

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Bojan Jorgačević

**ULOGA KANABINOIDNIH CB1 RECEPTORA U
PATOGENEZI NEALKOHOLNE MASNE BOLESTI
JETRE IZAZVANE DIJETOM BOGATOM MASTIMA
KOD MIŠEVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dr Bojan Jorgačević

**THE ROLE OF CANNABINOID CB1 RECEPTORS IN
PATHOGENESIS OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER
DISEASE INDUCED BY HIGH FAT DIET IN MICE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

Mentor doktorske disertacije: Prof. dr DANIJELA VUČEVIĆ, vanrednini profesor na Institutu za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. **Prof. dr TATJANA RADOSAVLJEVIĆ** (predsednik), redovni profesor na Institutu za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr RADA JEŠIĆ VUKIĆEVIĆ**, redovni profesor na Institutu za digestivne bolesti, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr SNEŽANA ŽIVANČEVIĆ SIMONOVIĆ**, redovni profesor na Institutu za patološku fiziologiju, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, velikom čoveku i prijatelju Prof. dr Danijeli Vučević na nesebičnoj stručnoj pomoći, podršci, entuzijazmu i optimizmu kojim obasjava moj naučnoistraživački put

Podjednako veliku zahvalnost dugujem i Prof. dr Tatjani Radosavljević, koja mi je omogućila da uđem u svet nauke i obavim istraživanje iz koga je i proistekla ova doktorska disertacija

ULOGA KANABINOIDNIH CB1 RECEPTORA U PATOGENEZI NEALKOHOLNE MASNE BOLESTI JETRE IZAZVANE DIJETOM BOGATOM MASTIMA KOD MIŠEVA

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) obuhvata širok spektar bolesti jetre, od inicijalne steatoze do steatohepatitisa, koji može dalje da progredira do fibroze i ciroze jetre, uz mogućnost razvoja hepatocelularnog karcinoma. Ključnu ulogu u patogenezi NAFLD, na samom početku, ima insulinska rezistencija (IR) u masnom tkivu, koja povećava lipolizu i dopremanje masnih kiselina (MK) u jetru, a takođe utiče i na porast *de novo* sinteze MK u hepatocitima. Tako, najpre dolazi do razvoja steatoze, koja povećava osetljivost hepatocita na oštećenje dejstvom faktora aktivacije inflamatorne kaskade i fibrogeneze, dovodeći do dalje progresije bolesti u steatohepatitis i fibrozu jetre. Među ovim faktorima najznačajniji su oksidativni/nitrozativni stres, mitohondrijalna disfunkcija, lipotoksičnost, proinflamatorni citokini, kao i disbalans produkcije adipokina. Dosadašnja eksperimentalna i klinička istraživanja ukazala su na značajnu ulogu endokanabinoidnog sistema (ES) u razvoju NAFLD. U našoj studiji korišćena je dijeta bogata mastima (HFD, engl. *high fat diet*), koja izaziva strukturne, funkcionalne i metaboličke promene u jetri miševa slične ispoljavanjima NAFLD i metaboličkog sindroma u ljudi (porast nivoa oksidativnog i nitrozativnog stresa u hepatocitima, razvoj dislipidemije, IR, hepatske steatoze, inflamacije i fibroze).

Ciljevi ove disertacije su bili: da se ispita uloga kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi NAFLD sa posebnim osvrtom na ulogu u razvoju oksidativnog/nitrozativnog stresa, uticaj na kapacitet antioksidativne zaštite, kao i koncentraciju Zn, Cu, Mn i Fe u tkivu jetre; da se ispita uticaj CB1 receptora na lipidni status, profil MK u jetri (palmitinska, stearinska, oleinska, linoleinska i arahidonska kiselina), kao i adipokine (leptin, apelin, rezistin i visfatin) i proinflamatorne citokine (IL-6 i IFN- γ) u masnom tkivu i jetri; da se ispita uticaj blokade CB1 receptora na glikemiju, koncentraciju insulina i HOMA indeks.

NAFLD je izazvana mužjacima miševa C57BL/6 soja, uzrasta 8 nedelja, primenom HFD. Pre samog eksperimenta sve životinje (n=40) bile su hranjene kontrolnom dijetom. Nakon 8 nedelja životinje su podeljene na sledeće grupe: 1. kontrolna grupa hranjena kontrolnom dijetom u toku 20 nedelja (C; n=10); 2. grupa

