog korteksa septičnih pacova procenjivan je određivanjem odnosa intenziteta pikova PC i LPC.

Kako se može videti na **Slici 30**, u FIP modelu, u malom mozgu i produženoj moždini, odnos PC/LPC nije se razlikovao između eksperimentalnih grupa. Međutim, ova vrednost je bila snižena u prefrontalnom korteksu septičnih pacova, a na kontrolnom nivou kod septičnih pacova pretretiranih meldonijumom.

U LPS modelu, odnos intenziteta pikova PC i LPC bio je snižen u malom mozgu i prefrontalnom korteksu, a povišen u produženoj moždini pacova S grupe u odnosu na C grupu, dok je meldonijum ove vrednosti vratio na kontrolni nivo.

Dobijeni rezultati izdvajaju prefrontalni korteks kao region naročito podložan oštećenjima ćelijskih membrana u sepsi, budući da su ona u ovom regionu uočena u oba modela. Pretretman meldonijumom je u oba modela sepse uspešno sprečio razvoj sepsom indukovanih oštećenja, koja su u LPS modelu bila izraženija i zahvatala sva tri ispitivana moždana regiona.



Slika 30. Relativan odnos intenziteta pikova fosfatidilholina (PC) i lizofosfatidilholina (LPC) u malom mozgu, produženoj moždini i prefrontalnom korteksu pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

Eksp. grupa / JETRA	FIP model sepse			LPS model sepse		
	C	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
TG (mg/g)	1,37 ± 0,08	5,75 ± 0,08*	2,05 ± 0,07$^{*,\#}$	1,05 ± 0,01	1,22 ± 0,01*	0,64 ± 0,01$^{*,\#}$
SMK (mg/g)	40,95 ± 0,26	77,19 ± 0,92*	37,12 ± 0,19$^{\#}$	2,22 ± 0,14	2,49 ± 0,09*	2,88 ± 0,90$^{*,\#}$
Glicerol (mg/g)	0,07 ± 0,01	1,23 ± 0,02*	0,88 ± 0,01$^{*,\#}$	2,27 ± 0,01	2,66 ± 0,01*	2,91 ± 0,01$^{*,\#}$
C14:0	8,33 ± 0,08	13,36 ± 0,40*	6,39 ± 0,06$^{*,\#}$	138,09 ± 0,85	147,20 ± 0,53*	169,34 ± 0,53$^{*,\#}$
C15:0	6,36 ± 0,04	11,77 ± 0,33*	7,25 ± 0,03$^{\#}$	18,81 ± 0,12	27,66 ± 0,10*	39,29 ± 0,09$^{*,\#}$
C16:0	5,14 ± 0,02	10,21 ± 0,30*	4,68 ± 0,03$^{\#}$	264,84 ± 1,63	231,32 ± 0,83*	263,10 ± 0,82$^{\#}$
C17:0	0,35 ± 0,04	0,72 ± 0,01*	0,31 ± 0,01$^{\#}$	21,29 ± 0,13	29,23 ± 0,10*	28,15 ± 0,08*
C18:0	5,12 ± 0,01	12,43 ± 0,13*	4,78 ± 0,03$^{\#}$	388,47 ± 2,39	425,62 ± 1,42*	496,44 ± 1,55$^{*,\#}$
C16:1	0,46 ± 0,01	0,65 ± 0,01*	0,31 ± 0,01$^{*,\#}$	60,17 ± 0,37	59,04 ± 0,21	60,52 ± 0,19
C18:1 *cis*	2,17 ± 0,02	3,03 ± 0,02*	1,52 ± 0,03$^{*,\#}$	164,51 ± 1,01	191,59 ± 0,76*	236,69 ± 0,74$^{*,\#}$
C18:1 *trans*				191,62 ± 1,18	224,63 ± 0,77*	255,52 ± 0,80$^{*,\#}$
C18:2 *cis* + *trans*	5,01 ± 0,04	9,46 ± 0,14*	4,26 ± 0,03$^{\#}$	325,32 ± 2,00	366,35 ± 1,28*	369,45 ± 1,15*
C22:6	0,82 ± 0,01	1,56 ± 0,10*	0,84 ± 0,01$^{\#}$	210,24 ± 1,29	275,06 ± 0,99*	376,26 ± 1,17$^{*,\#}$

Tabela 11. Lipidni profil homogenata jetre pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Koncentracija pojedinačnih masnih kiselina je izražena u μg/g. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

Eksp. grupa / BUBREZI	FIP model sepse			LPS model sepse		
	C	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
TG (mg/g)	1,62 ± 0,05	1,11 ± 0,01*	1,28 ± 0,02*	0,49 ± 0,01	0,74 ± 0,01*	0,16 ± 0,01$^{*,\#}$
SMK (mg/g)	443,13 ± 11,70	938,70 ± 66,01*	257,39 ± 4,71$^{*,\#}$	1152,98 ± 3,26	1330,30 ± 3,05*	1603,68 ± 7,08$^{*,\#}$
Glicerol (mg/g)	0,37 ± 0,01	0,67 ± 0,02*	0,32 ± 0,01$^{\#}$	0,35 ± 0,01	0,78 ± 0,01*	0,98 ± 0,01$^{*,\#}$
C14:0	6,05 ± 0,12	37,32 ± 1,93*	16,68 ± 0,26$^{*,\#}$	66,99 ± 0,19	81,85 ± 0,19*	96,85 ± 0,43$^{*,\#}$
C15:0	82,96 ± 2,17	3,29 ± 0,86*	0,13 ± 0,01$^{*,\#}$	8,13 ± 0,02	10,32 ± 0,02*	14,55 ± 0,06$^{*,\#}$
C16:0	39,50 ± 1,62	489,56 ± 25,49*	143,87 ± 3,86$^{*,\#}$	138,45 ± 0,39	166,40 ± 0,38*	185,06 ± 0,82$^{*,\#}$
C17:0	59,14 ± 1,53	24,15 ± 3,15*	0,10 ± 0,01$^{*,\#}$	13,32 ± 0,04	16,81 ± 0,04*	19,82 ± 0,09$^{*,\#}$
C18:0	44,91 ± 1,15	172,76 ± 17,15*	50,24 ± 1,44$^{\#}$	198,42 ± 0,56	216,05 ± 0,50*	319,69 ± 1,15$^{*,\#}$
C16:1	56,84 ± 1,25	11,74 ± 0,93	0,09 ± 0,01$^{*,\#}$	34,18 ± 0,10	42,64 ± 0,10*	55,38 ± 0,24$^{*,\#}$
C18:1 *cis*	18,64 ± 0,85	103,39 ± 14,80*	0,26 ± 0,01$^{*,\#}$	84,79 ± 0,24	97,28 ± 0,22*	123,25 ± 0,54$^{*,\#}$
C18:1 *trans*				94,95 ± 0,27	103,94 ± 0,24*	137,44 ± 0,61$^{*,\#}$
C18:2 *cis* + *trans*	24,55 ± 0,60	82,40 ± 14,13*	20,06 ± 0,66$^{\#}$	164,79 ± 0,47	190,12 ± 0,44*	211,34 ± 0,93$^{*,\#}$
C22:6	17,59 ± 1,10	5,53 ± 0,29*	13,17 ± 0,48$^{\#}$	101,98 ± 0,29	122,42 ± 0,28*	158,62 ± 0,70$^{*,\#}$

Tabela 12. Lipidni profil homogenata bubrega pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Koncentracija pojedinačnih masnih kiselina je izražena u μg/g. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

	FIP model sepse			LPS model sepse		
Eksp. grupa / **SRCE**	**C**	**S**	**M+S**	**C**	**S**	**M+S**
TG (mg/g)	0,86 ± 0,03	1,96 ± 0,02*	0,95 ± 0,02$^{\#}$	0,47 ± 0,01	0,65 ± 0,01*	0,23 ± 0,01$^{*,\#}$
SMK (mg/g)	242,07 ± 5,90	507,94 ± 32,94*	147,26 ± 2,36$^{*,\#}$	1512,18 ± 3,54	1402,85 ± 6,71*	1371,66 ± 7,28$^{*,\#}$
Glicerol (mg/g)	0,07 ± 0,02	0,31 ± 0,01*	0,09 ± 0,01$^{\#}$	2,08 ± 0,01	1,95 ± 0,01*	1,27 ± 0,01$^{*,\#}$
C14:0	7,19 ± 0,07	25,34 ± 0,87*	11,54 ± 0,13$^{*,\#}$	43,86 ± 0,01	35,24 ± 0,16*	28,02 ± 0,15$^{*,\#}$
C15:0	44,66 ± 1,10	7,53 ± 0,41*	3,69 ± 0,01$^{*,\#}$	4,61 ± 0,01	5,74 ± 0,025*	4,56 ± 0,03$^{\#}$
C16:0	22,32 ± 0,81	249,88 ± 12,71*	74,27 ± 1,92$^{*,\#}$	127,17 ± 0,29	120,42 ± 0,54*	121,22 ± 0,65*
C17:0	29,74 ± 0,77	12,44 ± 1,58*	0,20 ± 0,01$^{*,\#}$	14,16 ± 0,03	10,38 ± 0,04*	8,07 ± 0,05$^{*,\#}$
C18:0	25,01 ± 0,58	92,59 ± 8,59*	27,51 ± 0,72$^{\#}$	196,86 ± 0,45	178,38 ± 0,84*	165,96 ± 0,96$^{*,\#}$
C16:1	28,65 ± 0,63	6,19 ± 0,46*	0,20 ± 0,01$^{*,\#}$	40,90 ± 0,09	33,15 ± 0,15*	24,58 ± 0,13$^{*,\#}$
C18:1 *cis*	10,41 ± 0,42	53,21 ± 7,40*	0,89 ± 0,01$^{*,\#}$	103,71 ± 0,24	130,54 ± 0,58*	119,18 ± 0,63$^{*,\#}$
C18:1 *trans*				162,94 ± 0,35	149,85 ± 0,67*	134,49 ± 0,77$^{*,\#}$
C18:2 *cis* + *trans*	14,78 ± 0,29	45,93 ± 7,04*	12,16 ± 0,32$^{\#}$	194,69 ± 0,42	180,92 ± 0,81*	166,48 ± 0,88$^{*,\#}$
C22:6	9,20 ± 0,55	3,55 ± 0,14*	7,01 ± 0,24$^{*,\#}$	186,95 ± 0,42	212,38 ± 0,95*	211,12 ± 1,07*

Tabela 13. Lipidni profil homogenata srčanog tkiva pacova kontrolne grupe (C), septične grupe bez pretretmana meldonijumom (S) i septične grupe prethodno tretirane meldonijumom (M+S) u FIP i LPS modelima sepse. Koncentracija pojedinačnih masnih kiselina je izražena u μg/g. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (SEM). Statistička značajnost je definisana kao $P < 0,05$ (* označava poređenje sa C; # označava poređenje sa S).

5. DISKUSIJA

Sepsa je složeno patofiziološko stanje koje nastaje usled neadekvatnog imunskog odgovora organizma na infekciju. Praćeno je progresivnim oštećenjem tkiva i organa, često sa fatalnim ishodom [1]. Uprkos naporima uloženim u razumevanje molekulskih mehanizama koji leže u osnovi patogeneze sepse, i dalje ne postoji specifična, ciljano usmerena terapija koja bi efikasno zaustavila njenu progresiju. U kliničkoj praksi, lečenje sepse se dominantno svodi na tzv. suportivnu terapiju (eng. *supportive therapy*) koja podrazumeva kontrolu izvora infekcije, primenu antibiotika širokog spektra, nadoknadu tečnosti, podršku funkciji vitalnih organa (npr. mehaničkom ventilacijom i hemodijalizom) uz kontinualno praćenje hemodinamskih parametara i drugih laboratorijskih pokazatelja [203].

Jedini farmakološki agens koji je do sada bio zvanično odobren za lečenje teških oblika sepse kod odraslih pacijenata je rekombinantni humani aktivirani protein C (sin. drotrekogin alfa, DrotAA) [204]. Ovaj lek je 2001. godine odobren od strane Američke uprave za hranu i lekove (eng. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA), a godinu dana kasnije i od strane Evropske agencije za lekove (eng. *European medicines agency*, EMA) [205]. Na tržištu je bio dostupan pod nazivom ksigris (eng. *xigris*), ali je povučen 2011. godine nakon što je klinička studija pokazala da ne smanjuje smrtnost kod septičnih pacijenata, a da povećava rizik od ozbiljnih neželjenih efekata, poput unutrašnjeg krvarenja [204].

Slučaj sa ksigrisom je dodatno istakao kompleksnost sepse i potrebu za drugačijim strategijama u potrazi za terapeuticima. Tokom poslednje decenije, raste interesovanje za prenamenu lekova (eng. *drug repurposing*) čiji su farmakokinetika i bezbednosni profil već dobro okarakterisani i odobreni su za lečenje drugih bolesti [206]. Takav pristup omogućava bržu translaciju iz laboratorijskih istraživanja u kliničku praksu, uz značajno smanjenje troškova [206].

Među lekovima reprofilisanim za terapiju sepse nalaze se metformin i statini, koji se prvenstveno koriste u terapiji dijabetesa tipa 2, odnosno hiperholesterolemije. U animalnim studijama je pokazano da metformin smanjuje upalne procese i smrtnost u sepsi [207,208]. Prema metaanalizi iz 2019. godine, prethodna terapija metforminom kod obolelih od dijabetesa tipa 2 smanjuje smrtnost u slučaju razvoja sepse [209]. Takođe, u retrospektivnoj studiji iz 2025. godine zabeležena je niža stopa smrtnosti kod dijabetičnih pacijenata koji su koristili metformin

po nastupanju septičnog šoka [210]. Ipak, i dalje nisu sprovedene kliničke studije koje bi potvrdile ove rezultate. U slučaju statina, nakon ohrabrujućih rezultata u animalnim modelima sepse, započeta su klinička ispitivanja čiji su rezultati, nažalost, pokazali izvesnu nedoslednost [211–213]. Dok je jedna studija ukazala na povezanost preventivne primene statina sa boljim preživljavanjem septičnih pacijenata [212], druga je pokazala da statini usporavaju progresiju sepse u teže oblike, ali bez uticaja na stopu smrtnosti [213].

Meldonijum, aktivna supstanca leka Mildronate®, sintetisan je u Letoniji 1970-ih godina, a kasnije odobren u Letoniji, Litvaniji, Rusiji, Ukrajini i Gruziji za kliničku upotrebu u lečenju ishemijskih stanja kao što su angina pektoris, hronična srčana insuficijencija i poremećaji moždane cirkulacije [214]. Naime, meldonijum sprečava nakupljanje citotoksičnih intermedijera β-oksidacije u tkivima, što se pokazalo korisnim u stanjima poput ishemije miokarda i mozga [152]. Ideja za njegovu prenamenu proizlazi iz činjenice da je, pored primarne upotrebe u ishemijskim stanjima srca i mozga, ispitivan i u nizu drugih patoloških stanja. Tako su pojedini autori pokazali da u modelima akutne neurotoksičnosti i traumatske povrede mozga kod miševa i pacova, meldonijum smanjuje inflamaciju i apoptozu [169–171]. U modelima epilepsije, akutne fokalne ishemije mozga i intoksikacije etanolom, meldonijum ispoljava antikonvulzivno dejstvo [180]. U modelima neurodegenerativnih bolesti, kao što su AD i PD, meldonijum pomaže očuvanje kognitivnih i motoričkih funkcija, i umanjuje nakupljanje neurodegenerativnih plakova i inflamatornih markera [177,215,216]. Takođe, dugotrajna primena meldonijuma poboljšava kratkoročno i dugoročno pamćenje kod starih miševa [217]. Vredi istaći i da meldonijum usporava rast tumora u mišjem modelu glioblastoma [179]. Više autora je ukazalo na njegova neuroprotektivna svojstva i u perifernom nervnom sistemu [173,174]. Kod miševa, meldonijum je ublažio oštećenja perifernih nerava u modelima neuropatije, dok je očuvao motoričke funkcije u zečijem modelu ishemijsko-reperfuzione povrede kičmene moždine [173,174].

Istraživačka grupa, u okviru koje je izrađena i ova doktorska disertacija, pokazala je antioksidativna, antiinflamatorna i antiapoptotska svojstva meldonijuma u animalnim modelima ishemijsko-reperfuzionog oštećenja jetre odnosno bubrega [189,190]. U mišjem modelu srpaste anemije, bolesti koju karakteriše progresivno oštećenje bubrega, tretman meldonijumom doveo je do poboljšanja bubrežne funkcije [163]. U modelima povrede pluća različite etimologije, meldonijum je smanjio inflamaciju, oksidativni stres i edem pluća [166,167]. Takođe, u pacovskom modelu dijabetesa tipa 2, meldonijum je bio efikasan u normalizaciji i održavanju

glikemije [159].

Uprkos brojnim animalnim studijama, klinička ispitivanja uticaja meldonijuma bila su prvenstveno usmerena na kardiovaskularna, a u manjoj meri i na respiratorna oboljenja. Tako je sredinom 2000-ih godina, ispitivan uticaj meldonijuma kod pacijenata sa stabilnom anginom pektoris, kao i bronhijalnom astmom i hroničnim opstruktivnim bronhitisom [182,186]. Tokom naredne decenije, istraživanja su proširena na postinfarktni period, akutni koronarni sindrom i rehabilitaciju nakon perkutane koronarne intervencije [218–220]. Iako su klinička ispitivanja u oblasti kardiologije i dalje aktuelna [185], interesovanje za njegovu prenamenu raste, pa je trenutno u toku kliničko ispitivanje oralne primene meldonijuma kod pacijenata sa metastatskim karcinomom bubrega [221].

Dosadašnja istraživanja stanja koja karakterišu isti patofiziološki mehanizmi kao i sepsu (npr. oksidativni stres, inflamacija, oštećenje mitohondrija) pružila su ograničen, pretežno indirektan uvid u efekte meldonijuma u uslovima sepse. Većina podataka potiče iz modela endotoksemije izazvane LPS-om, koji su usmereni na pojedine organe, uz znatne razlike u doziranju i dužini primene kako LPS-a, tako i meldonijuma [164,175,217,222,223]. Sjakste i sar. su prvi ukazali na njegov potencijal u ublažavanju neuroloških komplikacija sepse, pokazavši da meldonijum smanjuje LPS-om indukovanu produkciju NO u malom mozgu i frontalnom korteksu pacova [222]. Protektivni efekti meldonijuma nakon izazivanja povrede LPS-om zabeleženi su i u hipokampusu, plućima i gastrointestinalnom traktu [164,217,223]. Najnovija studija o povoljnim efektima meldonijuma nakon izazivanja sistemske inflamacije LPS-om, objavljena je 2025. godine i pokazala je da je meldonijum očuvao lokomotornu aktivnost i eksploratorno ponašanje kod pacova [175].

U različitim modelima meldonijum je ispoljio protektivna svojstva modulacijom patofizioloških mehanizama koji su uključeni i u razvoj sepse. Stoga, hipoteza ove doktorske disertacije je bila da pretretman meldonijum može povoljno da utiče na tok i ishod sepse. Opšti cilj bio je da se ispitaju i uporede efekti meldonijuma u dva široko prihvaćena pacovska modela polimikrobne sepse i modelu endotoksemije. Analizirani su jetra, bubrezi, srce, pluća, kao i moždani regioni od posebnog interesa u sepsi. Sprovedena je opsežna histološka analiza, kao i analiza inflamatornih markera, oksidativnog stresa, apoptoze i lipidnog profila. Preživljavanje, telesna temperatura, očuvanost refleksa i biohemijski parametri u serumu praćeni su kao standardni pokazatelji stanja organizma u modelima sepse [224].

Odabir doze, kao i način i dužina primene meldonijuma, definisani su u skladu sa dostupnim podacima iz literature [159,163,166,167,169–171,173,174,176,179,180,189,190,216, 217,225]. U animalnim studijama, doza meldonijuma varira od 20–400 mg/kg t.m., a najčešći način administracije je i.p. primena. U literaturi je opisana široka varijabilnost u trajanju primene meldonijuma, od jednokratne aplikacije, preko kratkotrajnih pretretmana u trajanju od nekoliko dana, do dugotrajnih režima od nekoliko meseci do godinu dana [159,163,166,167,169–171,173, 174,176,179,180,189,190,216,217,225]. Za potrebe ove doktorske disertacije odabrana je oralna primena meldonijuma, u trajanju od četiri nedelje pre indukcije sepse, u dozi od 300 mg/kg t.m. pacova. Odabrana doza odgovara koncentracijama prethodno ispitivanim u studijama na životinjama [148,189,190,226], a prema vodiču za konverziju doza između pacova i ljudi, usklađena je sa preporučenom ljudskom dozom preparata Mildronate® [226]. Najzad, definisani režim doziranja omogućio je poređenje rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji sa rezultatima prethodnih istraživanja efekata meldonijuma u drugim invazivnim modelima, sprovedenih u istoj laboratoriji [189,190].

Vremenski obrazac pretretmana meldonijumom odabran je na osnovu dostupnih literaturnih podataka. Liepinsh i sar. su pokazali da kod pacova oralni unos meldonijuma u dozama od 100 do 400 mg/kg t.m. dovodi do stabilizacije nivoa L-karnitina nakon četiri nedelje [148]. Pri dužoj primeni meldonijuma, ne beleže se dalje promene u nivou L-karnitina [148]. Slični nalazi potvrđeni su kod zdravih osoba, kod kojih je došlo do značajnog smanjenja koncentracije L-karnitina u krvnoj plazmi nakon četiri nedelje oralne primene [187]. Pored toga, u skladu sa preporukama proizvođača preparata Mildronate® terapijska primena leka kod ishemijskih stanja predviđena je u trajanju od četiri do šest nedelja [141].

Prilikom modelovanja sepse, uobičajena praksa podrazumeva eutanaziju životinja kada stopa smrtnosti dostigne 25–50%, što odgovara stopama smrtnosti zabeleženim kod pacijenata sa abdominalnom sepsom [227–229]. Neočekivani nalaz ove doktorske disertacije je da je u prvih devet sati po injeciranju suspenzije fecesa, stopa smrtnosti od 50% zabeležena u grupi pacova prethodno tretiranih meldonijumom, dok je smrtnost pacova bez pretretmana meldonijumom bila značajno niža (12,5%). Ovaj rezultat bio je iznenađujući, imajući u vidu korisne efekte meldonijuma dokumentovane u drugim invazivnim animalnim modelima, kako u radovima drugih autora [159,163,166,167,169–171,173,174,176,179,180,216,217,225], tako i prethodnim istraživanjima ove laboratorije [189,190]. U istom vremenskom okviru, stopa smrtnosti LPS-

septičnih pacova pretretiranih meldonijumom je bila znatno niža u poređenju sa FIP modelom i iznosila je 12,5%. Radi obezbeđivanja dovoljne veličine uzorka u FIP modelu, pri odabiru vremenske tačke žrtvovanja rukovođeno je dinamikom preživljavanja u M+S grupi, u kojoj je smrtnost rasla brže nego u S grupi. Pacovi su eutanazirani u devetom satu, kada je smrtnost u M+S grupi dostigla 50%. Iako u LPS sepsi nisu zabeležena uginuća, a stopa smrtnosti u M+S grupi ovoga modela bila je znatno niža u odnosu na FIP model (12,5%), pacovi su eutanazirani u istoj vremenskoj tački radi poredivosti dva modela.

Devet sati po indukovanju sepse, u FIP sepsi su uginula dva pacova, dok u LPS sepsi uginuća nisu zabeležena. Prvo uginuće u FIP sepsi je nastupilo po isteku šestog sata od injeciranja suspenzije fecesa, što je u skladu sa podacima drugih istraživačkih grupa [230]. Ne iznenađuje ni to da u LPS modelu sepse, pri dozi LPS-a od 5 mg/kg t.m., nisu zabeležena uginuća u prvih devet sati. Ovaj rezultat je u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da i znatno više doze (npr. 50 mg/kg t.m.) dovode do uginuća životinja tek nakon približno 24 sata od momenta injeciranja LPS-a [231]. Usled polimikrobne i invazivnije prirode FIP modela, zabeležena razlika u stopi smrtnosti između FIP i LPS modela je bila očekivana. Agresivnija priroda FIP modela sepse ogledala se i u tome što su već u prvom satu po injeciranju suspenzije fecesa kod pacova uočeni otežano i ubrzano disanje, smanjena lokomotorna aktivnost i „uvlačenje“ lateralnog abdomena usled razvoja peritonitisa. U LPS modelu, ovi simptomi nisu bili prisutni.

Stopa smrtnosti u FIP modelu, pri dozi od 5 g fecesa po kg t.m. pacova, iznosila je 12,5%, što je značajno niže u poređenju sa ranijim studijama, iako se ova doza smatra visokom i efikasnom u izazivanju sepse [232]. Na primer, iako su koristili dozu nižu od primenjene u ovim eksperimentima (1 g/kg t.m), Fang i sar. su kod Sprague-Dawley pacova zabeležili smrtnost od 50% u devetom satu od injeciranja suspenzije fecesa [230]. S druge strane, Lee i sar. navode da je, pri dozi fecesa od 4,5 g/kg t.m., medijana preživljavanja Sprague-Dawley pacova iznosila 11 sati [232]. Ovi nalazi ističu inherentnu varijabilnost FIP modela. Faktori poput sadržaja vode u fecesu u trenutku prikupljanja i vremena proteklog od pripreme suspenzije fecesa do injeciranja utiču na udeo živih mikroorganizama u njoj, a samim tim i na tok sepse i smrtnost [233]. Iako ova osobina polimikrobnih modela sepse rezultuje njihovom nižom reproducibilnošću, ujedno omogućava vernije modelovanje kliničke sepse u poređenju sa endotoksemijom.

U oba modela nisu uočene značajne promene telesne temperature u septičnim grupama u

odnosu na odgovarajuće sham kontrolne grupe. Ovaj nalaz je očekivan i u skladu je sa studijama koje su pokazale odsustvo febrilne reakcije u pacovskom modelu sepse [234,235]. Interesantno je da, iako u FIP modelu nije zabeležena promena telesne temperature, u LPS modelu je analiza površine ispod krive ukazala na blagi pad telesne temperature kod meldonijumom tretiranih pacova u poređenju sa S grupom. Može se pretpostaviti da metabolička adaptacija u osnovi delovanja meldonijuma potencijalno moduliše proizvodnju metaboličke toplote. Ipak, objašnjenje uočenog pada telesne temperature zahteva ispitivanja njegovog uticaja na termoregulaciju, o kom za sada postoje samo posredna saznanja. Naime, pojedini autori sugerišu da meldonijum pomaže pacijentima sa kardiovaskularnim bolestima u prilagođavanju na ekstremne ambijentalne temperature, ali bez podataka o mehanizmima ovog dejstva [236,237].

Tok i ishod sepse direktno zavise od stepena očuvanosti funkcije vitalnih organa. Progresivno oštećenje organa razvija se pod uticajem patogena i njihovih toksina, ali i inflamatornih medijatora koji, kada su prekomerno produkovani, doprinose progresivnim oštećenjima tkiva i pogoršavaju ishod i tok bolesti [25,34,35]. Jetra ima ključnu ulogu u klirensu bakterija i endotoksina, ali kontinualna izloženost ovim faktorima remeti funkciju i može dovesti do njenog nepovratnog oštećenja (eng. *sepsis-induced liver injury*, SILI) i otkazivanja [238]. Akutno oštećenje bubrega povezano sa sepsom (eng. *sepsis-associated acute kidney injury*, S-AKI), kao i sepsom-indukovana disfunkcija miokarda (eng. *sepsis-induced myocardial dysfunction*, SIMD), takođe su snažni indikatori fatalnog ishoda u sepsi [239–241]. Rano nastupa i sepsom-indukovano akutno oštećenje pluća (eng. *sepsis-induced acute lung injury*, S-ALI), koje bez pravovremene i efikasne terapije može napredovati u akutni respiratorni distres sindrom (eng. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) sa nepovratnim oštećenjem pluća [242,243].

Oštećenje jetre nastupa rano, već u prvih nekoliko sati po izazivanju sepse [244]. Kod pacova, procesi biotransformacije i hepatobilijarnog transporta narušeni su već šest sati nakon injeciranja suspenzije fecesa [244]. Histološke promene na jetri koje se javljaju u sepsi, a koje su uočene i u ovim istraživanjima u oba modela, uključuju vakuolizaciju (eng. *ballooning*), nekrozu hepatocita, steatozu, vensku kongestiju i prisustvo inflamatornih infiltrata [245]. Venska kongestija može značajno da uspori protok krvi kroz sinusoidne kapilare, kompromitujući sposobnost jetre da efikasno uklanja patogene i endotoksine iz cirkulacije [136,246]. Ove histološke promene praćene su porastom aktivnosti enzima AST, ALT i ALP u serumu, kao

klasičnih pokazatelja oštećenja jetre [19].

Rezultati ove disertacije pokazali su da je pretretman meldonijumom u oba modela sepse smanjio obim navedenih histopatoloških promena u jetri, što je rezultovalo i značajnim smanjenjem aktivnosti AST i ALT u serumu. Sa druge strane, aktivnost ALP je ostala povišena i nakon tretmana meldonijumom. Porast AST i ALT ukazuje na hepatocelularno oštećenje, tj. narušavanje integriteta parenhimskih hepatocita i izlivanje njihovog unutarćelijskog sadržaja, koji posledično dospeva i u krvotok [19]. Sa druge strane, enzim ALP se nalazi u citostolu periportalnih hepatocita i holangiocita, do čijeg oštećenja, a time i do ispuštanja ALP u krvotok dolazi usled holestaze, koja predstavlja usporen ili u potpunosti obustavljen protok žuči kroz hepatobilijarne kanaliće u lumen dvanaestopalačnog creva [19,247]. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je pretretman meldonijumom ispoljio protektivna dejstva na hepatocelularna oštećenja, dok izostali uticaj na serumski ALP ukazuje da nije sprečio holestatsko oštećenje jetre. Ovaj nalaz je donekle podržan studijom Liepinsh i sar. koji su ispitivali da li dugotrajna primena meldonijuma dovodi do značajnih strukturnih i funkcijskih promena u jetri. Interesantno je da su uočili da tretman meldonijumom od četiri do osam nedelja povećava serumski ALP kod intaktnih pacova [148].

Inflamacija i apoptoza su mehanizmi koji se nalaze u osnovi oštećenja jetre u sepsi [75-77], a njihova inhibicija pokazala je hepatoprotektivne efekte u LPS i CLP modelima sepse [250–255]. U oba modela sepse primenjena u ovoj doktorskoj disertaciji zabeležen je porast odnosa antiapoptotskog Bax i proapoptotskog Bcl-2. Takođe je zabeležen porast fosforilacije NFκB p65 u FIP modelu sepse, odnosno porast ukupnog sadržaja ove subjedinice u LPS modelu, što je u skladu sa navodima da je aktivacija NFκB jedan od ranih događaja u patogenezi sepse [256]. Ni kod FIP- ni kod LPS-septičnih pacova nisu uočene promene proinflamatornog markera HMGB1, što ukazuje na to da inflamatorni odgovor jetre u ovom stadijumu sepse ne zavisi od HMGB1.

Pretretman meldonijumom ispoljio je antiinflamatorno i antiapoptotsko dejstvo u jetri u oba modela sepse, što se ogleda u sniženju nivoa HMGB1, fosforilisane forme i ukupnog sadržaja NFκB p65 subjedinice, Hp i odnosa Bax/Bcl-2 u poređenju sa S grupom. Ipak, ovi rezultati sugerišu da je efekat meldonijuma bio izraženiji u LPS modelu, s obzirom na to da su u FIP modelu nivo p-NFκB p65 i Bax/Bcl-2 ostali povišeni u jetri pacova M+S grupe u odnosu na kontrolnu. Ovaj rezultat može doprineti razjašnjavanju visoke stope smrtnosti koja je uočena u

M+S grupi FIP modela sepse. Naime, pokazano je da viši nivo aktivacije NFκB u sepsi koreliše sa težim kliničkim ishodom i povećanom stopom mortaliteta [257].

Zbog svoje intenzivne metaboličke aktivnosti i važne uloge u detoksikaciji organizma, jetra predstavlja organ sa visokom produkcijom ROS [258]. Kao odgovor na oksidativni stres, kako u parenhimskim tako i neparenhimskim ćelijama jetre, aktivira se signalni put posredovan transkripcionim faktorom Nrf2 i ARE nukleotidnim sekvencama [259]. To pokreće ekspresiju antioksidativnih enzima poput SOD, CAT i GSH-Px, koji neutrališu ROS [259]. U oba modela sepse, u jetri je zabeležena povećana produkcija ROS, što se ogleda u porastu LPO. Razlike u aktivaciji enzimske antioksidativne komponente ukazuju da su perturbacije bile izraženije u LPS modelu. U FIP sepsi uočena je povišena aktivnost GSH-Px, bez promene u aktivnostima SOD izoformi i CAT. Lima i sar. su, u polimikrobnom modelu sepse dobili iste rezultate [260]. Nasuprot FIP modelu, obrazac promena u LPS sepsi deluje složenije, sa smanjenjem odgovora glutationskog sistema i aktivnosti CAT, dok su promene aktivnosti SOD izoformi bile suprotno usmerene. Ovo je podržano radovima koji pokazuju da jetra na LPS reaguje sniženom aktivnošću GSH-Px, a porastom ukupne aktivnosti SOD [261,262]. Ovaj rezultat potencijalno ukazuje da je taj porast pretežno posledica povećane aktivnosti MnSOD, u skladu sa pojačanom potrebom jetre da neutralizuje ROS poreklom iz mitohondrijskih respiratornih kompleksa [263]. Zapažanje o izraženijem oksidativnom stresu u LPS sepsi saglasno je sa drugim studijama koje su upoređivale različite modele sepse i isticale da izbor modela treba da zavisi od cilja istraživanja [264,265]. Naime, Seemann i sar. su, poredeći endotoksemiju izazvanu LPS-om sa modelima polimikrobne sepse, pokazali da LPS izaziva snažniji i nagliji inflamatorni odgovor, dok CLP dovodi do sporije ali produžene inflamacije [264]. Pretpostavljamo da uočene razlike između FIP i LPS sepse na nivou oksidativnog stresa u jetri odražavaju upravo razliku u dinamici inflamatornog odgovora između ova dva modela.

Pretretman meldonijumom pokazao je izraženiji antiinflamatorni i antiapoptotski efekat u LPS modelu. Takođe, rezultati ukazuju da je u ovom modelu meldonijum obezbedio efikasniju antioksidativnu zaštitu jetre. Ovo se naročito ogleda u nivou LPO, koji je nakon pretretmana meldonijumom bio značajno niži u poređenju sa S grupom, dok je u FIP modelu ostao povišen. Dodatno, pretretman meldonijumom je većinu parametara aktiviranih LPS sepsom vratio na nivoe bliske kontrolnim, među kojima su CuZnSOD, MnSOD i GSH-Px.

Osnovni parametar bubrežne funkcije, stopa glomerularne filtracije (eng. *glomerular filtration rate*, GFR), u sepsi se brzo narušava, čak i kada su histološke promene minimalne ili još uvek nisu uočljive [266]. Serumske koncentracije uree kao krajnjeg produkta metabolizma azota, i kreatinina, proizvoda razgradnje kreatin-fosfata u mišićima, rutinski se koriste kao parametar procene GFR, budući da se povećavaju njenim padom [267,268]. U oba modela sepse, koncentracija uree u serumu je bila značajno povišena u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija kreatinina, s druge strane, bila je povišena samo u FIP modelu, u odnosu na kontrolne vrednosti. Literaturni podaci pokazuju da se u ranijim fazama sepse može uočiti povećanje serumske koncentracije uree, uz vrednosti kreatinina koje su u opsegu fizioloških vrednosti [269]. Stoga, iako su u oba modela uočene patohistološke promene karakteristične za S-AKI, među kojima i tubularna nekroza koja se javlja u uznapredovaloj sepsi [270], može se pretpostaviti da je bubrežna funkcija bila narušenija u FIP modelu.

Patohistološke promene bile su prisutne i u bubrezima meldonijumom tretiranih pacova, pri čemu je u FIP modelu naročito uočljivo da pretretman nije doveo do poboljšanja histoloških skorova. Naprotiv, tubularna nekroza i opstrukcija tubularnog lumena bile su izraženije nakon pretretmana meldonijumom nego bez njega, u oba modela sepse. Ovi rezultati su u skladu sa vrednostima koncentracija biohemijskih parametara uree i kreatinina, na koje meldonijum nije imao uticaja. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju da potencijal meldonijuma da normalizuje bubrežnu funkciju zavisi od prirode patološkog procesa koji je doveo do njenog narušavanja. Naime, u modelu hipoksijom indukovane povrede bubrega meldonijum nije normalizovao vrednosti uree i kreatinina [165], dok je u modelu ishemijsko-reperfuzione povrede bubrega snizio koncentraciju kreatinina ispod kontrolnih vrednosti [190].

Zbog svoje filtracione funkcije, bubrezi su tokom sepse veoma izloženi cirkulišućim PAMPs i DAMPs signalima [271]. LPS se filtrira na nivou Boumanove kapsule i dospeva u lumen tubula. Preuzimaju ga tubulociti posredstvom TLR4 receptora apikalne membrane [272], što dovodi do snažne produkcije ROS [273]. U CLP modelu polimikrobne sepse, već četiri sata nakon izazivanja sepse, uočava se porast koncentracije ROS, dominantno u bubrežnim tubulama sa smanjenim kapilarnim protokom usled sepse [274]. U oba modela sepse je u bubrezima uočen porast sadržaja merenih formi NFκB p65. Nivo HMGB1 je bio povišen samo u FIP sepsi, dok je u LPS sepsi ostao nepromenjen. Takođe, perturbacije u enzimskoj komponenti antioksidativnog sistema bile su izraženije u FIP modelu. Neizmenjene koncentracije LPO u oba modela u skladu

su sa prethodnim zapažanjima da povećanje ovog parametra u sepsi nije univerzalna pojava, već da obrazac promena zavisi od organa: u animalnim studijama zabeleženo je povećanje u jetri, slezini i zidu aorte, ali smanjenje u bubrezima [275]. Sličan obrazac uočen je u kliničkoj praksi, gde su nivoi LPO povećani kod pacijenata sa oštećenjem jetre i ARDS, a sniženi kod pacijenata sa narušenom bubrežnom funkcijom [275].

Obrazac promena inflamatornih markera ukazuje da je meldonijum ispoljio antiinflamatorno dejstvo u bubrezima u oba modela sepse, budući da je snižen sadržaj merenih formi NFκB p65, a u FIP modelu i nivo HMGB1, potentnog DAMP signala. Ovakva modulacija se smatra zaštitnom jer ograničava preteranu aktivaciju inflamatornog odgovora [36–38,276]. Naime, povećan nivo HMGB1 doprinosi oštećenju bubrega, dok njegova neutralizacija smanjuje inflamatornu infiltraciju, apoptozu tubulocita i poboljšava bubrežnu funkciju [277–279]. Ipak, antiapoptotski efekat meldonijuma bio je ograničen: u FIP modelu je zabeležen smanjen Bax/Bcl-2 odnos, ali je on i dalje ostao povišen u odnosu na kontrolnu grupu, dok u LPS modelu ovaj parametar nije bio izmenjen u poređenju sa septičnom grupom.

Narušena srčana funkcija u sepsi predstavlja reverzibilno stanje, budući da se sa poboljšanjem hemodinamskog statusa može normalizovati u roku od sedam do deset dana [280,281]. Zbog toga se prvobitno smatralo da srce u sepsi trpi dominantno funkcijske promene [282]. Cirkulišući citokini direktno smanjuju kontraktilnost kardiomiocita, pa sa redukcijom sistemske inflamacije nastupa i poboljšanje hemodinamskih parametara [283,284]. Ipak, srce u sepsi trpi i direktna strukturna oštećenja, koja kod preživelih pacijenata povećavaju rizik od kasnijeg razvoja kardiovaskularnih bolesti [282]. Nekroza kardiomiocita dovodi do oslobađanja njihovog sadržaja u intersticijski prostor i sistemsku cirkulaciju [282]. Tako cTnT komponenta kontraktilnog sistema kardiomiocita, predstavlja specifičan i senzitivan marker oštećenja miokarda kako u animalnim studijama [285] tako i u kliničkoj praksi [240,286,287].

U oba modela sepse, pretretman meldonijumom snizio je koncentraciju cTnT u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova S grupe, ali je njegova koncentracija i dalje bila značajno povišena u odnosu na kontrolu, što je u skladu sa izraženim histološkim oštećenjima zabeleženim u ovoj grupi. Kao i u bubrezima, može se pretpostaviti da se mehanizmi koji izazivaju oštećenja u srcu razlikuju između dva modela sepse: dok je u FIP sepsi zabeležen porast HMGB1 i p-NFκB p65, u LPS modelu je bio narušeniji antioksidativni kapacitet srca. Iako je meldonijum barem delimično sprečio ove perturbacije, histološki je uočeno da je zapravo pogoršao sepsom

izazvana oštećenja srčanog tkiva. Naime, u oba modela inflamatorna infiltracija bila je difuznija i izraženija u srcu pacova M+S grupe u poređenju sa S grupom. S obzirom na to da meldonijum sam po sebi, čak ni nakon dvanaest nedelja primene u dozi od 400 mg/kg t.m., ne izaziva promene u srčanoj funkciji pacova [148], uočeni štetan efekat može se smatrati specifičnim za stanje sepse.

S-ALI predstavlja posledicu maladaptivnog inflamatornog odgovora na infekciju, koji oštećuje alveolarni epitel i dovodi do nakupljanja egzudata, čime otežava razmenu gasova i narušava plućnu funkciju [288,289]. Pacovi kojima je sepsa indukovana fecesom su rano ispoljili simptome respiratornog distresa. Već u prvom satu po injeciranju suspenzije fecesa, uočeni su tahipneja i otežano disanje koje se manifestovalo intenzivnijim pokretima abdomena prilikom udaha i izdaha. Opisani simptomi nisu uočeni u LPS modelu sepse, stoga su pluća analizirana samo u FIP modelu. Ova odluka dodatno je potkrepljena zapažanjem Fodora i sar. da i.p. injeciranje LPS-a kod pacova ne dovodi do izražene povrede plućnog endotela i epitela, niti do formiranja hijalinih membrana karakterističnih za S-ALI [290]. Smatra se da je, zbog odsustva plućnih intravaskularnih rezidentnih makrofaga, za indukciju S-ALI kod pacova potrebna znatno viša doza LPS-a od uobičajenih doza koje se i.p. primenjuju u pacovskim modelima endotoksemije [290,291].

Respiratorni distres kod pacova u FIP modelu sepse može da se pripiše uočenim patohistološkim promenama koje kompromituju razmenu gasova [288,289]. Naime, hemoragija, nekroza i inflamatorni infiltrati doprinose zadebljanju alveolarnih septi i formiranju hijalinih membrana koje oblažu alveolarne bronhiole i epitel [292]. Uočen pad nivoa Hp kod FIP-septičnih pacova potencijalno se može pripisati vezivanju slobodnog Hb usled uočene hemoragije [52,293]. Hp koji učestvuje u ovom procesu ne potiče samo iz cirkulacije, već se sintetiše i lokalno u plućima [52]. Smanjenje raspoloživog Hp posledica je CD163-posredovanog preuzimanja Hp-Hb kompleksa od strane makrofaga, koji ga usmeravaju u lizozomalnu degradaciju [293].

S-ALI karakteriše i razvoj plućnog edema usled povećane mikrovaskularne propustljivosti [294]. Povećan sadržaj vode u plućnom tkivu pacova u FIP sepsi može se barem delimično pripisati trendu smanjenja koncentracije vimentina, iako ovaj pad nije bio statistički značajan. Naime, ovaj protein, osim što je marker patološkog remodelovanja tkiva koje vodi ka fibrozi pluća, takođe i indirektno učestvuje u održavanju integriteta vaskularnog endotela [294].

Dobro okarakterisan mehanizam u osnovi oštećenja plućnog tkiva u sepsi uključuje i oksidativni stres, za koji se smatra da je posledica aktivnosti kako rezidentnih plućnih makrofaga, tako i infiltriranih neutrofila [295]. Pad nivoa Nrf2 proteina u plućima u pacova kojima je fecesom indukovana sepsa u skladu je sa zapažanjima drugih autora u CLP modelu polimikrobne sepse i ukazuje na smanjenje kapaciteta antioksidativne zaštite [296]. U skladu sa tim, uočeni su trendovi pada aktivnosti MnSOD, GST i nivoa ukupnog GSH, uz blagi porast LPO i PCO, iako bez statističke značajnosti.

Sveukupno, FIP model sepse primenjen u ovoj doktorskoj disertaciji ispunjava kriterijum Američkog torakalnog društva iz 2011. godine, prema kojem za validaciju razvoja S-ALI mora biti prisutno makar tri od prepoznatih visokorelevantnih simptoma [289]. Ipak, odsustvo dramatičnih perturbacija molekularnih markera oksidativnog stresa, inflamacije i apoptoze treba sagledati u svetlu aktuelnijih preporuka o modelovanju S-ALI. Naime, Zhou i sar. su ukazali da tzv. „ekstrapulmonarni“ modeli, poput intravenoznog injeciranja LPS-a ili klasičnog CLP modela polimikrobne sepse, nisu dovoljno pouzdani u izazivanju S-ALI, u poređenju sa modelima sa direktnom plućnom povredom, poput intratrahealne instilacije LPS-a [297,298]. U ekstrapulmonarnim modelima koje su primenili nisu zabeležili promenu nivoa inflamatornih markera u bronhoalveolarnoj tečnosti, pri čemu u CLP modelu nisu ni histološki uočili značajno oštećenje pluća [297].

U modelima povrede pluća u kojima je do sada ispitivan efekat meldonijuma pokazana su njegova povoljna dejstva. Kod miševa, pretretman meldonijumom je sprečio zadebljanje alveolarnih septi, inflamatornu infiltraciju i hemoragiju nakon izlaganja hipobaričnoj hipoksiji [165,166]. Takođe, meldonijum ublažava simptome fibroze pluća izazvane trovanjem parakvatom [299]. U ovom FIP modelu sepse, pretretman meldonijumom je sprečio hemoragiju i nekrozu u plućima, a time verovatno i formiranje hijalinih membrana. U plućnom tkivu pacova M+S grupe sadržaj Hp bio je snižen u odnosu na kontrolnu grupu, verovatno usled prethodno opisanog mehanizma neutralizacije slobodnog Hb [293]. Ovi rezultati, zajedno sa registrovanim održavanjem plućnog sadržaja vode i vimentina na kontrolnim vrednostima, sugerišu da je pretretman meldonijumom pomogao očuvanju plućne epitelno-endotelne barijere. Nasuprot tome, pad ukupnog GSH i aktivnosti GST, promene koje nisu zabeležene u plućima FIP-septičnih pacova bez pretretmana meldonijumom, sugerišu da je antioksidativni kapacitet bio u većoj meri kompromitovan u plućima pacova M+S grupe.

***

Neočekivano povećanje mortaliteta pacova kojima je fecesom indukovana sepsa, a prethodno tretiranih meldonijumom predstavlja jedan od ključnih rezultata ove disertacije. Naime, ovo ukazuje da efekti meldonijuma nisu univerzalno protektivni, kao što je uočeno u studijama na drugim invazivnim modelima, već da zavise od patofiziološke kompleksnosti bolesti koja se modeluje, u ovom slučaju sepse. Za razliku od endotoksemije kao akutnog inflamatornog stimulusa, FIP model sepse je invazivniji, jer se u peritoneum unose žive bakterije, što bolje podražava kliničke slučajeve sepse [264,300]. Dok LPS izaziva brz, ali kratkotrajan porast citokina, u polimikrobnoj sepsi dolazi do njihovog postepenog, ali produženog porasta koji verodostojnije odražava tok sepse kod ljudi [301]. Iako je meldonijum u oba modela sepse u analiziranim organima ispoljio izvesne protektivne efekte, uočava se da su oni bili snažno uslovljeni modelom sepse. Tako su njegovi antiinflamatorni i antiapoptotski hepatoprotektivni efekti bili izraženiji u modelu endotoksemije, na šta ukazuje smanjenje aktivacije NFκB i odnosa Bax/Bcl-2, dok su perzistentno povišene vrednosti ovih parametara u FIP modelu sugerisale nedovoljnu supresiju ovih puteva u uslovima kompleksnijeg patogenskog opterećenja. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da FIP model, iako metodološki zahtevniji, bolje otkriva potencijalne rizike terapijskih pristupa koji u jednostavnijim modelima deluju isključivo protektivno.

Uočeni zaštitni efekti meldonijuma su bili u oštrom neskladu sa histološki uočenim oštećenjem bubrega u FIP modelu sepse, kao i patohistološkim promenama srca u oba modela. Kako sepsu karakterišu dinamične perturbacije energetskog metabolizma [302], dalji cilj istraživanja je bio sagledati uticaj meldonijuma kao modulatora mobilizacije masnih kiselina u sepsi [303,304]. Radi sticanja uvida u metabolički status septičnih jedinki, u smislu prirode preferencijalnog supstrata, izmerene su koncentracije različitih energenata i metabolita u krvi i organima, kao i parametara aktivacije SAM sistema.

Tokom sepse, prisutne su fazno zavisne varijacije u potrošnji energije i preferenciji ka određenom energetskom supstratu [305]. U ranim fazama sepse, organizam ulazi u hipermetaboličko stanje koje podržava aktivaciju imunskog sistema i vremenski odgovara hiperinflamatornoj fazi sepse. Kako sepsa napreduje, nastupa tzv. hipometaboličko stanje, neophodno za razvoj imunološke „tolerancije“, tj. reprogramiranje imunskih ćelija ka antiinflamatornom fenotipu [306,307]. Hipometabolička/hipoinflamatorna faza smatra se

adaptivnom i ključnom za sprečavanje progresije sepse u MODS [307]. Preživljavanje jedinke u sepsi u velikoj meri zavisi od pravovremene preraspodele energetskih resursa. U ranim fazama sepse dolazi do inhibicije β-oksidacije i intenziviranja glikolize, koja, iako proizvodi manje ATP-a u poređenju sa oksidativnom fosforilacijom, obezbeđuje bržu dostupnost energije imunskim ćelijama. Suprotno tome, za ulazak imunskih ćelija u fazu „tolerancije“ neophodan je prelazak sa glikolize na oksidativne metaboličke puteve [307]. Nepravovremenom preraspodelom energetskih resursa, hiperinflamatorni odgovor može da preraste u citokinsku oluju, dok preuranjeni ili produženi hipoinflamatorni odgovor dovodi do imunološke paralize i razvoja sekundarnih infekcija [308].

Nasuprot klasičnom tumačenju da je intenziviranje glikolize posledica anaerobnih uslova u tkivima, u sepsi je prisutna tzv. citopatska hipoksija [120]. Ovo stanje u kojem, uprkos normoksiji tkiva, ćelije ne mogu adekvatno da koriste kiseonik usled mitohondrijske disfunkcije [120]. Stoga se glikoliza intenzivirana pod takvim uslovima opisuje kao “aerobna”. Piruvat koji nastaje kao njen krajni produkt, usled ograničenog unosa u mitohondrije, redukuje se u laktat. Na ograničeno oksidativno iskorišćavanje piruvata ukazuje porast nivoa laktata uočen u jetri, bubrezima i srcu, u oba modela sepse [101]. Laktat se iz tkiva oslobađa u cirkulaciju i predstavlja supstrat za glukoneogenezu, koja se primarno odvija u jetri, a u uslovima pojačane SAM stimulacije i u bubrezima [101]. Prepoznato je da navedeni procesi rezultuju hiperglikemijom i hiperlaktatemijom u ranoj hipermetaboličkoj fazi sepse [101]. Rezultati ove disertacije ukazali su na različite obrasce promena glikemije u dva modela sepse: povećanje u LPS modelu, a smanjenje u FIP modelu, u odnosu na odgovarajuće kontrole. U modelima polimikrobne sepse hipoglikemija se javlja kasnije, nakon inicijalnog hiperglikemijskog odgovora [309]. Iako nije praćena vremenska dinamika glikemije, koja je prema Seemanu i sar. znatno složenija, dobijeni rezultati su u skladu sa razlikama između modela polimikrobne sepse i endotoksemije koje oni opisuju [264]. Naime, Seeman i sar. su pokazali da kod miševa sa CLP sepsom hipoglikemija nastupa kasnije i produženo se održava, a u istoj fazi u LPS sepsi glikemija raste [264]. Teža klinička slika u FIP modelu sepse, okarakterisana nižom stopom preživljavanja i izraženijim poremećajem refleksne funkcije, odrazila se i u glikemijskom odgovoru. Ovo ukazuje na različit stepen narušenosti mehanizama regulacije glikemije u dva modela sepse. Naime, hipoglikemija u sepsi je posledica povećanog, insulin nezavisnog preuzimanja glukoze u jetri, plućima, slezini i dijafragmi, kao i smanjene glukoneogeneze u jetri i bubrežnoj kori [310–312]. U jetri je

ekspresija ključnih enzima glukoneogeneze inhibirana aktivacijom proinflamatornog TLR4–MyD88–NFκB puta [313]. Pored toga, u sepsi je smanjena aktivnost, kao i ekspresija glukozo-6-fosfataze, enzima koji katalizuje završni korak glukoneogeneze i glikogenolize [313]. Zapaženo je da se u blažim oblicima sepse transkript i aktivnost ovog enzima delimično obnavljaju, dok su u težim oblicima sepse trajno suprimirani [313]. Ove razlike mogu objasniti nagli pad glikemije u FIP modelu sepse, koja predstavlja polimikrobni i samim tim invazivniji model sepse. Sa druge strane, u blažim oblicima sepse uočava se postepena normalizacija glikemije [313]. I u kliničkoj praksi, sposobnost regulacije glikemije odražava funkcionalni kapacitet glukoneogenih organa i koreliše sa verovatnoćom preživljavanja [101]. Izostanak hiperglikemije uprkos egzogeno primenjenim kateholaminima ili nagla redukcija doze insulina potrebne za postizanje normoglikemije često prognoziraju progresiju ka MODS-u [101].

Tokom sepse, u okviru kataboličkog odgovora sličnog onom koji se javlja tokom gladovanja [314], dolazi do pojačane lipolize. Taj odgovor bio je izraženiji u FIP sepsi nego u LPS-u, što potkrepljuju prethodno diskutovani pad glikemije i povišena serumska koncentracija SMK. Ujedno, nivo L-karnitina, neophodnog za mitohondrijski unos dugolančanih SMK [315] porastao je u jetri, bubrezima i srcu u oba modela. Iako porast nivoa L-karnitina ukazuje na „pripremanje" tkiva za priliv SMK tj. spremnost ćelija da podrže β-oksidaciju, lipidni status organa je ukazao su na inhibirano iskorišćavanje SMK. Porast tkivnog sadržaja ukupnih SMK, kao i dugolančanih SFAs i MUFAs koje dominiraju u depoima belog masnog tkiva pacova (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2) [316] ukazuje da je pojačana lipoliza povećala priliv SMK u tkiva. Međutim, usled ograničenog kapaciteta oksidacije SMK, dolazi do njihove ponovne reesterifikacije i razvoja steatoze, na šta ukazuje porast tkivnog sadržaja glicerola i TG [117].

Iako su steatogene promene u jetri, bubrezima i srcu bile prisutne u oba modela, uočene su i jasne model-specifične promene. U jetri pacova sa FIP sepsom, ali ne i sa LPS sepsom, zabeležen je porast palmitinske (C16:0) i palmitoleinske (C16:1) kiseline. Kiselina C16:0 je procentualno najzastupljenija SFA u depoima TG pacova [316]. Njen porast ukazuje na povećani priliv SMK usled lipolize ili na pojačanu *de novo* sintezu. Sa druge strane, C16:1 nastaje desaturacijom C16:0 dejstvom stearoil-CoA desaturaze 1 (eng. *stearoyl-CoA desaturase 1*, SCD1). Porast aktivnosti SCD1, a sledstveno i koncentracije C16:1, pokazatelji su *de novo* lipogeneze i razvoja steatoze [317]. Porast tkivnog sadržaja SMK, koji ukazuje na njihov povećan priliv usled lipolize i tkivne akumulacije, zabeležen je i u srcu pacova kojima je

fecesom indukovana sepsa, dok je u LPS modelu sepse uočen njihov pad. Istovremeno, u FIP modelu sepse je, za razliku od LPS sepse, došlo do smanjenja nivoa potencijalno korisnih lipidnih vrsta u bubrezima i srcu. Među njima su OCFAs, kao što su pentadekanska (C15:0) i heptadekanska (C17:0), te polinezasićena dokozaheksaenoinska kiselina (C22:6). Naime, iako mehanizam nije poznat, pad sadržaja C15:0 i C17:0 u jetri gojaznih miševa je povezan sa razvojem steatoze [318], dok viši nivoi cirkulišućih OCFAs korelišu sa manjom incidencom dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih oboljenja [319,320]. C22:6 nema ulogu energetskog supstrata, već čini značajan udeo fosfolipidne frakcije [321]. Dejstvom PLA2 se oslobađa iz membrane i služi kao prekursor za sintezu eikozanoida i drugih lipidnih medijatora uključenih u regulaciju inflamatornih procesa [322]. Takođe, budući da sadrži šest dvostrukih veza, izuzetno je osetljiva na peroksidaciju, pa pad njenog nivoa može ukazivati na veću izloženost ćelije oksidativnom stresu [323].

Razlike u lipidnim profilima u dva modela sepse potencijalno odražavaju različit stepen narušenosti metaboličkih puteva. Takvo tumačenje podržavaju i poređenja transkriptoma između modela polimikrobne sepse i endotoksemije, kao i između modela polimikrobne sepse različite kliničke težine [324,325]. Pokazano je da je u jetri miševa i svinja sa polimikrobnom sepsom, u poređenju sa LPS sepsom, izraženija supresija PPAR-α i jedarnog faktora hepatocita 4α (eng. *hepatocyte nuclear factor 4α,* HNF4α) [324]. Ovi transkripcioni faktori predstavljaju glavne regulatore katabolizma lipida i β-oksidacije. Yuan i sar. su pokazali da se u bubrezima, sa porastom težine CLP sepse, progresivno smanjuje ekspresija mitohondrijskih gena, kao i gena uključenih u oksidativnu fosforilaciju te sintezu i razgradnju različitih metabolita [325]. Slične "-omics" studije na srcu nisu ukazale na razlike u metabolizmu miokarda u različitim modelima sepse [326]. Ipak, razlike u lipidnom profilu srca između FIP i LPS sepse možda potiču od specifičnosti metaboličke kompenzacije miokarda i različite dinamike progresije bolesti u dva modela. Specifičnost metabolizma u srcu tokom sepse ogleda se u neefikasnom korišćenju kako SMK tako i glukoze [327]. Zanimljivo je pak da su Standage i sar. prijavili prolazan porast oksidacije SMK u miokardu miševa sa CLP polimikrobnom sepom [328]. Pad koncentracije ukupnih SMK, glicerola, C16:0, C18:0 i C18:2 uočen u srcu pacova u LPS modelu sepse može implicirati da je metabolički odgovor koji su pokazali Standage i sar. prisutan i u modelu endotoksemije. U srcu pacova FIP modela sepse zabeležen je porast navedenih parametara, što implicira da je devet sati po indukciji sepse β-oksidacija bila u većoj meri kompromitovana u FIP

modelu.

Uočene promene koncentracija energenata i metabolita u cirkulaciji i organima ukazuju da se u posmatranom vremenskom intervalu dinamika progresije sepse razlikovala između dva modela. Čini se da je u FIP modelu sepse prisutan brži prelazak ka metaboličkoj dekompenzaciji – padu kapaciteta organizma da adekvatno obezbedi energiju tkivima. Ovakav nalaz je u skladu sa podatkom da je supresija metabolizma lipida izraženija u polimikrobnim modelima sepse nego u sepsi indukovanoj LPS-om [324]. Analiza odgovora SAM sistema u dva modela sepse dodatno je istakla razlike u dinamici progresije bolesti. U ranim fazama sepse, organizam pokušava da kompenzuje narušene hemodinamske parametre snažnom aktivacijom simpatičkog nervnog sistema [329,330]. Pojačano oslobađanje kateholamina pokreće i katabolički odgovor nalik onom kod gladovanja [101]. Iako je ovaj odgovor inicijalno kompenzatorni, kako sepsa napreduje, postaje maladaptivan i remeti srčanu funkciju i energetsku homeostazu [331–333]. Dugotrajna aktivacija SAM sistema u kasnijim fazama sepse rezultuje tzv. „kateholaminskim refraktornim šokom“, stanjem smanjene sekrecije kateholamina i smanjene osetljivosti njihovih receptora [334]. U LPS modelu sepse, iscrpljene nadbubrežne rezerve uz povišenu koncentraciju kateholamina u serumu ukazali su na prisutnu simpatičku hiperaktivaciju tipičnu za akutni odgovor u sepsi. Nasuprot tome, u FIP sepsi, sniženi nivoi adrenalina i noradrenalina u nadbubregu i serumu sugerišu da je nastupilo stanje nalik kateholaminskom refraktornom šoku. Ovakav obrazac promena dodatno potkrepljuje pretpostavku o bržoj metaboličkoj dekompenzaciji u FIP modelu sepse.

Za potpunije razumevanje načina na koji meldonijum modifikuje obrasce metaboličkog odgovora u sepsi potrebno je sagledati „početno“ stanje organizma nakon četvoronedeljnog unosa meldonijuma u dozi 300 mg/kg t.m./dan.

U skladu sa Randleovim ciklusom, odnosno recipročnom inhibicijom oksidacije glukoze i oksidacije SMK, meldonijum pomera metabolizam ćelije ka iskorišćavanju glukoze [152,157]. Kada preovlađuje oksidacija SMK, dolazi do porasta acetil-CoA i odnosa NADH/NAD^+, što inhibira PDC, enzimski kompleks koji omogućava ulazak piruvata u Krebsov ciklus. Istovremeno, citrat nastao u prvom koraku Krebsovog ciklusa inhibira fosfofruktokinazu, enzim koji određuje stopu glikolize [155]. Kada je β-oksidacija smanjena, ova inhibicija nestaje i intenzivira se oksidativno iskorišćavanje glukoze [155]. Pored toga, u jetri glukoza može da se prevede u malonil-CoA koji inhibicijom CPT1 suprimira oksidaciju dugolančanih SMK [158].

Opisana kompeticija za mitohondrijsku oksidaciju omogućava metaboličku adaptaciju organizma u zavisnosi od prirode dostupnog energetskog supstrata [155,156]. Meldonijum, snižavajući unutarćelijsku koncentraciju L-karnitina, ograničava karnitin-zavistan transport dugolančanih SMK u mitohondrije i time inhibira njihovu β-oksidaciju [152,157]. Direktna *in vivo* merenja na srcu su pokazala da meldonijum povećava protok C-atoma kroz PDC, tj. pojačava oksidativno iskorišćavanje glukoze [157]. Četvoronedeljnim tretmanom meldonijumom u dozi 100–400 mg/kg t.m. dostiže se plato u sniženju koncentracije L-karnitina u tkivima pacova [148]. Usled dugog eliminacionog perioda meldonijuma, naročito iz skeletnih i srčanog mišića, koncentracije L-karnitina u tkivima i cirkulaciji ostaju značajno snižene i do sedam dana po prestanku primene meldonijuma [335]. Shodno tome, tokom devetočasovnog intervala nakon indukcije sepse očekuje se održavanje inhibicije karnitin-zavisne β-oksidacije u mitohondrijama.

Meldonijumom-indukovano smanjenje L-karnitina u jetri, bubrezima i srcu pacova u FIP modelu sepse bilo je praćeno smanjenjem koncentracija glukoze i laktata u tkivima. Ovakav obrazac ukazuje da je meldonijum, u skladu sa dobro poznatim mehanizmima svog dejstva, favorizovao korišćenje glukoze uz usmeravanje piruvata ka Krebsovom ciklusu, umesto njegove redukcije u laktat [143,148,152,187,336]. Istovremeno, pretretman meldonijumom je sprečio akumulaciju lipida u tkivima pacova u FIP modelu sepse. Pokazano je da i drugi farmakološki pristupi usmereni na reaktivaciju oksidativnog iskorišćavanja piruvata (npr. dihloracetat), takođe smanjuju sepsom izazvane steatogene promene u jetri [337,338]. Iako je ova metabolička intervencija povećala preživljavanje miševa u CLP modelu polimikrobne sepse [337,338], rezultati ove disertacije u FIP modelu sepse su pokazali suprotan ishod. Za tumačenje pogoršanih histoloških promena i veće smrtnosti u FIP sepsi važno je istaći da je meldonijum snizio koncentracije pojedinih protektivnih lipidnih vrsta ispod kontrolnih nivoa. Ovakav obrazac promena koncentracije MUFAs palmitoleinske (C16:1) i oleinske (C18:1) uočen je u sva tri ispitivana organa, dok je pad koncentracije OCFAs (C15:0 i C17:0) zabeležen u bubrezima i srcu. MUFAs, pored toga što služe kao energetski supstrati, važne su i zbog svojih regulatornih funkcija jer predstavljaju rezervoar acilnih lanaca za reacilaciju lizofosfolipida u Landsovom ciklusu, procesu koji moduliše fizikohemijska svojstva ćelijske membrane u odgovoru na različite stresore [339]. Takođe, kao endogeni ligandi aktiviraju PPAR-zavisnu transkripciju [340,341]. Najzad, prisustvo MUFAs podstiče esterifikaciju SFAs u TG čime se smanjuje rizik od nastanka lipotoksičnih intermedijera [342–345]. Sa druge strane, sniženje tkivnog sadržaja

OCFAs je zapaženo u određenim patološkim stanjima, premda fiziološki značaj ostaje nedovoljno razjašnjen [318].

Ovakvi efekti pretretmana meldonijumom su u velikoj meri izostali u LPS modelu sepse. Koncentracija L-karnitina u jetri, bubrezima i srcu pacova M+S grupe bila je čak povišena u odnosu na septičnu i kontrolnu grupu. Takođe, pretretman meldonijumom doveo je do dodatnog povećanja većine merenih lipidnih parametara u jetri i bubrezima, u poređenju sa septičnom grupom. Smatra se da su metaboličke perturbacije u sepsi izazvane masovnim oslobađanjem hormona srži nadbubrežnih žlezda, pri čemu je adrenalin potentniji zbog visokog afiniteta za β2-kateholaminske receptore [101]. Stoga je, u cilju razumevanja različitih odgovora između modela značajno razmotriti način na koji je izmenjen obrazac aktivacije SAM sistema kod pacova M+S grupe. U FIP modelu sepse, pretretman meldonijumom je, za sada neutvrđenim mehanizmom, dodatno pogoršao stanje nalik kateholaminskom refraktornom šoku. Naime, uočeno je dodatno iscrpljivanje nadbubrežnog sadržaja adrenalina i noradrenalina u odnosu na septičnu grupu, bez porasta njihovih serumskih koncentracija u serumu. Štaviše, koncentracija noradrenalina bila je dodatno snižena u serumu pacova M+S grupe. I u LPS modelu sepse pretretman meldonijumom je snizio koncentraciju noradrenalina u serumu, ali je aktivacija SAM ose i dalje bila izražena. Može se pretpostaviti da je, makar u jetri i bubrezima, efekat meldonijuma u LPS sepsi bio „nadjačan“ i dalje aktivnom SAM osovinom, što može objasniti steatogene promene u ovim tkivima. Naime, pojačani simpatoadrenalni odgovor aktivira lipolizu, koja, usled sepsom narušenog kapaciteta β-oksidacije, rezultuje akumulacijom lipida u tkivima [101]. Pretpostavku o narušenoj oksidaciji SMK potkrepljuje smanjen proteinski sadržaj PGC1-α/β, uočen u jetri LPS-septičnih pacova prethodno tretiranih meldonijumom [346].

Zajedničko za oba modela sepse jeste da je u srcu pretretman meldonijumom pogoršao histološko oštećenje uzrokovana sepsom i doveo do sniženja koncentracija većine ispitivanih lipidnih vrsta ispod vrednosti kontrolne grupe. Ovakvom izraženom efektu meldonijuma u srcu je verovatno doprinela i činjenica da se meldonijum naročito sporo eliminiše iz srčanog mišića [335]. Važno je pomenuti i da je više autora izrazilo bojazan da meldonijumov efekat na karnitinski status [148,152] može da učini osobu “ranjivijom” u stanju pojačanog stresa [303,304]. Ova pretpostavka zasniva se na nalazima iz animalnog modela koji pokazuju da i blagi deficit karnitina u uslovima snažne SAM stimulacije rezultuje većom smrtnošću, oštećenjem miokarda i njegovom smanjenom kontraktilnošću [347]. Smanjenje koncentracije

TG, ukupnih SMK, kao i pojedinih SFAs, MUFAs i PUFAs, uz paralelno sniženje sadržaja glukoze, ukazuje da je pretretman meldonijumom u srcu smanjio kapacitet katabolizma lipida i preusmerio metabolički tok ka glikolizi. U kontekstu ovakvih efekata meldonijuma, zabrinjavaju nalazi autora koji su pokazali da deficit oksidacije SMK [328], kao i pojačan glikolitički metabolizam zapravo doprinose srčanoj disfunkciji u sepsi [348]. Nasuprot tome, i u CLP modelu polimikrobne sepse i u modelu LPS endotoksemije, je pokazano da intenziviranje oksidacije SMK aktivacijom PPAR-α unapređuje srčanu funkciju [349,350]. Srčana funkcija, kao i preživljavanje miševa sa CLP polimikrobnom sepsom poboljšani su i inhibicijom glikolize [348]. Iako pretretman meldonijumom inhibira samo karnitin-zavisnu komponentu β-oksidacije, može se pretpostaviti da je po izazivanju sepse i taj aspekt smanjenja metaboličke fleksibilnosti bio kritičan za srce kao organ sa izuzetno visokim energetskim potrebama.

Najzad, iako pluća nisu bila obuhvaćena lipidomskom analizom, rezultati ostalih analiza na plućima, kao i radovi drugih istraživačkih grupa, naveli su na razmatranje korisnosti metaboličke modulacije koju izaziva meldonijum u plućima u sepsi. Tako na primer, Wang i sar. pripisuju protektivno dejstvo pretretmana meldonijumom u modelu hipoksijom indukovane povrede pluća, stimulaciji iskorišćavanja piruvata nakon glikolize, tj. njegovom usmeravanju u oksidativne puteve [166]. Njihovi rezultati predstavljaju još jedan dokaz da meldonijum deluje protektivno tako što favorizuje ugljene hidrate kao preferencijalni supstrat. Ipak, nasuprot rezultatima Wang i sar., pojedine grupe autora ističu da je u modelima LPS-indukovane povrede pluća zapravo protektivna inhibicija, a ne stimulacija glikolize [351–353]. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je pretretman meldonijumom delimično očuvao integritet pluća, dok su njegovi efekti na pojedine merene parametre bili nepovoljni. Imajući to u vidu, pretpostavka je da je metabolička modulacija, koja se pokazala korisnom u drugim modelima povrede pluća, u kontekstu sepse bila maladaptivna. Ipak, potvrda ove pretpostavke zahteva opsežnu analizu metaboličkih markera.

***

Uvid u metabolički status septičnih pacova ukazao je da je nesklad između povoljnih antioksidativnih, antiinflamatornih i antiapoptotskih efekata meldonijuma na nivou pojedinačnih tkiva posledica sepse kao energetski izazovnog stanja. Tok sepse zavisi od brze mobilizacije supstrata i očuvane metaboličke fleksibilnosti, pri čemu je u FIP modelu uočen brži ulazak u metaboličku dekompenzaciju nego u endotoksemiji. Tome je odgovarao i obrazac aktivacije

SAM sistema: stanje nalik kateholaminskom refraktornom šoku u FIP modelu sepse i SAM hiperaktivacija u LPS modelu sepse. Možemo pretpostaviti da je u metabolički „izazovnijem" FIP modelu sepse, smanjenje metaboličke fleksibilnosti pretretmanom meldonijumom bilo pogubno, dok je u LPS sepsi taj efekat bio ublažen očuvanom aktivacijom SAM sistema. Ovi rezultati dodatno podvlače značaj izbora modela kao i da se o efektima meldonijuma ne može zaključivati isključivo na osnovu izolovanih, organ-specifičnih poboljšanja.

***

Još u ranim fazama sepse dolazi do narušavanja neurološke funkcije, pa procena očuvanosti refleksa spada u klasičan set parametara za praćenje toka sepse, kako u kliničkim uslovima tako i u animalnim modelima [354,355]. Dok u LPS modelu nisu uočene promene, u FIP modelu je rano nastupio pad refleksne funkcije. Iako je ovaj pad uočen u obe septične grupe FIP modela, od četvrtog sata je bio umereniji kod septičnih pacova prethodno tretiranih meldonijumom. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima iz još jednog invazivnog modela. Naime, Zvejniece i sar. su pokazali da meldonijum, primenjen i.p. u jednoj dozi, poboljšava refleks uspravljanja (eng. *righting reflex*) u pacovskom modelu etanolom-indukovane neurotoksičnosti [180]. Ipak, važno je istaći i to da je u obe septične grupe FIP modela, od šestog sata po injeciranju suspenzije fecesa, zabeleženo blago poboljšanje refleksne funkcije. Ovaj nalaz verovatno odgovara tome što su jedinke koje su rano ispoljile pad refleksne funkcije uginule, odnosno da je u kasnijim satima zabeležen zapravo odgovor pacova koji su bolje podnosili septične uslove. U skladu sa ranijim studijama u kojima su autori primetili da je moguće stratifikovati jedinke na osnovu težine kliničke slike sepse koje razvijaju [356,357], može se pretpostaviti da ovo naizgled poboljšanje refleksne funkcije odražava preživljavanje otpornijih jedinki. U modelu polimikrobne sepse, Zhang i sar. su podelili miševe na one sa težim oblikom sepse (uginule u prvih 48 sati) i one sa blažim oblikom (preživele do sedmog dana) [356]. Takođe, uočeno je da individualne razlike u ponašanju mogu predvideti ishod sepse kod pacova: izraženija lokomotorna aktivnost ubrzo nakon indukcije sepse povezana je sa boljim oporavkom i nižom stopom mortaliteta, dok slabije aktivne jedinke imaju značajno manju verovatnoću preživljavanja [357].

Encefalitis povezan sa sepsom (eng. *sepsis-associated encephatilis,* SAE) predstavlja jednu od najčešćih neuroloških komplikacija ovog stanja [358]. Ipak, nisu svi moždani regioni podjednako osetljivi na sepsu. Tako npr. Kafa i sar. su u CLP modelu sepse uočili apoptozu u

samo pet ispitivanih moždanih regiona i to u: medijalnom preoptičkom jedru hipotalamusa (MPO), subventrikularnoj zoni lateralnih moždanih komora (SVZ), hipokampusnim CA1 i CA3 regionima i dentatnom girusu (DG) [21]. Takođe, u postmortem analizama moždanog tkiva pacijenata preminulih od sepse, lezije su bile naročito izražene u regionu moždanog mosta [359]. Uočene razlike se potencijalno mogu pripisati inherentnim karakteristikama ovih moždanih regija. Specifičnosti koje pomenute moždane regione u sepsi čine potencijalno podložnijim oštećenjima su: za MPO i moždani most – blizina *area postreme*; za SVZ – prisustvo progenitorskih ćelija kao i kontakt sa cerebrospinalnom tečnošću; za CA1 i CA3 – velika gustina sinapsi; za DG – prisustvo neuroprogenitorskih ćelija.

Za potrebe ove doktorske disertacije analizirani su mali mozak, produžena moždina i prefrontalni korteks. Ovi moždani regioni su odabrani zbog svojih ključnih uloga u kontroli motoričkih, autonomnih odnosno viših kognitivnih funkcija.

Mali mozak ima centralnu ulogu u motorici i koordinaciji pokreta, pa njegovo oštećenje dovodi do poremećaja u održavanju stava tela, ravnoteže i izvođenju finih pokreta. Pokazano je da sepsa u malom mozgu aktivira mikrogliju, čime pojačava ekscitabilnost i sinaptičku transmisiju Purkinje ćelija, inhibira njihovu sinaptičku plastičnost i narušava motorno učenje kod miševa [360].

Jedra produžene moždine regulišu vitalne autonomne funkcije, uključujući srčanu frekvencu, krvni pritisak i ritam disanja [361–363]. Posebno je značajna medularna visceralna zona (MVZ), koja putem eferentnih vagalnih vlakana i holinergičke antiinflamatorne putanje (eng. *cholinergic anti-inflammatory pathway*, CAP) moduliše sistemsku inflamaciju. U LPS i CLP modelima sepse je pokazano da smanjenje neuroinflamacije u MVZ suprimira produkciju proinflamatornih citokina u perifernim tkivima [364]. Takođe, MVZ se nalazi u neposrednoj blizini area postreme, cirkumventrikularnog regiona sa nepotpunom KMB, što je u sepsi čini osetljivijom na cirkulišuće patogene i endotoksine [365].

Najzad, prefrontalni korteks, odgovoran za više kognitivne funkcije, takođe je značajno narušen tokom sepse. Oštećenja u ovom regionu manifestuju se delirijumom, a mogu rezultovati i trajnim kognitivnim deficitom [365]. Neurološki deficiti nakon neonatalne sepse delom su posledica ekstenzivne hipomijelinizacije u prefrontalnom korteksu [366]. Kod pacova koji su preživeli sepsu uočen je značajan gubitak neurona u ovom regionu, koji koreliše sa smanjenom sposobnošću učenja, pamćenja i eksploratornog ponašanja [367].

Patofiziološki mehanizmi u osnovi encefalitisa povezanog sa sepsom obuhvataju: narušavanje integriteta i funkcije KMB [368], hipoperfuziju [369], neuroinflamaciju, sistemsku inflamaciju [370,371], oksidativni stres i njim praćena mitohondrijska oštećenja [372], kao i nakupljanje oštećenih proteina [373,374]. Svi navedeni mehanizmi zajednički doprinose oštećenju makromolekula u sastavu membrana i citosola nervnih i glijskih ćelija.

Oštećenje KMB dovodi do razvoja perivaskularnog edema mozga [375]. Prisustvo edema onemogućava efikasnu perfuziju mozga usled kompresije moždanih krvnih sudova što rezultuje smanjenim dotokom kiseonika i hranljivih materija. Ovo se manifestuje naglim pogoršanjem sveopšteg stanja pacijenta, narušavanjem ili potpunim gubitkom refleksne funkcije, a u najtežim slučajevima rezultuje komom ili smrću [354,376]. U skladu sa tim, jedna od patofizioloških promena koja je mogla doprineti visokoj stopi smrtnosti pacova M+S grupe u FIP modelu jeste razvoj edema mozga. Naime, dok u oba modela sepse nisu uočene promene u odnosu suve i vlažne mase mozga, tretman meldonijumom je doveo do značajnog nakupljanja vode u mozgu u FIP modelu sepse.

Održavanje depoa L-karnitina od izuzetnog je značaja za pravilnu funkciju astrocita, koji predstavljaju važnu strukturnu i funkcijsku komponentu KMB [377–379]. Stoga se može pretpostaviti da efekat meldonijuma, koji snižava unutarćelijski nivo L-karnitina [152], narušava funkciju astrocita i tako kompromituje integritet KMB. Ipak, kad je reč o uticaju meldonijuma na KMB, postojeće studije samo posredno impliciraju njegova protektivna dejstva. Tako, Gureev i sar. pretpostavljaju da meldonijum pomaže funkciji KMB nakon TPM povećavajući ekspresiju *Vegfa* gena, čime doprinosi produkciji NO, važnog za proces angiogeneze nakon TPM [171]. Sa druge strane, Sjakste i sar. su uočili da, u odgovoru na sistemsku inflamaciju izazvanu LPS-om, meldonijum snižava koncentraciju NO u moždanom tkivu [222]. Zanimljivo je da je kod pacijenata sa encefalitisom, lečenih meldonijumom, zabeležena snižena koncentracija neuron-specifične enolaze u serumu (eng. *neuron-specific enolase*, NSE) [380]. Kako je NSE jedan od opštih markera narušenog integriteta KMB, ova studija Leonidovna i sar. implicira potencijalno zaštitno dejstvo meldonijuma na njen integritet. Budući da rezultati ove i pomenute studije omogućavaju samo posredne zaključke, neophodna su detaljna ispitivanja njegovih efekata na KMB u različitim kontekstima.

Povišen ukupni oksidativni status (eng. *total oxidative status*, TOS) i snižen ukupni antioksidativni kapacitet (eng. *total antioxidant capacity*, TAC) snažno korelišu sa smrtnim

ishodom u sepsi, te su ovi parametri čak i potencijalni prediktori njenog toka i ishoda [381]. Takođe, nivo LPO značajno je povišen u krvi onih pacijenata koji nisu preživeli sepsu [382,383], a feroptoza indukovana LPO-om navodi se kao jedan od uzroka smrti neurona kod pacijenata sa encefalitisom povezanim sa sepsom [384]. U ovoj doktorskoj disertaciji, za procenu nivoa oksidativnog stresa i njime izazvanih oštećenja proteina i lipida u moždanim regionima određivani su nivoi PAB, AOPP i LPO. Kao dodatni parametar procene integriteta membranskih fosfolipida, meren je odnos PC/LPC. Visok sadržaj PC doprinosi stabilnosti membrana, dok LPC nastaje njegovom razgradnjom i predstavlja bioaktivni lipid sposoban da aktivira proinflamatorne puteve koji zatim dodatno narušavaju integritet membrana [83]. U skladu sa tim, snižen nivo PC u odnosu na LPC se smatra pokazateljem degradacije membrana. Pored merenja nivoa već pomenutih markera inflamacije, HMGB1 i Hp, određivana je i aktivnost ekto-5'-nukleotidaze (CD73). CD73 je limitirajući enzim u hidrolizi ekstracelularnog ATP-a (eATP), jednog od glavnih DAMP signala oslobođenih iz oštećenih ćelija, čija se koncentracija povećava u krvnoj plazmi i mozgu miševa nakon injeciranja LPS-a. [385].

U malom mozgu pacova septične grupe, u oba modela, uočeno je povećanje nivoa PAB i LPO. Kako su AOPP, sadržaj proteina HMGB1 i enzimska aktivnost CD73 ostali nepromenjeni, može se zaključiti da je oksidativni stres bio lokalizovan i više usmeren na lipide. U LPS modelu sepse, ova pretpostavka je potkrepljena smanjenjem PC/LPC odnosa, koje ukazuje na to da su membranski lipidi pretrpeli značajna strukturna oštećenja, verovatno usled intenzivne LPO. Uočava se da je lipidni kompartment bio zaštićen kod septičnih pacova prethodno tretiranih meldonijumom u oba modela. Meldonijum je ovo protektivno svojstvo ispoljio drugačijim mehanizmom: u FIP modelu posredstvom smanjenja LPO, a u LPS modelu povećanjem PC/LPC odnosa.

Rezultati dobijeni na produženoj moždini ukazuju na drugačiji obrazac oštećenja proteina i lipida u odnosu na mali mozak. Naime, u ovom moždanom regionu pacova sa FIP sepsom, povišeni nivoi PAB i AOPP, zajedno sa sniženom proteinskom ekspresijom Hp i aktivnošću CD73, potencijalno ukazuju da je oksidativni stres u ovom modelu sepse bio više usmeren na proteine. Istovremeno, stabilni nivo LPO i očuvani PC/LPC odnos, ukazuje na to da su lipidi u produženoj moždini bolje očuvani. Prethodni tretman meldonijumom je ispoljio zaštitno dejstvo u ovoj moždanoj strukturi, s obzirom na to da su svi analizirani markeri oksidativnog stresa i inflamacije održani na nivou kontrolne grupe. Za razliku od FIP modela, u produženoj moždini

pacova sa LPS sepsom zabeleženo je povećanje PC/LPC odnosa. Kako je nivo LPO održan na vrednostima kontrolne grupe, pretpostavka je da je modulacija metabolizma lipida nastupila procesima nezavisnim od LPO. Deluje da je prethodni tretman meldonijumom ostvario uticaj na ove procese jer je PC/LPC odnos bio značajno snižen u poređenju sa vrednostima izmerenim u produženim moždinama septičnih pacova.

Nasuprot malom mozgu i produženoj moždini, u prefrontalnom korteksu su bila prisutna značajna oštećenja i proteina i lipida. Naime, u FIP modelu sepse bili su povećani markeri oksidativnog stresa, smanjen odnos PC/LPC, snižena ekspresija Hp i aktivnost CD73. Ova oštećenja bila su blaža u LPS modelu sepse, u kom su ostali nepromenjeni nivoi LPO, AOPP i Hp u odnosu na kontrolne vrednosti. U oba modela, pak, pretretman meldonijumom je u prefrontalnom korteksu septičnih pacova održao PC/LPC odnos na kontrolnim vrednostima, ukazujući da je i u ovoj moždanoj strukturi meldonijum zaštitio lipide.

U skladu sa ranijim istraživanjima, i ovi rezultati potvrđuju da sepsa indukuje izražen oksidativni stres u moždanom tkivu. El-Gawad i sar. su pokazali da se nivo LPO u mozgu pacova značajno povećava već dva sata nakon injeciranja LPS-a [386]. Porast nivoa LPO prepoznat je kao jedan od uzroka gubitka neurona kod pacijenata sa sepsom [384]. Takođe, u CLP modelu sepse, porast nivoa LPO u prefrontalnom korteksu pacova koreliše sa težinom kliničke slike [387]. Seeman i sar. su na homogenatima celog mozga uočili da se rano i postojano povećanje LPO javlja u mozgu miševa tretiranih LPS-om, ali ne i u modelima polimikrobne sepse [264]. Ono što prikazani rezultati ove teze posebno naglašavaju jeste važnost proučavanja pojedinačnih moždanih struktura, umesto homogenata celog mozga. U prilog tome, Comim i sar. su kod pacova koji su preživeli CLP sepsu uočili porast LPO samo u hipokampusu, dok je aktivnost mitohondrijskih kompleksa bila povećana jedino u prefrontalnom korteksu [388]. Ove razlike potencijalno odražavaju razlike u energetskim zahtevima između moždanih regiona, što se direktno oslanja na regionalne razlike u kapacitetu proizvodnje ATP-a. U skladu sa tim, Pandya i sar. su pokazali da je, među pet analiziranih moždanih regiona, hipokampus pacova imao najniži, a frontalni korteks najviši mitohondrijski kapacitet [389].

Meldonijum je pretežno ispoljio zaštitu od LPO što je podržano i kliničkim nalazima [390]. Slično nalazu da efikasno snižava LPO uoči hipobarične povrede mozga [172], rezultati ove teze pokazuju da meldonijum ispoljava antioksidativno dejstvo kada se primeni kao pretretman uoči sepse. Iako je neuroprotektivan uticaj meldonijuma uočen u sva tri ispitivana

moždana regiona, određeni parametri ukazuju da je njegov efekat u izvesnoj meri varirao između moždanih regiona. Uočene razlike u efikasnosti po moždanim regionima donekle su podržane rezultatima drugog invazivnog modela. U pacovskom modelu moždanog udara, meldonijum je ispoljio antioksidativno dejstvo i u hipokampusu i u korteksu, ali uz određene razlike između dve strukture [391]. Naime, i u hipokampusu i u korteksu meldonijum je snizio LPO i povećao nivo GSH, ali je u hipokampusu taj efekat postignut pri duplo nižoj dozi u odnosu na korteks [391]. Razlika je uočena i u uticaju na aktivnost SOD, koju je meldonijum povećao u korteksu, ali ne i u hipokampusu [391].

Uočeno je i da je meldonijum sprečio smanjenje sadržaja Hp u malom mozgu i produženoj moždini, ali ne i u prefrontalnom korteksu pacova u FIP modelu sepse. Niža efikasnost meldonijuma u prefrontalnom korteksu odrazila se i u vrednostima PAB, čiji porast u FIP sepsi nije bio sprečen, za razliku od ostalih moždanih regiona. Ova zapažanja mogu se pripisati većoj gustini mikroglije u kortikalnim regijama, ali nižoj u malom mozgu i moždanom stablu [21,365,371,392]. Može se pretpostaviti da ova razlika u gustini mikroglije direktno utiče i na intenzitet inflamatornog odgovora po moždanim regionima. U skladu sa tim, pokazano je da je ekspresija proinflamatornog citokina IL-1β viša u korteksu nego u malom mozgu i moždanom stablu septičnih miševa [392]. Takođe, pokazano je da su u sepsi neuroni *substantia nigra* podložniji oštećenjima od hipokampusnih i kortikalnih neurona [393].

Purinska signalizacija ima važnu ulogu u patofiziologiji oštećenja mozga u sepsi [394]. Uloga CD73 u ovom procesu do sada je proučavana uglavnom kroz farmakološku inaktivaciju i studije na *knock out* životinjama [395,396]. eATP, poznat kao „signal opasnosti“, povećava se kao odgovor na oštećenje ćelija i inflamaciju tokom sepse i septičnog šoka [394,397]. Preko purinergičkog P2X7 receptora, eATP aktivira mikrogliju i pokreće njenu migraciju ka mestima oštećenja, gde formira barijeru između zdravog i oštećenog tkiva [397,398]. Aktivacija P2X7 takođe je povezana sa povećanom proizvodnjom ROS, što pogoršava oštećenje tkiva, dok je uklanjanje P2X7 pokazalo smanjenje oksidativnog stresa u mozgu septičnih miševa [399]. Signaliziranje zavisno od ATP-a, posredovano P2X7, moduliše se putem ektoneukleotidaza na površini mikroglijskih ćelija, pri čemu CD73 katalizuje poslednji korak – hidrolizu AMP u adenozin [399,400]. Protektivna svojstva adenozina prepoznata su u prethodnim studijama [394,396,401].

Aktivnost CD73 u mozgu je prethodno ispitivana u LPS-indukovanoj neuroinflamaciji

[402,403], njena uloga u polimikrobnim modelima sepse do sada nije bila proučavana. Jedan o ključnih nalaza ove doktorske disertacije u domenu purinske signalizacije jeste da je aktivnost ovog enzima bila smanjena u prefrontalnom korteksu pacova u FIP modelu sepse, a povećana u LPS modelu. U skladu sa zaštitnom ulogom adenozina koji nastaje aktivnošću CD73, nekoliko studija je pokazalo da njena smanjena funkcija može doprineti težim ili dugotrajnim infekcijama [404,405]. U sepsi, gde dolazi do prekomerne inflamacije i oslobađanja citokina, povećana aktivnost ovog enzima može odražavati pokušaj organizma da suzbije prekomernu imunsku aktivaciju i ograniči oštećenje tkiva. Slično prethodno pokazanoj korelaciji između nivoa adenozina u plazmi i incidence septičnog šoka [404], može se pretpostaviti da promene u aktivnosti CD73 koje smo uočili korelišu sa težinom i progresijom neuroinflamacije u sepsi.

***

Rani pad refleksne funkcije u FIP, ali ne i u LPS modelu, potvrđuje brži razvoj i veću težinu neurološke disfunkcije u polimikrobnoj sepsi. Iako je meldonijum u prvim satima ublažio ovaj pad, njeno kasnije poboljšanje je verovatno odraz selektivnog preživljavanja otpornijih jedinki, a ne neuroprotektivnog efekta meldonijuma. U oba modela sepse je u mozgu uočena izražena regionalna heterogenost oštećenja, pri čemu je prefrontalni korteks bio najosetljiviji, sa udruženim poremećajima lipidnog i proteinskog kompartmenta, kao i purinske signalizacije. Meldonijum je konzistentno ispoljio zaštitu lipidnog kompartmenta po regionima, ali je njegova korist bila ograničena u regionima sa izraženijom mikroglijskom aktivacijom i inflamacijom. Istovremeno, trend porasta sadržaja vode u mozgu, naročito u FIP modelu, ukazuje da pretretman meldonijumom može kompromitovati integritet KMB u uslovima teške sepse. Zajedno, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da meldonijum ispoljava parcijalna i region-specifična neuroprotektivna dejstva, koja u invazivnijem modelu sepse nisu dovoljna da spreče razvoj neurološke disfunkcije.

6. ZAKLJUČCI

Ovom doktorskom disertacijom je po prvi put pokazano da efekti pretretmana meldonijumom u LPS-om, odnosno fecesom indukovanoj sepsi kod pacova zavise od patofiziološke kompleksnosti primenjenog modela. Antioksidativna, antiinflamatorna i antiapoptotska dejstva meldonijuma su u uslovima sepse bila izrazito organo- i model-specifična. Posebno iznenađuje da je, uprkos ranije zabeleženim korisnim efektima meldonijuma u istraživanjima drugih autora i ove laboratorije, pretretman meldonijumom bio povezan sa povećanom smrtnošću pacova u FIP sepsi. Ovo zapažanje se potencijalno objašnjava uočenom bržom progresijom ka metaboličkoj dekompenzaciji u polimikrobnom FIP modelu sepse, u odnosu na model endotoksemije izazvane LPS-om. Naime, metabolička modulacija indukovana meldonijumom, koja favorizuje iskorišćavanje glukoze uz smanjenje kapaciteta oksidacije SMK, dovodi do smanjenja metaboličke fleksibilnosti organizma. Pretpostavka je da je ovakav efekat meldonijuma bio naročito štetan u FIP modelu kao patofiziološki kompleksnijem modelu sepse. Sa druge strane, očuvana aktivnost SAM sistema u LPS modelu je ublažila metaboličke efekte meldonijuma i rezultovala povoljnijim tokom sepse. Stoga, rezultati dobijeni ovom disertacijom su posebno istakli značaj odabira eksperimentalnog modela prilikom ispitivanja mogućnosti prenamene metaboličkih modulatora kao što je meldonijum.

U cilju jasnijeg sagledavanja dobijenih nalaza, u nastavku su taksativno predstavljeni ključni zaključci ove doktorske disertacije. Četvoronedeljni oralni pretretman meldonijumom je:

1. u FIP modelu sepse povećao smrtnost pacova, bez promene telesne temperature i poboljšanja refleksne funkcije, dok je u LPS modelu snizio telesnu temperaturu bez uticaja na preživljavanje;
2. u oba modela snizio sepsom indukovano povećanje AST, ALT i cTnT, ali ne i ALP, uree i kreatinina u serumu;
3. u oba modela sepse značajno ublažio histološka oštećenja jetre, ali ne i bubrega, dok je u srcu doveo do njihovog pogoršanja. U FIP modelu sepse je povećao sadržaj vode u mozgu i delimično ublažio histološka oštećenja pluća;
4. ispoljio konzistentnije antioksidativne efekte u jetri i srcu u LPS modelu. Antioksidativni efekti meldonijuma su u mozgu bili heterogeni, dok su u bubrezima i plućima izostali;

5. ispoljio antiinflamatorne efekte, ali uz njihov izostanak u prefrontalnom korteksu u oba modela i povećanje proinflamatornih markera u srcu u LPS modelu sepse;
6. ispoljio antiapoptotske efekte, ali uz njihov izostanak u bubrezima u LPS modelu sepse;
7. u FIP modelu sepse dodatno iscrpeo adrenalne rezerve kateholamina, uz sniženje njihovih koncentracija u serumu i ispod kontrolnih vrednosti, dok u LPS modelu nije sprečio sepsom indukovanu aktivaciju SAM sistema;
8. u FIP modelu snizio sepsom indukovan porast L-karnitina i većine lipidnih vrsta u jetri i bubrezima, i to ispod kontrolnih vrednosti, kao i sadržaj glukoze u ovim organima i srcu, ali nije sprečio pojavu hipoglikemije. U LPS modelu sepse je dodatno povećao sadržaj lipida u tkivima uz sniženje cirkulišućih lipida i porast koncentracije L-karnitina; sprečio sepsom indukovanu hiperglikemiju i povećao sadržaj glukoze u srcu. U oba modela sepse, snizio je tkivni sadržaj laktata u odnosu na pacove septične grupe bez pretretmana meldonijumom;
9. u oba modela očuvao purinsku signalizaciju u moždanim regionima, pri čemu je u LPS modelu sepse u malom mozgu povećao aktivnost ekto-5'-nukleotidaze;
10. u oba modela sepse ispoljio neuroprotektivni efekat na nivou membrana, održavanjem PC/LPC odnosa u ispitivanim moždanim regionima.

LITERATURA

[1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016;315:801–10. https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287.

[2] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet 2020;395:200–11. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

[3] Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, Cassini A, Rudd KE, Schlattmann P, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. Intensive Care Med 2020;46:1552–62. https://doi.org/10.1007/s00134-020-06151-x.

[4] Hopkinson DA, Mvukiyehe JP, Jayaraman SP, Syed AA, Dworkin MS, Mucyo W, et al. Sepsis in two hospitals in Rwanda: A retrospective cohort study of presentation, management, outcomes, and predictors of mortality. PLoS One 2021;16:e0251321. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251321.

[5] La Via L, Sangiorgio G, Stefani S, Marino A, Nunnari G, Cocuzza S, et al. The Global Burden of Sepsis and Septic Shock. Epidemiologia 2024;5:456–78. https://doi.org/10.3390/epidemiologia5030032.

[6] Djikic M, Milenkovic M, Stojadinovic M, Miladinovic T, Gujanicic D, Milicevic-Nesic I, et al. The six scoring systems' prognostic value in predicting 24-hour mortality in septic patients. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2024;28:3849–59. https://doi.org/10.26355/eurrev_202406_36462.

[7] Gvozdenović L, Knežević V, Knežević A, Gvozdenović N, Gojković Z. National estimates of severe sepsis (our experience in Novi Sad, Serbia). Braz J Infect Dis 2013;17:381–2. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.031.

[8] Jovičić M, Milosavljević MN, Folić M, Pavlović R, Janković SM. Predictors of Mortality in Early Neonatal Sepsis: A Single-Center Experience. Medicina 2023;59:604. https://doi.org/10.3390/medicina59030604.

[9] Uzelac M, Milić M, Begović VB, Maris S, Begović LI, Uzelac ŠA. Epidemiological characteristics of sepsis in Belgrade for the period 2006-2015 year. Zdravstvena Zaštita 2017;46:53–9. https://doi.org/10.5937/ZZ1702053U.

[10] IZJZS - Batut :: n.d. https://www.batut.org.rs/index.php?content=77 (accessed December 7, 2025).

[11] Daniels R. Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective). Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2011;66:ii11–23. https://doi.org/10.1093/jac/dkq515.

[12] Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, et al. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. Crit Care 2008;12:R158. https://doi.org/10.1186/cc7157.

[13] Bilevicius E, Dragosavac D, Dragosavac S, Araújo S, Falcão AL, Terzi RG. Multiple organ failure in septic patients. Braz J Infect Dis 2001;5:103–10. https://doi.org/10.1590/s1413-86702001000300001.

[14] Ziesmann MT, Marshall JC. Multiple Organ Dysfunction: The Defining Syndrome of Sepsis. Surg Infect (Larchmt) 2018;19:184–90. https://doi.org/10.1089/sur.2017.298.

[15] Lelubre C, Vincent J-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. Nat Rev Nephrol 2018;14:417–27. https://doi.org/10.1038/s41581-018-0005-7.

[16] Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med 1996;22:707–10. https://doi.org/10.1007/BF01709751.

[17] Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent J-L. Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients. JAMA 2001;286:1754–8. https://doi.org/10.1001/jama.286.14.1754.

[18] Moreno R, Rhodes A, Piquilloud L, Hernandez G, Takala J, Gershengorn HB, et al. The Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score: has the time come for an update? Crit Care 2023;27:15. https://doi.org/10.1186/s13054-022-04290-9.
[19] Hall P, Cash J. What is the real function of the liver "function" tests? Ulster Med J 2012;81:30–6.
[20] Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. Crit Care 2014;18:503. https://doi.org/10.1186/s13054-014-0503-3.
[21] Kafa IM, Uysal M, Bakirci S, Ayberk Kurt M. Sepsis induces apoptotic cell death in different regions of the brain in a rat model of sepsis. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2010;70:246–60. https://doi.org/10.55782/ane-2010-1796.
[22] Haberham ZL, van den Brom WE, Venker-van Haagen AJ, Baumans V, de Groot HN, Hellebrekers LJ. EEG evaluation of reflex testing as assessment of depth of pentobarbital anaesthesia in the rat. Lab Anim 1999;33:47–57. https://doi.org/10.1258/002367799780578570.
[23] Sulzbacher MM, Sulzbacher LM, Passos FR, Bilibio BLE, de Oliveira K, Althaus WF, et al. Adapted Murine Sepsis Score: Improving the Research in Experimental Sepsis Mouse Model. BioMed Research International 2022;2022:5700853. https://doi.org/10.1155/2022/5700853.
[24] Srdić T, Đurašević S, Lakić I, Ružičić A, Vujović P, Jevđović T, et al. From Molecular Mechanisms to Clinical Therapy: Understanding Sepsis-Induced Multiple Organ Dysfunction. Int J Mol Sci 2024;25:7770. https://doi.org/10.3390/ijms25147770.
[25] Netea MG, van der Meer JWM, van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? Trends Immunol 2003;24:254–8. https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00079-6.
[26] Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol 2003;111:S460-475. https://doi.org/10.1067/mai.2003.108.
[27] Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand) 2001;47:695–702.
[28] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2016;8:227–41. https://doi.org/10.1002/wsbm.1331.
[29] Kannan G, Paul BM, Thangaraj P. Stimulation, regulation, and inflammaging interventions of natural compounds on nuclear factor kappa B (NF-kB) pathway: a comprehensive review. Inflammopharmacology 2025;33:145–62. https://doi.org/10.1007/s10787-024-01635-4.
[30] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 1999;18:6853–66. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203239.
[31] Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation. Cells 2016;5:12. https://doi.org/10.3390/cells5010012.
[32] Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. Mol Cell 1998;1:661–71. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80066-0.
[33] Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. Br J Anaesth 1996;77:110–7. https://doi.org/10.1093/bja/77.1.110.
[34] van der Poll T, Lowry SF. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? Shock 1995;3:1–12. https://doi.org/10.1097/00024382-199501000-00001.
[35] Reddy H, Javvaji CK, Malali S, Kumar S, Acharya S, Toshniwal S. Navigating the Cytokine Storm: A Comprehensive Review of Chemokines and Cytokines in Sepsis. Cureus 2024;16:e54275. https://doi.org/10.7759/cureus.54275.
[36] Zhong W, Qian K, Xiong J, Ma K, Wang A, Zou Y. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF-κB related signaling. Biomed Pharmacother 2016;83:302–13. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.036.

[37] Liu F-J, Gu T-J, Wei D-Y. Emodin alleviates sepsis-mediated lung injury via inhibition and reduction of NF-kB and HMGB1 pathways mediated by SIRT1. Kaohsiung J Med Sci 2022;38:253–60. https://doi.org/10.1002/kjm2.12476.

[38] Chen S, Tang C, Ding H, Wang Z, Liu X, Chai Y, et al. Maf1 Ameliorates Sepsis-Associated Encephalopathy by Suppressing the NF-kB/NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. Front Immunol 2020;11:594071. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594071.

[39] Deng C, Zhao L, Yang Z, Shang J-J, Wang C-Y, Shen M-Z, et al. Targeting HMGB1 for the treatment of sepsis and sepsis-induced organ injury. Acta Pharmacol Sin 2022;43:520–8. https://doi.org/10.1038/s41401-021-00676-7.

[40] Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. Mol Cell Biol 1999;19:5237–46. https://doi.org/10.1128/MCB.19.8.5237.

[41] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature 2002;418:191–5. https://doi.org/10.1038/nature00858.

[42] Falciola L, Spada F, Calogero S, Langst G, Voit R, Grummt I, et al. High mobility group 1 protein is not stably associated with the chromosomes of somatic cells. J Cell Biol 1997;137:19–26. https://doi.org/10.1083/jcb.137.1.19.

[43] Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. EMBO J 2003;22:5551–60. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg516.

[44] Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. EMBO Rep 2002;3:995–1001. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf198.

[45] Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 1999;285:248–51. https://doi.org/10.1126/science.285.5425.248.

[46] Xu J, Jiang Y, Wang J, Shi X, Liu Q, Liu Z, et al. Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. Cell Death Differ 2014;21:1229–39. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.40.

[47] Janko C, Filipović M, Munoz LE, Schorn C, Schett G, Ivanović-Burmazović I, et al. Redox modulation of HMGB1-related signaling. Antioxid Redox Signal 2014;20:1075–85. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5179.

[48] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 1999;340:448–54. https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607.

[49] Redmond AK, Ohta Y, Criscitiello MF, Macqueen DJ, Flajnik MF, Dooley H. Haptoglobin Is a Divergent MASP Family Member That Neofunctionalized To Recycle Hemoglobin via CD163 in Mammals. J Immunol 2018;201:2483–91. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800508.

[50] Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature 2001;409:198–201. https://doi.org/10.1038/35051594.

[51] Zhao X, Song S, Sun G, Strong R, Zhang J, Grotta JC, et al. Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage. J Neurosci 2009;29:15819–27. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3776-09.2009.

[52] Yang F, Haile DJ, Berger FG, Herbert DC, Van Beveren E, Ghio AJ. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;284:L402-409. https://doi.org/10.1152/ajplung.00115.2002.

[53] Raju SM, Kumar AP, Yadav AN, Rajkumar K, Mvs S, Burgula S. Haptoglobin improves acute phase response and endotoxin tolerance in response to bacterial LPS. Immunol Lett 2019;207:17–27. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.01.002.

[54] Yang H, Wang H, Levine YA, Gunasekaran MK, Wang Y, Addorisio M, et al. Identification of CD163 as an antiinflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes. JCI Insight 2016;1:e85375, 85375. https://doi.org/10.1172/jci.insight.85375.

[55] Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. Nat Rev Immunol 2006;6:813–22. https://doi.org/10.1038/nri1943.

[56] Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 1995;376:37–43. https://doi.org/10.1038/376037a0.

[57] Hattori Y, Takano K, Teramae H, Yamamoto S, Yokoo H, Matsuda N. Insights into sepsis therapeutic design based on the apoptotic death pathway. J Pharmacol Sci 2010;114:354–65. https://doi.org/10.1254/jphs.10r04cr.

[58] Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. FASEB J 2001;15:879–92. https://doi.org/10.1096/fj.00-058rev.

[59] Luan Y, Yao Y, Xiao X, Sheng Z. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. J Interferon Cytokine Res 2015;35:17–22. https://doi.org/10.1089/jir.2014.0069.

[60] van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frölich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. Lancet 1998;351:950–3. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60606-X.

[61] Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med 1999;27:1230–51. https://doi.org/10.1097/00003246-199907000-00002.

[62] Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. Shock 2002;18:487–94. https://doi.org/10.1097/00024382-200212000-00001.

[63] Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. J Immunol 2005;174:5110–8. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.5110.

[64] Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. Shock 1997;7:247–53. https://doi.org/10.1097/00024382-199704000-00002.

[65] Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. Crit Care Med 1997;25:1298–307. https://doi.org/10.1097/00003246-199708000-00015.

[66] Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. J Immunol 1999;162:4148–56.

[67] Fu H, Wang Q-S, Luo Q, Tan S, Su H, Tang S-L, et al. Simvastatin inhibits apoptosis of endothelial cells induced by sepsis through upregulating the expression of Bcl-2 and downregulating Bax. World J Emerg Med 2014;5:291–7. https://doi.org/10.5847/wjem.j.issn.1920-8642.2014.04.009.

[68] Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. J Exp Med 2006;203:1637–42. https://doi.org/10.1084/jem.20052203.

[69] Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 1961;191:144–8. https://doi.org/10.1038/191144a0.

[70] Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. J Biomed Biotechnol 2012;2012:936486. https://doi.org/10.1155/2012/936486.

[71] Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annu Rev Biochem 1993;62:797–821. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.004053.

[72] Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;279:L1005-1028. https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005.

[73] Kelley EE, Khoo NKH, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. Free Radic Biol Med 2010;48:493–8. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.012.

[74] Wang W, Wang S, Yan L, Madara P, Del Pilar Cintron A, Wesley RA, et al. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem 2000;275:16899–903. https://doi.org/10.1074/jbc.M000301200.

[75] Verhaar MC, Westerweel PE, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Free radical production by dysfunctional eNOS. Heart 2004;90:494–5. https://doi.org/10.1136/hrt.2003.029405.

[76] Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2007;87:245–313. https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005.

[77] Gałecka E, Jacewicz R, Mrowicka M, Florkowski A, Gałecki P. [Antioxidative enzymes--structure, properties, functions]. Pol Merkur Lekarski 2008;25:266–8.

[78] Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. Pharmacol Ther 1990;47:61–71. https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90045-4.

[79] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev 2014;2014:360438. https://doi.org/10.1155/2014/360438.

[80] Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem Rev 2011;111:5944–72. https://doi.org/10.1021/cr200084z.

[81] Takeda K, Shimada Y, Amano M, Sakai T, Okada T, Yoshiya I. Plasma lipid peroxides and alpha-tocopherol in critically ill patients. Crit Care Med 1984;12:957–9. https://doi.org/10.1097/00003246-198411000-00007.

[82] Takeda K, Shimada Y, Okada T, Amano M, Sakai T, Yoshiya I. Lipid peroxidation in experimental septic rats. Crit Care Med 1986;14:719–23. https://doi.org/10.1097/00003246-198608000-00010.

[83] Liu P, Zhu W, Chen C, Yan B, Zhu L, Chen X, et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. Life Sci 2020;247:117443. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117443.

[84] Gräler MH, Goetzl EJ. Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. Biochim Biophys Acta 2002;1582:168–74. https://doi.org/10.1016/s1388-1981(02)00152-x.

[85] Liu T, Wang X, Guo F, Sun X, Yuan K, Wang Q, et al. Lysophosphatidylcholine induces apoptosis and inflammatory damage in brain microvascular endothelial cells via GPR4-mediated NLRP3 inflammasome activation. Toxicol In Vitro 2021;77:105227. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105227.

[86] Corrêa R, Silva LFF, Ribeiro DJS, Almeida R das N, Santos I de O, Corrêa LH, et al. Lysophosphatidylcholine Induces NLRP3 Inflammasome-Mediated Foam Cell Formation and Pyroptosis in Human Monocytes and Endothelial Cells. Front Immunol 2019;10:2927. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02927.

[87] Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. Crit Care Med 1996;24:392–7. https://doi.org/10.1097/00003246-199603000-00006.

[88] Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. Mass Spectrom Rev 2014;33:79–97. https://doi.org/10.1002/mas.21381.

[89] Piwowar A. [Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property]. Pol Merkur Lekarski 2010;28:166–9.

[90] Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. Clin Biochem 2007;40:248–54. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.017.

[91] Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB, et al. Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. J Biol Chem 2001;276:30188–98. https://doi.org/10.1074/jbc.M102061200.

[92] Blackwell TS, Yull FE, Chen CL, Venkatakrishnan A, Blackwell TR, Hicks DJ, et al. Multiorgan nuclear factor kappa B activation in a transgenic mouse model of systemic inflammation. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1095–101. https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.3.9906129.
[93] Wheeler DS. Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis. Open Inflamm J 2011;4:74–81. https://doi.org/10.2174/1875041901104010074.
[94] Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. Crit Care Med 1996;24:1179–83. https://doi.org/10.1097/00003246-199607000-00019.
[95] Karapetsa M, Pitsika M, Goutzourelas N, Stagos D, Tousia Becker A, Zakynthinos E. Oxidative status in ICU patients with septic shock. Food Chem Toxicol 2013;61:106–11. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.026.
[96] Gomar S, Bou R, Puertas FJ, Miranda M, Romero FJ, Romero B. Current Insights into Glutathione Depletion in Adult Septic Patients. Antioxidants (Basel) 2025;14:1033. https://doi.org/10.3390/antiox14091033.
[97] Andrades M, Ritter C, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. J Surg Res 2005;125:68–72. https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.11.008.
[98] Cuthbertson DP, Angeles Valero Zanuy MA, León Sanz ML. Post-shock metabolic response. 1942. Nutr Hosp 2001;16:176–82; discussion 175-176.
[99] Mizock BA. Metabolic derangements in sepsis and septic shock. Crit Care Clin 2000;16:319–36, vii. https://doi.org/10.1016/s0749-0704(05)70112-3.
[100] Wasyluk W, Zwolak A, Wasyluk W, Zwolak A. Metabolic Alterations in Sepsis. Journal of Clinical Medicine 2021;10. https://doi.org/10.3390/jcm10112412.
[101] Preau S, Vodovar D, Jung B, Lancel S, Zafrani L, Flatres A, et al. Energetic dysfunction in sepsis: a narrative review. Annals of Intensive Care 2021;11:104. https://doi.org/10.1186/s13613-021-00893-7.
[102] Delsoglio M, Achamrah N, Berger MM, Pichard C. Indirect Calorimetry in Clinical Practice. J Clin Med 2019;8:1387. https://doi.org/10.3390/jcm8091387.
[103] Koos B, Unterberg M, Rahmel T, Adamzik M. [Immunometabolism in Sepsis]. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2024;59:78–94. https://doi.org/10.1055/a-2070-3170.
[104] Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. Nat Rev Immunol 2011;11:81. https://doi.org/10.1038/nri2922.
[105] Koutroulis I, Batabyal R, McNamara B, Ledda M, Hoptay C, Freishtat RJ. Sepsis Immunometabolism: From Defining Sepsis to Understanding How Energy Production Affects Immune Response. Critical Care Explorations 2019;1:e0061. https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000061.
[106] Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. Nat Med 2009;15:496–7. https://doi.org/10.1038/nm0509-496.
[107] Vachharajani V, McCall CE. Epigenetic and metabolic programming of innate immunity in sepsis. Innate Immun 2019;25:267–79. https://doi.org/10.1177/1753425919842320.
[108] Collins K, Huen SC. Metabolism and Nutrition in Sepsis: In Need of a Paradigm Shift. Nephron 2023;147:733–6. https://doi.org/10.1159/000534074.
[109] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. Intensive Care Med 2021;47:1181–247. https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y.
[110] Langley RJ, Tsalik EL, van Velkinburgh JC, Glickman SW, Rice BJ, Wang C, et al. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. Sci Transl Med 2013;5:195ra95. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005893.
[111] Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. Cell 1988;55:281–90. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90051-7.

[112] Birnbaum MJ. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. Cell 1989;57:305–15. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90968-9.
[113] Exton JH, Park CR. Control of Gluconeogenesis in Liver: I. GENERAL FEATURES OF GLUCONEOGENESIS IN THE PERFUSED LIVERS OF RATS. Journal of Biological Chemistry 1967;242:2622–36. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99617-1.
[114] Bowman RH. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. J Biol Chem 1970;245:1604–12.
[115] Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. J Biol Chem 1980;255:4758–62.
[116] Linn TC, Pettit FH, Reed LJ. α-KETO ACID DEHYDROGENASE COMPLEXES, X. REGULATION OF THE ACTIVITY OF THE PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX FROM BEEF KIDNEY MITOCHONDRIA BY PHOSPHORYLATION AND DEPHOSPHORYLATION*. Proceedings of the National Academy of Sciences 1969;62:234–41. https://doi.org/10.1073/pnas.62.1.234.
[117] Van Wyngene L, Vandewalle J, Libert C. Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last? EMBO Molecular Medicine 2018;10:e8712. https://doi.org/10.15252/emmm.201708712.
[118] Mitsuyama Y, Shimizu K, Komukai S, Hirayama A, Takegawa R, Ebihara T, et al. Sepsis-associated hypoglycemia on admission is associated with increased mortality in intensive care unit patients. Acute Med Surg 2022;9:e718. https://doi.org/10.1002/ams2.718.
[119] Nuyttens L, Vandewalle J, Libert C. Sepsis-induced changes in pyruvate metabolism: insights and potential therapeutic approaches. EMBO Mol Med 2024;16:2678–98. https://doi.org/10.1038/s44321-024-00155-6.
[120] Fink MP. Cytopathic hypoxia. Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration? Crit Care Clin 2002;18:165–75. https://doi.org/10.1016/s0749-0704(03)00071-x.
[121] Palsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. Bioessays 2013;35:965–73. https://doi.org/10.1002/bies.201300084.
[122] Levy B, Desebbe O, Montemont C, Gibot S. Increased aerobic glycolysis through beta2 stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states. Shock 2008;30:417–21. https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318167378f.
[123] Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. Nature 2019;574:575–80. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1678-1.
[124] Grabner GF, Xie H, Schweiger M, Zechner R. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. Nat Metab 2021;3:1445–65. https://doi.org/10.1038/s42255-021-00493-6.
[125] White B. Dietary Fatty Acids. Afp 2009;80:345–50.
[126] Dhaka V, Gulia N, Ahlawat KS, Khatkar BS. Trans fats—sources, health risks and alternative approach - A review. J Food Sci Technol 2011;48:534–41. https://doi.org/10.1007/s13197-010-0225-8.
[127] Forse RA, Leibel R, Askanazi J, Hirsch J, Kinney JM. Adrenergic control of adipocyte lipolysis in trauma and sepsis. Ann Surg 1987;206:744–51. https://doi.org/10.1097/00000658-198712000-00010.
[128] Muniz-Santos R, Lucieri-Costa G, Almeida MAP de, Moraes-de-Souza I, Brito MADSM, Silva AR, et al. Lipid oxidation dysregulation: an emerging player in the pathophysiology of sepsis. Front Immunol 2023;14. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1224335.
[129] Engin AB. What Is Lipotoxicity? Adv Exp Med Biol 2017;960:197–220. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_8.
[130] Cai L, Rodgers E, Schoenmann N, Raju RP. Advances in Rodent Experimental Models of Sepsis. Int J Mol Sci 2023;24:9578. https://doi.org/10.3390/ijms24119578.
[131] Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. Br J Surg 2001;88:22–30. https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2001.01632.x.

[132] Powers ME, Becker REN, Sailer A, Turner JR, Bubeck Wardenburg J. Synergistic Action of Staphylococcus aureus α-Toxin on Platelets and Myeloid Lineage Cells Contributes to Lethal Sepsis. Cell Host Microbe 2015;17:775–87. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.011.
[133] van den Boogaard FE, Schouten M, de Stoppelaar SF, Roelofs JJTH, Brands X, Schultz MJ, et al. Thrombocytopenia impairs host defense during murine Streptococcus pneumoniae pneumonia. Crit Care Med 2015;43:e75-83. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000853.
[134] Holder IA, Nathan P. Effect in mice of injection of viable Candida albicans and a cell-free sonic extract on circulating platelets. Infect Immun 1973;7:468–72. https://doi.org/10.1128/iai.7.3.468-472.1973.
[135] Ghanta S, Kwon M-Y, Perrella MA. Induction of Sepsis Via Fibrin Clot Implantation. Methods Mol Biol 2021;2321:17–25. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1488-4_3.
[136] Deng M, Scott MJ, Loughran P, Gibson G, Sodhi C, Watkins S, et al. 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. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300496.
[137] Björck V, Påhlman LI, Törnebrant J, Bodelsson M. Streptococcal M1 protein induces hyporesponsiveness and cytokine release from human arteries in a fibrinogen-dependent manner: a translational study. Scand J Trauma Resusc Emerg Med 2018;26:61. https://doi.org/10.1186/s13049-018-0530-1.
[138] Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? Trends Microbiol 2011;19:198–208. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001.
[139] Li F, Wu C, He J, Zhang J, Chen Y, Li S, et al. Establishment and Evaluation of a "Two-Hit" Mouse Model of Sepsis 2021. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-474587/v1.
[140] Laudanski K. Humanized Mice as a Tool to Study Sepsis-More Than Meets the Eye. Int J Mol Sci 2021;22:2403. https://doi.org/10.3390/ijms22052403.
[141] Berlato DG, Bairros AV de. Meldonium: Pharmacological, toxicological, and analytical aspects. Toxicology Research and Application 2020;4:2397847320915143. https://doi.org/10.1177/2397847320915143.
[142] Spaniol M, Brooks H, Auer L, Zimmermann A, Solioz M, Stieger B, et al. Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. Eur J Biochem 2001;268:1876–87.
[143] Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuķe RJ, Molodchina TN, et al. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. Biochem Pharmacol 1988;37:195–202. https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90717-4.
[144] UniProt. UniProt n.d. https://www.uniprot.org/uniprotkb/O75936/entry#function (accessed December 7, 2025).
[145] Grigat S, Fork C, Bach M, Golz S, Geerts A, Schömig E, et al. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. Drug Metab Dispos 2009;37:330–7. https://doi.org/10.1124/dmd.108.023929.
[146] Grube M, Meyer zu Schwabedissen HEU, Präger; D, Haney J, Möritz K-U, Meissner K, et al. Uptake of Cardiovascular Drugs Into the Human Heart. Circulation 2006;113:1114–22. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.586107.
[147] Oppedisano F, Fanello D, Calvani M, Indiveri C. Interaction of mildronate with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transport protein. J Biochem Mol Toxicol 2008;22:8–14. https://doi.org/10.1002/jbt.20208.
[148] Liepinsh E, Kuka J, Svalbe B, Vilskersts R, Skapare E, Cirule H, et al. Effects of long-term mildronate treatment on cardiac and liver functions in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2009;105:387–94. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00461.x.
[149] Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. American Journal of Kidney Diseases 2003;41:S4–12. https://doi.org/10.1016/S0272-6386(03)00112-4.
[150] Harmeyer J. The physiological role of L-carnitine. Lohman Information 2002;27:15–21.

[151] Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Tsoko M, André A, Demaison L, et al. Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. Mol Cell Biochem 2004;258:171–82. https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000012853.20116.06.

[152] Dambrova M, Makrecka-Kuka M, Vilskersts R, Makarova E, Kuka J, Liepinsh E. Pharmacological effects of meldonium: Biochemical mechanisms and biomarkers of cardiometabolic activity. Pharmacol Res 2016;113:771–80. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.019.

[153] Liepinsh E, Skapare E, Kuka J, Makrecka M, Cirule H, Vavers E, et al. Activated peroxisomal fatty acid metabolism improves cardiac recovery in ischemia-reperfusion. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2013;386:541–50. https://doi.org/10.1007/s00210-013-0849-0.

[154] Virmani MA, Cirulli M, Virmani MA, Cirulli M. The Role of l-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. International Journal of Molecular Sciences 2022;23. https://doi.org/10.3390/ijms23052717.

[155] Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet 1963;1:785–9. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(63)91500-9.

[156] Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;297:E578-591. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00093.2009.

[157] Savic D, Ball V, Holzner L, Hauton D, Timm KN, Curtis MK, et al. Hyperpolarized magnetic resonance shows that the anti-ischemic drug meldonium leads to increased flux through pyruvate dehydrogenase in vivo resulting in improved post-ischemic function in the diabetic heart. NMR Biomed 2021;34:e4471. https://doi.org/10.1002/nbm.4471.

[158] McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. J Biol Chem 1978;253:4128–36.

[159] Liepinsh E, Vilskersts R, Zvejniece L, Svalbe B, Skapare E, Kuka J, et al. Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. Br J Pharmacol 2009;157:1549–56. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00319.x.

[160] Gureev AP, Sadovnikova IS, Shaforostova EA, Starkov AA, Popov VN. Mildronate protects heart mtDNA from oxidative stress toxicity induced by exhaustive physical exercise. Arch Biochem Biophys 2021;705:108892. https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108892.

[161] Volodina DE, Gureev AP, Shaforostova EA, Gryaznova MV, Ignatyeva DA, Popov VN. Effect of l-carnitine and mildronate on the mitochondrial metabolism of heart and bacterial composition of the gut microbiome in ageing mice. Life Sci 2022;293:120333. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120333.

[162] Bjørndal B, Tungland SL, Bohov P, Sydnes MO, Dankel SN, Madsen L, et al. Meldonium-induced steatosis is associated with increased delta 6 desaturation and reduced elongation of n-6 polyunsaturated fatty acids. Liver Res 2024;8:152–64. https://doi.org/10.1016/j.livres.2024.09.001.

[163] Mildronate ameliorates kidney injury and reduces inflammation in Sickle Cell Disease mice | Physiology | American Physiological Society n.d. https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physiol.2024.39.S1.1512 (accessed August 27, 2025).

[164] 魏云伟邵东华, WEI Yun-wei SD. Effect of LPS-induced acute lung injury in mice by mildronate. 南京医科大学学报(自然科学版英文版) n.d.:468–72.

[165] Liu F, Sui X, Wang Q, Li J, Yang W, Yang Y, et al. Insights into the pharmacodynamics and pharmacokinetics of meldonium after exposure to acute high altitude. Front Pharmacol 2023;14:1119046. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1119046.

[166] Wang D, Liu F, Yang W, Sun Y, Wang X, Sui X, et al. Meldonium Ameliorates Hypoxia-Induced Lung Injury and Oxidative Stress by Regulating Platelet-Type Phosphofructokinase-Mediated Glycolysis. Front Pharmacol 2022;13:863451. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.863451.

[167] Sankar P, Ramos RB, Corro J, Mishra LK, Nafiz TN, Bhargavi G, et al. Fatty acid metabolism in neutrophils promotes lung damage and bacterial replication during tuberculosis. PLoS Pathog 2024;20:e1012188. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012188.
[168] Otsubo C, Bharathi S, Uppala R, Ilkayeva OR, Wang D, McHugh K, et al. Long-chain Acylcarnitines Reduce Lung Function by Inhibiting Pulmonary Surfactant. J Biol Chem 2015;290:23897–904. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655837.
[169] Pupure J, Isajevs S, Skapare E, Rumaks J, Svirskis S, Svirina D, et al. Neuroprotective properties of mildronate, a mitochondria-targeted small molecule. Neurosci Lett 2010;470:100–5. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.055.
[170] Demir D, Kuru Bektaşoğlu P, Koyuncuoğlu T, Kandemir C, Akakın D, Yüksel M, et al. Neuroprotective effects of mildronate in a rat model of traumatic brain injury. Injury 2019;50:1586–92. https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.08.036.
[171] Gureev AP, Nesterova VV, Babenkova PI, Ivanov ME, Plotnikov EY, Silachev DN. L-Carnitine and Mildronate Demonstrate Divergent Protective Effects on Mitochondrial DNA Quality Control and Inflammation Following Traumatic Brain Injury. Int J Mol Sci 2025;26:2902. https://doi.org/10.3390/ijms26072902.
[172] Liu F, He H, Yang W, Wang D, Sui X, Sun Y, et al. Novel energy optimizer, meldonium, rapidly restores acute hypobaric hypoxia-induced brain injury by targeting phosphoglycerate kinase 1. Cell Commun Signal 2024;22:383. https://doi.org/10.1186/s12964-024-01757-w.
[173] Pupure J, Rumaks J, Isajevs S, Korzakova O, Puncule J, Svirskis S, et al. Mildronate's protective effects in the peripheral nervous system: stavudine-induced neuropathy and formalin-induced inflammation. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural, Exact, and Applied Sciences 2011;64:114–8. https://doi.org/10.2478/v10046-010-0032-7.
[174] Ozaydin D, Kuru Bektaşoğlu P, Türe D, Bozkurt H, Ergüder Bİ, Sargon MF, et al. Mildronate Has Ameliorative Effects on the Experimental Ischemia/Reperfusion Injury Model in the Rabbit Spinal Cord. World Neurosurgery 2023;173:e717–26. https://doi.org/10.1016/j.wneu.2023.02.139.
[175] Moneva-Marinova K, Gancheva S, Hvarchanova N, Georgieva M, Stoeva-Grigorova S, Radeva-Ilieva M, et al. Effects of meldonium on the behavior of rats in a model of lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. Pharmacia 2025;72:1–7. https://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e152698.
[176] Beitnere U, van Groen T, Kumar A, Jansone B, Klusa V, Kadish I. Mildronate improves cognition and reduces amyloid-β pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. Journal of Neuroscience Research 2014;92:338–46. https://doi.org/10.1002/jnr.23315.
[177] Isajevs S, Isajeva D, Beitnere U, Jansone B, Kalvinsh I, Klusa V. Mildronate as a regulator of protein expression in a rat model of Parkinson's disease. Medicina (Kaunas) 2011;47:552–9.
[178] Klusa VZ, Isajevs S, Svirina D, Pupure J, Beitnere U, Rumaks J, et al. Neuroprotective properties of mildronate, a small molecule, in a rat model of Parkinson's disease. Int J Mol Sci 2010;11:4465–87. https://doi.org/10.3390/ijms11114465.
[179] Fink MA, Paland H, Herzog S, Grube M, Vogelgesang S, Weitmann K, et al. L-Carnitine-Mediated Tumor Cell Protection and Poor Patient Survival Associated with OCTN2 Overexpression in Glioblastoma Multiforme. Clin Cancer Res 2019;25:2874–86. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2380.
[180] Zvejniece L, Svalbe B, Makrecka M, Liepinsh E, Kalvinsh I, Dambrova M. Mildronate exerts acute anticonvulsant and antihypnotic effects. Behav Pharmacol 2010;21:548–55. https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32833d5a59.
[181] Shaforostova EA, Gureev AP, Volodina DE, Popov VN. Neuroprotective effect of mildronate and L-carnitine on the cognitive parameters of aged mice and mice with LPS-induced inflammation. Metab Brain Dis 2022;37:2497–510. https://doi.org/10.1007/s11011-022-01047-9.
[182] Mkrtchian VP, Orlov VA. [Therapeutic efficacy of mildronate in pulmonary diseases]. Lik Sprava 2005:72–3.

[183] Statsenko ME, Евгеньевич CM, Turkina SV, Владимировна TC, Lopushkova YE, Евгеньевна ЛЮ. The effect of meldonium on the heart rate variability in the complex therapy of patients with chronic heart failure and chronic obstructive pulmonary disease. Therapy 2023;9:153–61. https://doi.org/10.18565/therapy.2023.4.153–161.

[184] Statsenko ME, Евгеньевич CM, Fabritskaya SV, Владимировна ФС, Derevyanchenko MV, Владимировна ДМ. Combination therapy of a patient with chronic heart failure and type 2 diabetes mellitus: a clinical case of meldonium use. Pharmateca 2025;32:151–6. https://doi.org/10.18565/pharmateca.2025.2.151-156.

[185] Svanidze T, Klimiashvili Z, Saralidze T, Noniashvili M, Malidze D. Effect of metabolic therapy on cardiac function during the first 3 months after acute myocardial infarction. Eur J Prev Cardiol 2025;32:zwaf236.071. https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwaf236.071.

[186] Dzerve V, MILSS I Study Group. A dose-dependent improvement in exercise tolerance in patients with stable angina treated with mildronate: a clinical trial "MILSS I." Medicina (Kaunas) 2011;47:544–51.

[187] Liepinsh E, Konrade I, Skapare E, Pugovics O, Grinberga S, Kuka J, et al. Mildronate treatment alters γ-butyrobetaine and l-carnitine concentrations in healthy volunteers. J Pharm Pharmacol 2011;63:1195–201. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01325.x.

[188] Bien-Möller S, Weidemeier ME, Radke J, Baldauf J, Engeli S, Tzvetkov MV, et al. Case report of three patients with end-stage recurrent glioblastoma treated with meldonium. BJC Rep 2025;3:29. https://doi.org/10.1038/s44276-025-00124-7.

[189] Đurašević S, Stojković M, Sopta J, Pavlović S, Borković-Mitić S, Ivanović A, et al. The effects of meldonium on the acute ischemia/reperfusion liver injury in rats. Sci Rep 2021;11:1305. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80011-y.

[190] Đurašević S, Stojković M, Bogdanović L, Pavlović S, Borković-Mitić S, Grigorov I, et al. The Effects of Meldonium on the Renal Acute Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. Int J Mol Sci 2019;20:5747. https://doi.org/10.3390/ijms20225747.

[191] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265–75.

[192] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 1972;247:3170–5.

[193] Claiborne A. Catalase Activity. Handbook Methods For Oxygen Radical Research, CRC Press; 1985.

[194] Tamura M, Oshino N, Chance B. Some characteristics of hydrogen- and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. J Biochem 1982;92:1019–31. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134017.

[195] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. Journal of Biological Chemistry 1974;249:7130–9. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8.

[196] Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. Experientia 1974;30:665–7. https://doi.org/10.1007/BF01921531.

[197] Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry 1980;106:207–12. https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6.

[198] Rehncrona S, Smith DS, Åkesson B, Westerberg E, Siesjö BK. Peroxidative Changes in Brain Cortical Fatty Acids and Phospholipids, as Characterized During Fe2+- and Ascorbic Acid-Stimulated Lipid Peroxidation In Vitro. Journal of Neurochemistry 1980;34:1630–8. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb11254.x.

[199] Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan J-C, Chaudière J. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. Chem Res Toxicol 1998;11:1176–83. https://doi.org/10.1021/tx9701790.

[200] Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. Anal Biochem 2014;458:69–71. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034.

[201] Alamdari DH, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebati M, Ghafoori F, et al. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. Clin Biochem 2008;41:375–80. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.12.008.

[202] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int 1996;49:1304–13. https://doi.org/10.1038/ki.1996.186.

[203] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. Crit Care Med 2021;49:e1063–143. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005337.

[204] Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. N Engl J Med 2012;366:2055–64. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202290.

[205] Rowan KM, Welch CA, North E, Harrison DA. Drotrecogin alfa (activated): real-life use and outcomes for the UK. Crit Care 2008;12:R58. https://doi.org/10.1186/cc6879.

[206] Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. Nat Rev Drug Discov 2019;18:41–58. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168.

[207] Qin Z, Zhou C, Xiao X, Guo C. Metformin attenuates sepsis-induced neuronal injury and cognitive impairment. BMC Neurosci 2021;22:78. https://doi.org/10.1186/s12868-021-00683-8.

[208] Fan S-Y, Zhao Z-C, Liu X-L, Peng Y-G, Zhu H-M, Yan S-F, et al. Metformin Mitigates Sepsis-Induced Acute Lung Injury and Inflammation in Young Mice by Suppressing the S100A8/A9-NLRP3-IL-1β Signaling Pathway. J Inflamm Res 2024;17:3785–99. https://doi.org/10.2147/JIR.S460413.

[209] Liang H, Ding X, Li L, Wang T, Kan Q, Wang L, et al. Association of preadmission metformin use and mortality in patients with sepsis and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. Crit Care 2019;23:50. https://doi.org/10.1186/s13054-019-2346-4.

[210] Jin B-Y, Lee S, Kim W, Park J-H, Cho H, Moon S, et al. Association of metformin administration after septic shock with short-term and long-term survival in septic shock patients with diabetes. Ann Intensive Care 2025;15:68. https://doi.org/10.1186/s13613-025-01490-8.

[211] Almog Y, Shefer A, Novack V, Maimon N, Barski L, Eizinger M, et al. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. Circulation 2004;110:880–5. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000138932.17956.F1.

[212] Kruger P, Bailey M, Bellomo R, Cooper DJ, Harward M, Higgins A, et al. A multicenter randomized trial of atorvastatin therapy in intensive care patients with severe sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2013;187:743–50. https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1718OC.

[213] Patel JM, Snaith C, Thickett DR, Linhartova L, Melody T, Hawkey P, et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of 40 mg/day of atorvastatin in reducing the severity of sepsis in ward patients (ASEPSIS Trial). Crit Care 2012;16:R231. https://doi.org/10.1186/cc11895.

[214] Schobersberger W, Dünnwald T, Gmeiner G, Blank C. Story behind meldonium-from pharmacology to performance enhancement: a narrative review. Br J Sports Med 2017;51:22–5. https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-096357.

[215] U B, T van G, A K, B J, V K, I K. Mildronate improves cognition and reduces amyloid-β pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. Journal of Neuroscience Research 2014;92. https://doi.org/10.1002/jnr.23315.

[216] Klusa VZ, Isajevs S, Svirina D, Pupure J, Beitnere U, Rumaks J, et al. Neuroprotective Properties of Mildronate, a Small Molecule, in a Rat Model of Parkinson's Disease. Int J Mol Sci 2010;11:4465–87. https://doi.org/10.3390/ijms11114465.

[217] Shaforostova EA, Gureev AP, Volodina DE, Popov VN. Neuroprotective effect of mildronate and L-carnitine on the cognitive parameters of aged mice and mice with LPS-induced inflammation. Metab Brain Dis 2022;37:2497–510. https://doi.org/10.1007/s11011-022-01047-9.
[218] Nechaeva GI, Zheltikova EN. [Effects of Meldonium in Early Postmyocardial Infarction Period]. Kardiologiia 2015;55:35–42.
[219] Mikhin VP, Cherniatina MA, Panchenko GV, Kharchenko AV, Tsukanova IA. [Efficiency of meldonium in the complex therapy of acute coronary syndrome]. Kardiologiia 2014;54:11–9. https://doi.org/10.18565/cardio.2014.11.11-19.
[220] Liamina NP, Kotel'nikova EV, Karpova ÉS, Biziaeva EA, Senchikhin VN, Lipchanskaia TP. [Cardioprotective capabilities of drug meldonium in secondary prevention after percutaneous coronary intervention in patients with documented myocardial ischemia]. Kardiologiia 2014;54:60–5.
[221] Kidney Cancer Research Bureau. A Phase 1/2 Study of the Safety and Preliminary Efficacy of Meldonium in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma and Treatment-associated Fatigue. clinicaltrials.gov; 2024.
[222] Sjakste N, Baumane L, Boucher J-L, Dzintare M, Meirena D, Sjakste J, et al. Effects of gamma-butyrobetaine and mildronate on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004;94:46–50.
[223] Gureev AP, Babenkova PI, Nesterova VV, Tsvetkova AD, Gryaznova MV, Shaforostova EA. Protection of Testis against Lipopolysaccharide-Induced Toxicity: Mildronate-Induced L-Carnitine Depletion as a Modulator of Gut Microbiome Composition and Gastrointestinal Inflammation. Gastrointestinal Disorders 2023;5:536–48. https://doi.org/10.3390/gidisord5040044.
[224] Mai SHC, Sharma N, Kwong AC, Dwivedi DJ, Khan M, Grin PM, et al. Body temperature and mouse scoring systems as surrogate markers of death in cecal ligation and puncture sepsis. Intensive Care Med Exp 2018;6:20. https://doi.org/10.1186/s40635-018-0184-3.
[225] Isajevs S, Isajeva D, Beitnere U, Jansone B, Kalvinsh I, Klusa V. Mildronate as a Regulator of Protein Expression in a Rat Model of Parkinson's Disease. Medicina 2011;47:79. https://doi.org/10.3390/medicina47100079.
[226] Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J Basic Clin Pharm 2016;7:27–31. https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703.
[227] Garcia LF, Singh V, Mireles B, Dwivedi AK, Walker WE. Common Variables That Influence Sepsis Mortality in Mice. J Inflamm Res 2023;16:1121–34. https://doi.org/10.2147/JIR.S400115.
[228] Drechsler S, Weixelbaumer KM, Weidinger A, Raeven P, Khadem A, Redl H, et al. Why do they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis. Intensive Care Medicine Experimental 2015;3:12. https://doi.org/10.1186/s40635-015-0048-z.
[229] Volakli E, Spies C, Michalopoulos A, Groeneveld ABJ, Sakr Y, Vincent J-L. Infections of respiratory or abdominal origin in ICU patients: what are the differences? Crit Care 2010;14:R32. https://doi.org/10.1186/cc8909.
[230] Fang H, Gong C, Fu J, Liu X, Bi H, Cheng Y, et al. Evaluation of 2 Rat Models for Sepsis Developed by Improved Cecal Ligation/Puncture or Feces Intraperitoneal-Injection. Med Sci Monit 2020;26:e919054. https://doi.org/10.12659/MSM.919054.
[231] Yoon YD, Lee MY, Choi BJ, Lee CW, Lee H, Kwon J-H, et al. Protection against Lipopolysaccharide-Induced Endotoxemia by Terrein Is Mediated by Blocking Interleukin-1β and Interleukin-6 Production. Pharmaceuticals (Basel) 2022;15:1429. https://doi.org/10.3390/ph15111429.
[232] Lee MJ, Kim K, Jo YH, Lee JH, Hwang JE. Dose-dependent mortality and organ injury in a cecal slurry peritonitis model. J Surg Res 2016;206:427–34. https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.054.
[233] Freise H, Brückner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. J Invest Surg 2001;14:195–212. https://doi.org/10.1080/089419301750420232.

[234] Zolfaghari PS, Pinto BB, Dyson A, Singer M. The metabolic phenotype of rodent sepsis: cause for concern? Intensive Care Med Exp 2013;1:25. https://doi.org/10.1186/2197-425X-1-6.
[235] Costa LHA, Trajano IP, Passaglia P, Branco LGS. Thermoregulation and survival during sepsis: insights from the cecal ligation and puncture experimental model. ICMx 2024;12:100. https://doi.org/10.1186/s40635-024-00687-8.
[236] Smirnova MD, Svirida ON, Ageev FT, Forfanova TV, Vitsenia MV, Mikhaĭlov GV. [The ability to use meldonium as adaptogen in winter in patients with cardiovascular disease]. Kardiologiia 2014;54:51–6. https://doi.org/10.18565/cardio.2014.10.51-56.
[237] Smirnova MD, Svirida ON, Vitsenia MV, Kuzmina AE, Lankin VZ, Tikhaze AK, et al. [Using meldonium to improve the adaptation of patients with cardiovascular disease to the effects of heat and correction of associated oxidative stress]. Kardiologiia 2014;54:53–9. https://doi.org/10.18565/cardio.2014.7.53-59.
[238] Jarrar D, Wang P, Chaudry IH. Hepatocellular dysfunction–basic considerations. Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented, Zuckschwerdt; 2001.
[239] Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. Clin J Am Soc Nephrol 2007;2:431–9. https://doi.org/10.2215/CJN.03681106.
[240] Fernandes CJ, Akamine N, Knobel E. Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. Intensive Care Med 1999;25:1165–8. https://doi.org/10.1007/s001340051030.
[241] Romero-Bermejo FJ, Ruiz-Bailen M, Gil-Cebrian J, Huertos-Ranchal MJ. Sepsis-induced cardiomyopathy. Curr Cardiol Rev 2011;7:163–83. https://doi.org/10.2174/157340311798220494.
[242] Guo Y, Guo W, Chen H, Sun J, Yin Y. Mechanisms of sepsis-induced acute liver injury: a comprehensive review. Front Cell Infect Microbiol 2025;15:1504223. https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1504223.
[243] Wang D-H, Jia H-M, Zheng X, Xi X-M, Zheng Y, Li W-X. Attributable mortality of ARDS among critically ill patients with sepsis: a multicenter, retrospective cohort study. BMC Pulm Med 2024;24:110. https://doi.org/10.1186/s12890-024-02913-1.
[244] Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, et al. Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. PLoS Med 2012;9:e1001338. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001338.
[245] Muftuoglu MAT, Aktekin A, Ozdemir NC, Saglam A. Liver injury in sepsis and abdominal compartment syndrome in rats. Surg Today 2006;36:519–24. https://doi.org/10.1007/s00595-006-3196-7.
[246] Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. Nat Rev Immunol 2012;12:201–13. https://doi.org/10.1038/nri3169.
[247] J Y, S L. The role of the liver in sepsis. International Reviews of Immunology 2014;33. https://doi.org/10.3109/08830185.2014.889129.
[248] Beyer D, Hoff J, Sommerfeld O, Zipprich A, Gaßler N, Press AT. The liver in sepsis: molecular mechanism of liver failure and their potential for clinical translation. Mol Med 2022;28:84. https://doi.org/10.1186/s10020-022-00510-8.
[249] Huang Y, Zang K, Shang F, Guo S, Gao L, Zhang X. HMGB1 mediates acute liver injury in sepsis through pyroptosis of liver macrophages. Int J Burns Trauma 2020;10:60–7.
[250] Cui S, Li Y, Zhang X, Wu B, Li M, Gao J, et al. Fibroblast growth factor 5 overexpression ameliorated lipopolysaccharide-induced apoptosis of hepatocytes through regulation of the phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B pathway. Chin Med J (Engl) 2022;135:2859–68. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002540.
[251] Nežić L, Amidžić L, Škrbić R, Gajanin R, Nepovimova E, Vališ M, et al. Simvastatin Inhibits Endotoxin-Induced Apoptosis in Liver and Spleen Through Up-Regulation of Survivin/NF-κB/p65 Expression. Front Pharmacol 2019;10:54. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00054.
[252] Zaini A, Jawad HE, Hadi NR. Targeting VEGF using Bevacizumab attenuates sepsis-induced liver injury in a mouse model of cecal ligation and puncture. J Med Life 2023;16:1488–98. https://doi.org/10.25122/jml-2023-0064.

[253] Matouk AI, El-Daly M, Habib HA, Senousy S, Naguib Abdel Hafez SM, Kasem AW, et al. Protective effects of menthol against sepsis-induced hepatic injury: Role of mediators of hepatic inflammation, apoptosis, and regeneration. Front Pharmacol 2022;13:952337. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.952337.
[254] S Q, H W, R Y, H L, M O, K O, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. The Journal of Experimental Medicine 2006;203. https://doi.org/10.1084/jem.20052203.
[255] Xu W, Lu Y, Yao J, Li Z, Chen Z, Wang G, et al. Novel role of resveratrol: suppression of high-mobility group protein box 1 nucleocytoplasmic translocation by the upregulation of sirtuin 1 in sepsis-induced liver injury. Shock 2014;42:440–7. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000225.
[256] Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Ferguson DA. Early activation of hepatic NFkappaB and NF-IL6 in polymicrobial sepsis correlates with bacteremia, cytokine expression, and mortality. Ann Surg 1999;230:95–104. https://doi.org/10.1097/00000658-199907000-00014.
[257] Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;290:L622–45. https://doi.org/10.1152/ajplung.00477.2005.
[258] Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. J Hepatol 2011;55:227–8. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.006.
[259] Galicia-Moreno M, Lucano-Landeros S, Monroy-Ramirez HC, Silva-Gomez J, Gutierrez-Cuevas J, Santos A, et al. Roles of Nrf2 in Liver Diseases: Molecular, Pharmacological, and Epigenetic Aspects. Antioxidants (Basel) 2020;9:980. https://doi.org/10.3390/antiox9100980.
[260] Lima GC, Vasconcelos Y de AG, de Santana Souza MT, Oliveira AS, Bomfim RR, de Albuquerque Júnior RLC, et al. Hepatoprotective Effect of Essential Oils from Hyptis crenata in Sepsis-Induced Liver Dysfunction. J Med Food 2018;21:709–15. https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0125.
[261] Zhou Y, Hu X, Zhong S, Yu W, Wang J, Zhu W, et al. Effects of Continuous LPS Induction on Oxidative Stress and Liver Injury in Weaned Piglets. Vet Sci 2022;10:22. https://doi.org/10.3390/vetsci10010022.
[262] Li X-K, Yang S-C, Bi L, Jia Z. Effects of dexmedetomidine on sepsis-induced liver injury in rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2019;23:177–83. https://doi.org/10.26355/eurrev_201908_18645.
[263] Shilo S, Pardo M, Aharoni-Simon M, Glibter S, Tirosh O. Selenium supplementation increases liver MnSOD expression: molecular mechanism for hepato-protection. J Inorg Biochem 2008;102:110–8. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.07.027.
[264] Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. J Biomed Sci 2017;24:60. https://doi.org/10.1186/s12929-017-0370-8.
[265] Zhang B, Liu C, Yang N, Wang X. A comparative study of changes of autophagy in rat models of CLP versus LPS induced sepsis. Exp Ther Med 2017;14:2194–200. https://doi.org/10.3892/etm.2017.4758.
[266] Gómez H, Kellum JA. Chapter 90 - Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA, Ricci Z, editors. Critical Care Nephrology (Third Edition), Philadelphia: Elsevier; 2019, p. 524-533.e3. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00090-X.
[267] Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AAK, Vernekar SN. Markers of renal function tests. N Am J Med Sci 2010;2:170–3.
[268] Krstic D, Tomic N, Radosavljevic B, Avramovic N, Dragutinovic V, Skodric SR, et al. Biochemical Markers of Renal Function. Curr Med Chem 2016;23:2018–40. https://doi.org/10.2174/0929867323666160115130241.
[269] Beier K, Eppanapally S, Bazick HS, Chang D, Mahadevappa K, Gibbons FK, et al. Elevation of blood urea nitrogen is predictive of long-term mortality in critically ill patients independent of "normal" creatinine. Crit Care Med 2011;39:305–13. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ffe22a.
[270] Kosaka J, Lankadeva YR, May CN, Bellomo R. Histopathology of Septic Acute Kidney Injury: A Systematic Review of Experimental Data. Crit Care Med 2016;44:e897-903. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001735.
[271] Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. Shock 2014;41:3–11. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000052.

[272] Nakano D, Kitada K, Wan N, Zhang Y, Wiig H, Wararat K, et al. Lipopolysaccharide induces filtrate leakage from renal tubular lumina into the interstitial space via a proximal tubular Toll-like receptor 4-dependent pathway and limits sensitivity to fluid therapy in mice. Kidney Int 2020;97:904–12. https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.11.024.

[273] Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, Dunn KW, El-Achkar TM, Plotkin Z, et al. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. J Am Soc Nephrol 2011;22:1505–16. https://doi.org/10.1681/ASN.2011020203.

[274] Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, Pathak E, Spencer HJ, Gokden N, et al. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. Am J Pathol 2012;180:505–16. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.011.

[275] Toufekoula C, Papadakis V, Tsaganos T, Routsi C, Orfanos SE, Kotanidou A, et al. Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram-negative bacteria: experimental and clinical evidence. Crit Care 2013;17:R6. https://doi.org/10.1186/cc11930.

[276] Lu C, Fan G, Wang D. Akebia Saponin D ameliorated kidney injury and exerted anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in diabetic nephropathy by activation of NRF2/HO-1 and inhibition of NF-KB pathway. International Immunopharmacology 2020;84:106467. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106467.

[277] Li J, Gong Q, Zhong S, Wang L, Guo H, Xiang Y, et al. Neutralization of the extracellular HMGB1 released by ischaemic-damaged renal cells protects against renal ischaemia–reperfusion injury. Nephrol Dial Transplant 2011;26:469–78. https://doi.org/10.1093/ndt/gfq466.

[278] Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, et al. HMGB1 Contributes to Kidney Ischemia Reperfusion Injury. Journal of the American Society of Nephrology 2010;21:1878–90. https://doi.org/10.1681/ASN.2009101048.

[279] Miura K, Sahara H, Sekijima M, Kawai A, Waki S, Nishimura H, et al. Protective Effect of Neutralization of the Extracellular High-Mobility Group Box 1 on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Miniature Swine. Transplantation 2014;98:937–43. https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000358.

[280] Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. Crit Care 2002;6:500–8. https://doi.org/10.1186/cc1822.

[281] Tiwari L, Chaturvedi J, Anand C. Myocardial Dysfunction in Sepsis. Journal of Pediatric Critical Care 2018;5:41. https://doi.org/10.21304/2018.0504.00409.

[282] Smeding L, Plötz FB, Groeneveld ABJ, Kneyber MCJ. Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock. Shock 2012;37:449–56. https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824c3238.

[283] Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. J Exp Med 1996;183:949–58. https://doi.org/10.1084/jem.183.3.949.

[284] Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. Br J Pharmacol 1992;105:575–80. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb09021.x.

[285] Shang X, Lin K, Yu R, Zhu P, Zhang Y, Wang L, et al. Resveratrol Protects the Myocardium in Sepsis by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K)/AKT/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway and Inhibiting the Nuclear Factor-κB (NF-κB) Signaling Pathway. Med Sci Monit 2019;25:9290–8. https://doi.org/10.12659/MSM.918369.

[286] Hussain N. Elevated Cardiac Troponins in Setting of Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis, and Septic Shock. International Scholarly Research Notices 2013;2013:723435. https://doi.org/10.1155/2013/723435.

[287] ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. Cardiac Troponins I and T Are Biological Markers of Left Ventricular Dysfunction in Septic Shock. Clin Chem 2000;46:650–7. https://doi.org/10.1093/clinchem/46.5.650.

[288] Sun B, Lei M, Zhang J, Kang H, Liu H, Zhou F. Acute lung injury caused by sepsis: how does it happen? Front Med 2023;10. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1289194.

[289] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. Am J Respir Cell Mol Biol 2011;44:725–38. https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0210ST.
[290] Fodor R-Ş, Georgescu AM, Cioc A-D, Grigorescu BL, Cotoi OS, Fodor P, et al. Time- and dose-dependent severity of lung injury in a rat model of sepsis. Rom J Morphol Embryol 2015;56:1329–37.
[291] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 2008;295:L379–99. https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008.
[292] Beasley MB. The Pathologist's Approach to Acute Lung Injury. Arch Pathol Lab Med 2010;134:719–27. https://doi.org/10.5858/134.5.719.
[293] Thomsen JH, Etzerodt A, Svendsen P, Moestrup SK. The Haptoglobin-CD163-Heme Oxygenase-1 Pathway for Hemoglobin Scavenging. Oxid Med Cell Longev 2013;2013:523652. https://doi.org/10.1155/2013/523652.
[294] Surolia R, Antony VB. Pathophysiological Role of Vimentin Intermediate Filaments in Lung Diseases. Front Cell Dev Biol 2022;10. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.872759.
[295] Guo R-F, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis. Antioxid Redox Signal 2007;9:1991–2002. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1785.
[296] Zhou P, Zhao C, Chen Y, Liu X, Wu C, Hu Z. Klotho activation of Nrf2 inhibits the ferroptosis signaling pathway to ameliorate sepsis-associated acute kidney injury. Transl Androl Urol 2023;12:1871–84. https://doi.org/10.21037/tau-23-573.
[297] Zhou G, Xie D, Fan R, Yang Z, Du J, Mai S, et al. Comparison of Pulmonary and Extrapulmonary Models of Sepsis-Associated Acute Lung Injury. Physiol Res 2023;72:741–52. https://doi.org/10.33549/physiolres.935123.
[298] de Souza Xavier Costa N, Ribeiro Júnior G, Dos Santos Alemany AA, Belotti L, Zati DH, Frota Cavalcante M, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. PLoS One 2017;12:e0185474. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185474.
[299] 王永安, 骆媛, 孙阳阳, 高翔, 隋昕, 杨军, et al. Application of mildronate in preparation of drug for treating paraquat poisoning and drug. CN111374966B, 2021.
[300] Tenhunen AB, Heijden J van der, Blokhin I, Massaro F, Hansson HA, Feinstein R, et al. The antisecretory peptide AF-16 may modulate tissue edema but not inflammation in experimental peritonitis induced sepsis. PLOS ONE 2020;15:e0232302. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232302.
[301] Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. Shock 2000;13:110–6. https://doi.org/10.1097/00024382-200013020-00004.
[302] Kreymann G, Grosser S, Buggisch P, Gottschall C, Matthaei S, Greten H. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. Crit Care Med 1993;21:1012–9. https://doi.org/10.1097/00003246-199307000-00015.
[303] Adami PE, Koutlianos N, Baggish A, Bermon S, Cavarretta E, Deligiannis A, et al. Cardiovascular effects of doping substances, commonly prescribed medications and ergogenic aids in relation to sports: a position statement of the sport cardiology and exercise nucleus of the European Association of Preventive Cardiology. Eur J Prev Cardiol 2022;29:559–75. https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwab198.
[304] Miroshnikov A.B., Meshtel A.V. On the safety of Meldonium (Mildronate®) for athletes: a scoping review n.d. https://intsport.ru/en/journal-issues/2023-4/miroshnikov2023e (accessed August 27, 2025).
[305] Wasyluk W, Fiut R, Świetlicka I, Szukała M, Zwolak A, Jonckheer J, et al. Time-course changes in energy expenditure in sepsis: a prospective observational study. Ann Intensive Care 2025;15:158. https://doi.org/10.1186/s13613-025-01592-3.
[306] Ayres JS, Schneider DS. Tolerance of infections. Annu Rev Immunol 2012;30:271–94. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075030.

[307] Liu J, Zhou G, Wang X, Liu D. Metabolic reprogramming consequences of sepsis: adaptations and contradictions. Cell Mol Life Sci 2022;79:456. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04490-0.
[308] Cheng S-C, Scicluna BP, Arts RJW, Gresnigt MS, Lachmandas E, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. Nat Immunol 2016;17:406–13. https://doi.org/10.1038/ni.3398.
[309] Maitra SR, Wojnar MM, Lang CH. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. Shock 2000;13:379–85. https://doi.org/10.1097/00024382-200005000-00006.
[310] Lang CH, Spolarics Z, Ottlakan A, Spitzer JJ. Effect of high-dose endotoxin on glucose production and utilization. Metabolism - Clinical and Experimental 1993;42:1351–8. https://doi.org/10.1016/0026-0495(93)90137-D.
[311] Raetzsch CF, Brooks NL, Alderman JM, Moore KS, Hosick PA, Klebanov S, et al. LPS INHIBITION OF GLUCOSE PRODUCTION THROUGH THE TLR4, MYD88, NFκB PATHWAY. Hepatology 2009;50:592–600. https://doi.org/10.1002/hep.22999.
[312] Caton PW, Nayuni NK, Murch O, Corder R. Endotoxin induced hyperlactatemia and hypoglycemia is linked to decreased mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. Life Sci 2009;84:738–44. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.024.
[313] Deutschman CS, Andrejko KM, Haber BA, Bellin L, Elenko E, Harrison R, et al. Sepsis-induced depression of rat glucose-6-phosphatase gene expression and activity. Am J Physiol 1997;273:R1709-1718. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.5.R1709.
[314] Vandewalle J, Libert C. Sepsis: a failing starvation response. Trends Endocrinol Metab 2022;33:292–304. https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.01.006.
[315] Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. Biochim Biophys Acta 2016;1863:2422–35. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023.
[316] Ahn MY, Seo YJ, Ji SD, Han JW, Hwang JS, Yun EY. Fatty Acid Composition of Adipose Tissues in Obese Mice and SD Rats Fed with Isaria sinclairii Powder. Toxicol Res 2010;26:185–92. https://doi.org/10.5487/TR.2010.26.3.185.
[317] Lee JJ, Lambert JE, Hovhannisyan Y, Ramos-Roman MA, Trombold JR, Wagner DA, et al. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. Am J Clin Nutr 2015;101:34–43. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.092262.
[318] Ampong I, John Ikwuobe O, Brown JEP, Bailey CJ, Gao D, Gutierrez-Merino J, et al. Odd chain fatty acid metabolism in mice after a high fat diet. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2022;143:106135. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106135.
[319] Huang L, Lin J, Aris IM, Yang G, Chen W-Q, Li L-J. Circulating Saturated Fatty Acids and Incident Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients 2019;11:998. https://doi.org/10.3390/nu11050998.
[320] Trieu K, Bhat S, Dai Z, Leander K, Gigante B, Qian F, et al. Biomarkers of dairy fat intake, incident cardiovascular disease, and all-cause mortality: A cohort study, systematic review, and meta-analysis. PLoS Med 2021;18:e1003763. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003763.
[321] Baccouch R, Shi Y, Vernay E, Mathelié-Guinlet M, Taib-Maamar N, Villette S, et al. The impact of lipid polyunsaturation on the physical and mechanical properties of lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 2023;1865:184084. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184084.
[322] Artru F, McPhail MJW, Triantafyllou E, Trovato FM. Lipids in Liver Failure Syndromes: A Focus on Eicosanoids, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and Lysophospholipids. Front Immunol 2022;13:867261. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867261.
[323] Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. Nat Rev Mol Cell Biol 2018;19:281–96. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138.

[324] Halimi F, Vanderhaeghen T, Timmermans S, Croubels S, Libert C, Vandewalle J. Comparative Analysis of Hepatic Gene Expression Profiles in Murine and Porcine Sepsis Models. Int J Mol Sci 2024;25:11079. https://doi.org/10.3390/ijms252011079.
[325] Yuan N, Chen J, Luo F, Fang Z, Huang M, Liu J, et al. Comparison of sepsis-associated acute kidney injury with different degrees and causes reveals patterns in mitochondrial metabolism and immune infiltration changes. Sci Rep 2025;15:22738. https://doi.org/10.1038/s41598-025-08192-y.
[326] Ullah K, Li Y, Lin Q, Pan K, Nguyen T, Aniruddhsingh S, et al. Comparative Analysis of Whole Transcriptome Profiles in Septic Cardiomyopathy: Insights from CLP- and LPS-Induced Mouse Models. Genes 2023;14:1366. https://doi.org/10.3390/genes14071366.
[327] Wasyluk W, Nowicka-Stążka P, Zwolak A. Heart Metabolism in Sepsis-Induced Cardiomyopathy-Unusual Metabolic Dysfunction of the Heart. Int J Environ Res Public Health 2021;18:7598. https://doi.org/10.3390/ijerph18147598.
[328] Standage SW, Bennion BG, Knowles TO, Ledee DR, Portman MA, McGuire JK, et al. PPARα augments heart function and cardiac fatty acid oxidation in early experimental polymicrobial sepsis. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2017;312:H239–49. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00457.2016.
[329] de Montmollin E, Aboab J, Mansart A, Annane D. Bench-to-bedside review: β-Adrenergic modulation in sepsis. Critical Care 2009;13:230. https://doi.org/10.1186/cc8026.
[330] Belfiore J, Taddei R, Biancofiore G. Catecholamines in sepsis: pharmacological insights and clinical applications—a narrative review. J Anesth Analg Crit Care 2025;5:17. https://doi.org/10.1186/s44158-025-00241-2.
[331] Suzuki T, Suzuki Y, Okuda J, Kurazumi T, Suhara T, Ueda T, et al. Sepsis-induced cardiac dysfunction and β-adrenergic blockade therapy for sepsis. Journal of Intensive Care 2017;5:22. https://doi.org/10.1186/s40560-017-0215-2.
[332] John GW, Doxey JC, Walter DS, Reid JL. The role of alpha- and beta-adrenoceptor subtypes in mediating the effects of catecholamines on fasting glucose and insulin concentrations in the rat. Br J Pharmacol 1990;100:699–704. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb14078.x.
[333] Haffner CA, Kendall MJ. Metabolic effects of beta 2-agonists. J Clin Pharm Ther 1992;17:155–64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1992.tb01285.x.
[334] Gonçalves A, Gonçalves Pereira F, Fernandes S, Gonçalves Pereira J. Insights Into the Pathophysiology of Catecholamine-Refractory Shock: A Narrative Review. Cureus n.d.;17:e86224. https://doi.org/10.7759/cureus.86224.
[335] Liepinsh E, Makarova E, Sevostjanovs E, Hartmane D, Cirule H, Zharkova-Malkova O, et al. Carnitine and γ-Butyrobetaine Stimulate Elimination of Meldonium due to Competition for OCTN2-mediated Transport. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2017;120:450–6. https://doi.org/10.1111/bcpt.12729.
[336] Kuwajima M, Harashima H, Hayashi M, Ise S, Sei M, Lu K m, et al. Pharmacokinetic analysis of the cardioprotective effect of 3-(2,2, 2-trimethylhydrazinium) propionate in mice: inhibition of carnitine transport in kidney. J Pharmacol Exp Ther 1999;289:93–102.
[337] Mainali R, Zabalawi M, Long D, Buechler N, Quillen E, Key C-C, et al. Dichloroacetate reverses sepsis-induced hepatic metabolic dysfunction. eLife 2021;10:e64611. https://doi.org/10.7554/eLife.64611.
[338] Oh TS, Zabalawi M, Jain S, Long D, Stacpoole PW, McCall CE, et al. Dichloroacetate improves systemic energy balance and feeding behavior during sepsis. JCI Insight n.d.;7:e153944. https://doi.org/10.1172/jci.insight.153944.
[339] O'Donnell VB. New appreciation for an old pathway: the Lands Cycle moves into new arenas in health and disease. Biochem Soc Trans 2022;50:1–11. https://doi.org/10.1042/BST20210579.
[340] Fougerat A, Bruse J, Polizzi A, Montagner A, Guillou H, Wahli W. Lipid sensing by PPARα: Role in controlling hepatocyte gene regulatory networks and the metabolic response to fasting. Progress in Lipid Research 2024;96:101303. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2024.101303.

[341] Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. Proceedings of the National Academy of Sciences 1997;94:4318–23. https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4318.
[342] Miller TA, LeBrasseur NK, Cote GM, Trucillo MP, Pimentel DR, Ido Y, et al. Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. Biochem Biophys Res Commun 2005;336:309–15. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.088.
[343] Pérez-Martí A, Ramakrishnan S, Li J, Dugourd A, Molenaar MR, De La Motte LR, et al. Reducing lipid bilayer stress by monounsaturated fatty acids protects renal proximal tubules in diabetes. Elife 2022;11:e74391. https://doi.org/10.7554/eLife.74391.
[344] Zadeh Hashem E, Koohi MK, Eslami M, Asadi F, Taleb Zadeh R, Khodadadi M, et al. Ameliorative Role of Palmitoleic Acid on Palmitate Induced Lipotoxicity in the Rat Cardiomyocytes. Iranian Journal of Toxicology 2016;10:45–52. https://doi.org/10.29252/arakmu.10.5.45.
[345] Betz IR, Qaiyumi SJ, Goeritzer M, Thiele A, Brix S, Beyhoff N, et al. Cardioprotective Effects of Palmitoleic Acid (C16:1n7) in a Mouse Model of Catecholamine-Induced Cardiac Damage Are Mediated by PPAR Activation. Int J Mol Sci 2021;22:12695. https://doi.org/10.3390/ijms222312695.
[346] Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol Cell Biol 2000;20:1868–76. https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1868-1876.2000.
[347] Giudice PL, Bonomini M, Arduini A. A Moderate Carnitine Deficiency Exacerbates Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in Rats. Cardiovasc Drugs Ther 2016;30:119–27. https://doi.org/10.1007/s10557-016-6647-4.
[348] Zheng Z, Ma H, Zhang X, Tu F, Wang X, Ha T, et al. Enhanced Glycolytic Metabolism Contributes to Cardiac Dysfunction in Polymicrobial Sepsis. J Infect Dis 2017;215:1396–406. https://doi.org/10.1093/infdis/jix138.
[349] Lv M, Xie D, Long X. The effect of fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor α agonist, on cardiac damage from sepsis in BALB/c mice. Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand) 2022;67:260–6. https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.6.34.
[350] Drosatos K, Drosatos-Tampakaki Z, Khan R, Homma S, Schulze PC, Zannis VI, et al. Inhibition of c-Jun-N-terminal kinase increases cardiac peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and fatty acid oxidation and prevents lipopolysaccharide-induced heart dysfunction. J Biol Chem 2011;286:36331–9. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.272146.
[351] Lin S, Jin P, Shao C, Lu W, Xiang Q, Jiang Z, et al. Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and protects against endotoxemia in mice by suppressing HIF1α-induced glycolysis. International Immunopharmacology 2020;80:106150. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106150.
[352] Zhong W-J, Yang H-H, Guan X-X, Xiong J-B, Sun C-C, Zhang C-Y, et al. Inhibition of glycolysis alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a mouse model. Journal of Cellular Physiology 2019;234:4641–54. https://doi.org/10.1002/jcp.27261.
[353] Li Y, Wang X, Zhao L, Pan B, Xu X, Zhu D. Dehydrocostus Lactone Ameliorates LPS-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting PFKFB3-Mediated Glycolysis. Journal of Cellular Biochemistry 2024;125:e30639. https://doi.org/10.1002/jcb.30639.
[354] Pan S, Lv Z, Wang R, Shu H, Yuan S, Yu Y, et al. Sepsis-Induced Brain Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Oxid Med Cell Longev 2022;2022:1328729. https://doi.org/10.1155/2022/1328729.
[355] Qin M, Gao Y, Guo S, Lu X, Zhao Q, Ge Z, et al. Establishment and evaluation of animal models of sepsis-associated encephalopathy. World J Emerg Med 2023;14:349–53. https://doi.org/10.5847/wjem.j.1920-8642.2023.088.
[356] Zhang H, Xu J, Wu Q, Fang H, Shao X, Ouyang X, et al. Gut Microbiota Mediates the Susceptibility of Mice to Sepsis-Associated Encephalopathy by Butyric Acid. J Inflamm Res 2022;15:2103–19. https://doi.org/10.2147/JIR.S350566.

[357] Bauhofer A, Ho Y-J, Schmitt A, Köster M, Schwarting RKW, Pawlak CR. Individual behavioral differences in recovery from abdominal sepsis in rats. Inflamm Res 2009;58:248–56. https://doi.org/10.1007/s00011-008-8223-2.
[358] Catarina AV, Branchini G, Bettoni L, De Oliveira JR, Nunes FB. Sepsis-Associated Encephalopathy: from Pathophysiology to Progress in Experimental Studies. Mol Neurobiol 2021;58:2770–9. https://doi.org/10.1007/s12035-021-02303-2.
[359] Sharshar T, Gray F, Poron F, Raphael JC, Gajdos P, Annane D. Multifocal necrotizing leukoencephalopathy in septic shock. Crit Care Med 2002;30:2371–5. https://doi.org/10.1097/00003246-200210000-00031.
[360] Zhao Y, Jiang Y, Shen Y, Su L-D. Sepsis Impairs Purkinje Cell Functions and Motor Behaviors Through Microglia Activation. Cerebellum 2024;23:329–39. https://doi.org/10.1007/s12311-023-01531-7.
[361] Mitchell RA, Berger AJ. Neural regulation of respiration. Am Rev Respir Dis 1975;111:206–24. https://doi.org/10.1164/arrd.1975.111.2.206.
[362] Wang SC, Chai CY. Central control of sympathetic cardio-acceleration in medulla oblongata of the cat. Am J Physiol 1962;202:31–4. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1962.202.1.31.
[363] Rosen A. Augmentation of cardiac contractile force and heart rate by medulla oblongata stimulation in the cat. Acta Physiol Scand 1961;53:255–69. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1961.tb02284.x.
[364] Liu X, Zhang C, Li H. Neuroinflammation in the medullary visceral zone exert a powerful impaction on the systemic inflammation in sepsis through cholinergic anti-inflammatory pathway. Sci Rep 2024;14:16921. https://doi.org/10.1038/s41598-024-67531-7.
[365] Heming N, Mazeraud A, Verdonk F, Bozza FA, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. Crit Care 2017;21:65. https://doi.org/10.1186/s13054-017-1643-z.
[366] Huang P, Chen X, Hu X, Zhou Q, Lin L, Jiang S, et al. Experimentally Induced Sepsis Causes Extensive Hypomyelination in the Prefrontal Cortex and Hippocampus in Neonatal Rats. Neuromolecular Med 2020;22:420–36. https://doi.org/10.1007/s12017-020-08602-6.
[367] Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Dominguini D, Ferreira GK, et al. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. Synapse 2013;67:786–93. https://doi.org/10.1002/syn.21686.
[368] Danielski LG, Giustina AD, Badawy M, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, et al. Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. Mol Neurobiol 2018;55:1045–53. https://doi.org/10.1007/s12035-016-0356-7.
[369] Pfister D, Siegemund M, Dell-Kuster S, Smielewski P, Rüegg S, Strebel SP, et al. Cerebral perfusion in sepsis-associated delirium. Crit Care 2008;12:R63. https://doi.org/10.1186/cc6891.
[370] Olivieri R, Michels M, Pescador B, Ávila P, Abatti M, Cucker L, et al. The additive effect of aging on sepsis-induced cognitive impairment and neuroinflammation. J Neuroimmunol 2018;314:1–7. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.11.014.
[371] Tian M, Qingzhen L, Zhiyang Y, Chunlong C, Jiao D, Zhang L, et al. Attractylone attenuates sepsis-associated encephalopathy and cognitive dysfunction by inhibiting microglial activation and neuroinflammation. J Cell Biochem 2019;120:7101–8. https://doi.org/10.1002/jcb.27983.
[372] Aslankoc R, Savran M, Ozmen O, Asci S. Hippocampus and cerebellum damage in sepsis induced by lipopolysaccharide in aged rats - Pregabalin can prevent damage. Biomed Pharmacother 2018;108:1384–92. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.162.
[373] Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. J Neuroinflammation 2019;16:180. https://doi.org/10.1186/s12974-019-1564-7.
[374] Kirk RA, Kesner RP, Wang L-M, Wu Q, Towner RA, Hoffman JM, et al. Lipopolysaccharide exposure in a rat sepsis model results in hippocampal amyloid-β plaque and phosphorylated tau deposition and corresponding behavioral deficits. Geroscience 2019;41:467–81. https://doi.org/10.1007/s11357-019-00089-9.
[375] Kuperberg SJ, Wadgaonkar R. Sepsis-Associated Encephalopathy: The Blood-Brain Barrier and the Sphingolipid Rheostat. Front Immunol 2017;8:597. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00597.

[376] Sekino N, Selim M, Shehadah A. Sepsis-associated brain injury: underlying mechanisms and potential therapeutic strategies for acute and long-term cognitive impairments. J Neuroinflammation 2022;19:101. https://doi.org/10.1186/s12974-022-02464-4.
[377] Trabjerg MS, Mørkholt AS, Lichota J, Oklinski MKE, Andersen DC, Jønsson K, et al. Dysregulation of metabolic pathways by carnitine palmitoyl-transferase 1 plays a key role in central nervous system disorders: experimental evidence based on animal models. Sci Rep 2020;10:15583. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72638-8.
[378] Shaforostova EA, Gureev AP, Vitkalova IY, Popov VN. [The effect of L-carnitine depletion induced by long-term therapy of mice with meldonium on brain mitochondrial balance]. Biomed Khim 2021;67:74–80. https://doi.org/10.18097/PBMC20216701074.
[379] Szrok-Jurga S, Turyn J, Hebanowska A, Swierczynski J, Czumaj A, Sledzinski T, et al. The Role of Acyl-CoA β-Oxidation in Brain Metabolism and Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci 2023;24:13977. https://doi.org/10.3390/ijms241813977.
[380] Leonidovna KI. INFLUENCE OF NEUROPROTECTORY DRUGS ON POST-TRAUMATIC ENCEPHALOPATHY. International Journal of Cognitive Neuroscience and Psychology 2024;2:103–8.
[381] Miliaraki M, Briassoulis P, Ilia S, Michalakakou K, Karakonstantakis T, Polonifi A, et al. Oxidant/Antioxidant Status Is Impaired in Sepsis and Is Related to Anti-Apoptotic, Inflammatory, and Innate Immunity Alterations. Antioxidants (Basel) 2022;11:231. https://doi.org/10.3390/antiox11020231.
[382] Hsiao S-Y, Kung C-T, Su C-M, Lai Y-R, Huang C-C, Tsai N-W, et al. Impact of oxidative stress on treatment outcomes in adult patients with sepsis: A prospective study. Medicine (Baltimore) 2020;99:e20872. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000020872.
[383] Lorente L, Martín MM, González-Rivero AF, Pérez-Cejas A, Abreu-González P, Ortiz-López R, et al. Association between DNA and RNA oxidative damage and mortality in septic patients. J Crit Care 2019;54:94–8. https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2019.08.008.
[384] Wang H, Xu L, Tang X, Jiang Z, Feng X. Lipid peroxidation-induced ferroptosis as a therapeutic target for mitigating neuronal injury and inflammation in sepsis-associated encephalopathy: insights into the hippocampal PEBP-1/15-LOX/GPX4 pathway. Lipids Health Dis 2024;23:128. https://doi.org/10.1186/s12944-024-02116-x.
[385] Guo Q, Gobbo D, Zhao N, Zhang H, Awuku N-O, Liu Q, et al. Adenosine triggers early astrocyte reactivity that provokes microglial responses and drives the pathogenesis of sepsis-associated encephalopathy in mice. Nat Commun 2024;15:6340. https://doi.org/10.1038/s41467-024-50466-y.
[386] Abd El-Gawad HM, Khalifa AE. Quercetin, coenzyme Q10, and L-canavanine as protective agents against lipid peroxidation and nitric oxide generation in endotoxin-induced shock in rat brain. Pharmacol Res 2001;43:257–63. https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0781.
[387] Pereira de Souza Goldim M, Della Giustina A, Mathias K, de Oliveira Junior A, Fileti ME, De Carli R, et al. Sickness Behavior Score Is Associated with Neuroinflammation and Late Behavioral Changes in Polymicrobial Sepsis Animal Model. Inflammation 2020;43:1019–34. https://doi.org/10.1007/s10753-020-01187-z.
[388] Comim CM, Cassol OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, et al. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. Neurochem Res 2011;36:304–11. https://doi.org/10.1007/s11064-010-0320-2.
[389] Pandya JD, Valdez M, Royland JE, MacPhail RC, Sullivan PG, Kodavanti PRS. Age- and Organ-Specific Differences in Mitochondrial Bioenergetics in Brown Norway Rats. J Aging Res 2020;2020:7232614. https://doi.org/10.1155/2020/7232614.
[390] Suslina ZA, Fedorova TN, Maksimova MI, Kim EK. [Antioxidant activity of mildronate and L-carnitine in the treatment of patients with cerebrovascular diseases]. Eksp Klin Farmakol 2003;66:32–5.
[391] Yang W, Lei X, Liu F, Sui X, Yang Y, Xiao Z, et al. Meldonium, as a potential neuroprotective agent, promotes neuronal survival by protecting mitochondria in cerebral ischemia-reperfusion injury. J Transl Med 2024;22:771. https://doi.org/10.1186/s12967-024-05222-7.

[392] Silverman HA, Dancho M, Regnier-Golanov A, Nasim M, Ochani M, Olofsson PS, et al. Brain Region-Specific Alterations in the Gene Expression of Cytokines, Immune Cell Markers and Cholinergic System Components during Peripheral Endotoxin-Induced Inflammation. Mol Med 2014;20:601–11. https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00147.

[393] Kim W-G, Mohney RP, Wilson B, Jeohn G-H, Liu B, Hong J-S. Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia. J Neurosci 2000;20:6309–16. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06309.2000.

[394] Ledderose C, Bao Y, Kondo Y, Fakhari M, Slubowski C, Zhang J, et al. Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review. Clin Ther 2016;38:1054–65. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.04.002.

[395] Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri K-C, Eltzschig HK. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. FASEB J 2009;23:473–82. https://doi.org/10.1096/fj.08-119701.

[396] Haskó G, Csóka B, Koscsó B, Chandra R, Pacher P, Thompson LF, et al. Ecto-5′-nucleotidase (CD73) decreases mortality and organ injury in sepsis. J Immunol 2011;187:4256–67. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003379.

[397] Di Virgilio F, Ceruti S, Bramanti P, Abbracchio MP. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. Trends Neurosci 2009;32:79–87. https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.003.

[398] Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA. The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. J Neurosci 2009;29:3781–91. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5512-08.2009.

[399] Savio LEB, Andrade MGJ, de Andrade Mello P, Santana PT, Moreira-Souza ACA, Kolling J, et al. P2X7 Receptor Signaling Contributes to Sepsis-Associated Brain Dysfunction. Mol Neurobiol 2017;54:6459–70. https://doi.org/10.1007/s12035-016-0168-9.

[400] Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochem J 1992;285:345–65. https://doi.org/10.1042/bj2850345.

[401] Zhang T, Yu-Jing L, Ma T. The immunomodulatory function of adenosine in sepsis. Front Immunol 2022;13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.936547.

[402] Smith MD, Bhatt DP, Geiger JD, Rosenberger TA. Acetate supplementation modulates brain adenosine metabolizing enzymes and adenosine A2A receptor levels in rats subjected to neuroinflammation. J Neuroinflammation 2014;11:99. https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-99.

[403] Miron VV, Assmann CE, Mostardeiro VB, Bottari NB, Baldissarelli J, Reichert KP, et al. Resistance physical exercise alleviates lipopolysaccharide-triggered neuroinflammation in cortex and hippocampus of rats via purinergic signaling. Neurotoxicology 2023;99:217–25. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.10.011.

[404] Gao J, Chen S, Kong T, Wen D, Yang Q. The relationship between soluble CD73 and the incidence of septic shock in severe sepsis patients: a cross-sectional analysis of data from a prospective FINNAKI study. Ann Transl Med 2022;10:302. https://doi.org/10.21037/atm-22-371.

[405] Xiang F, Zhang Z, Nie Y, Cao X, Li Y, Chen X, et al. Altered CD73-Adenosine Signaling Linked to Infection in Patients undergoing hemodialysis. J Inflamm Res 2025;18:1267–79. https://doi.org/10.2147/JIR.S498575.

PRILOZI

Biografija autora

Aleksandra (Aco) Ružičić rođena je 29. decembra 1995. godine u Kotoru, Crna Gora. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu, a 2014. godine je upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,95. Iste godine upisala je master akademske studije na Biološkom fakultetu, modul Eksperimentalna biomedicina, koje je završila sa prosečnom ocenom 10 i odbranom master rada „Uticaj ishrane obogaćene mastima na ekspresiju NADPH oksidaza u hipotalamusu pacova“.

Godine 2019. upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu, modul Animalna i humana fiziologija. U novembru 2019. godine zaposlena je na Katedri za fiziologiju životinja i čoveka Biološkog fakulteta u Beogradu u zvanju istraživača-pripravnika. Na istoj katedri je 2021. godine izabrana u zvanje asistenta, u koje je reizabrana 2023. godine. Kao stipendista DAAD fondacije i u okviru bilateralne saradnje sa Nemačkom i dijasporom, u dva navrata je tokom 2020. i 2022. godine bila na usavršavanju u Minhenu. Aktivno učestvuje u realizaciji praktične nastave na osnovnim akademskim studijama na kursevima Fiziologija životinja i Endokrinologija, kao i u izvođenju praktične nastave na master akademskim studijama, na kursu Eksperimentalna fiziologija životinja i čoveka.

Aleksandra je autor ili koautor ukupno deset publikacija u međunarodnim časopisima: jednog rada u časopisu kategorije M21a, šest radova u časopisima kategorije M21 i tri rada u časopisima kategorije M22. Na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima učestvovala je kao autor i koautor ukupno petnaest saopštenja. Govori italijanski i engleski jezik.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Ружичић

Број индекса Б3009/2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Ефекти претретмана мелдонијумом на липополисахаридом и фецесом индуковану сепсу код пацова“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____ _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Ружичић

Број индекса Б3009/2019

Студијски програм Биологија – Анимална и хумана физиологија

Наслов рада **„Ефекти претретмана мелдонијумом на липополисахаридом и фецесом индуковану сепсу код пацова“**

Ментор др Ива Лакић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет, Институт за физиологију и биохемију „Иван Ђаја“

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**. Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____ _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„ Ефекти претретмана мелдонијумом на липополисахаридом и фецесом индуковану сепсу код пацова “

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе 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 прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве)

Потпис аутора

У Београду, _____ _____

1. **Ауторство.** Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.