hranjena HFD u periodu od devete do dvadesete nedelje (HF; n=10); 3. grupa hranjena kontrolnom dijetom u toku 20 nedelja i tretirana rimonabantom (R; n=10); 4. grupa hranjena HFD od devete do dvadesete nedelje i tretirana rimonabantom (HFR; n=10). Dnevne doze rimonabanta (10 mg/kg) bile su administrirane HFR i R grupi orogastričnom sondom svakodnevno u toku poslednje dve nedelje. Nakon dvadesete nedelje životinje su bile žrtvovane. U krvi je određena aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST), lipidni status, glikemija i koncentracija insulina. Uzorci jetre korišćeni su za patohistološku verifikaciju NAFLD, određivanje profila MK, koncentracije Zn, Cu, Mn i Fe, kao i za određivanje parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa (malondialdehida /MDA/ i nitrita + nitrata /NOx/) i antioksidativne zaštite (redukovani glutation /GSH/, mangan superoksid dismutaze /MnSOD/, bakar/cink superoksid dismutaze /Cu/ZnSOD/) spektrofotometrijski. Epididimalno i ingvinalno masno tkivo je hirurški uklonjeno i potom korišćeno za određivanje adipokina (apelin, leptin, visfatin i rezistin), proinflamatornih citokina (IL-6, IFN- γ) ELISA metodom.

Rezultati naše studije su pokazali da je aktivnost AST i ALT u serumu bila značajno viša u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Tretman rimonabantom doveo je do značajnog sniženja aktivnosti AST i ALT u R grupi, kao i u HFR grupi u poređenju sa C and HF grupom ($p < 0.01$). Primena HFD dovela je do pojave umerene steatoze sa portalnim inflamatornim infiltratom i fokalnim nekrotičnim promenama u parenhimu. Nasuprot tome, HFR grupa nije razvila inflamatorni infiltrat i fokalne nekrotične promene, već samo umerenu steatozu. Dnevni unos hrane bio značajno niži u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Tretman rimonabantom doveo je do značajnog smanjenja dnevnog unosa hrane u HFR grupi u toku 19. i 20. nedelje u poređenju sa prvih 18 nedelja ($p < 0.05$).

Koncentracija MDA i NOx u jetri bila je povećana u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). S druge strane, rimonabant je indukovao smanjenje koncentracije MDA i NOx u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Aktivnost ukupne SOD bila je povećana u HF grupi u poređenju sa C grupom ($p < 0.01$), dok je njena aktivnost bila snižena u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Aktivnosti MnSOD i Cu/ZnSOD pratile su promene ukupne SOD. Koncentracija GSH bila je snižena u HF

grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Međutim, uočeno je povećanje koncentracije GSH u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Koncentracija Zn bila je značajno snižena u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Međutim, primena rimonabanta dovela je do porasta njegove koncentracije u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Primena HFD dovela je do porasta koncentracije Fe u jetri u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$), dok je rimonabant doveo do smanjenja njegove koncentracije u HFR grupi ($p < 0.01$). Koncentracije Cu i Mn u HF grupi bile su značajno povećane u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Značajan porast koncentracije Cu i Mn uočen je u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$).

Koncentracija ukupnog holesterola, HDL i LDL frakcije u plazmi bila je povećana u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Primena rimonabanta dovela je do porasta koncentracije ukupnog holesterola i HDL u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Sa druge strane, koncentracija LDL holesterola bila je značajno niža u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Primena rimonabanta izazvala je sniženje proporcije palmitinske i oleinske kiseline u HFR grupi u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$). Uočen je porast proporcije palmitinske i oleinske kiseline u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Proporcija stearinske kiseline bila je viša u HF grupi u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$). Proporcija linoleinske kiseline bila je povišena u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Značajno povećanje proporcije linoleinske kiseline uočeno je u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p > 0.01$). Proporcija arahidonske kiseline bila je niža u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Nasuprot tome, rimonabant je doveo do porasta proporcije arahidonske kiseline u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$).

Glikemija, koncentracija insulina u plazmi, kao i HOMA-IR indeks bili su povišeni u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Primena rimonabanta dovela je do sniženja koncentracije glukoze, insulina i HOMA-IR indeksa u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Koncentracija leptina, apelina, visfatina i rezistina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu bila je veća u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Primena rimonabanta dovela je do sniženja koncentracije svih adipokina u potkožnom i visceralnom masnom tkivu u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$).

Naša studija je pokazala da je koncentracija IL-6 i IFN- γ u supkutanom i visceralnom masnom tkivu bila značajno viša u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Sa druge strane, tretman rimonabantom izazvao je značajno smanjenje koncentracije IL-6 i IFN- γ u oba masna tkiva u HFR grupi u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Analiza koncentracije citokina u tkivu jetre pokazala je da je HFD dovela do značajnog porasta koncentracije IL-6 i IFN- γ u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$). Nivo oba citokina u jetri bio je značajno niži u HFR grupi u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$).

Naši rezultati ukazuju na prooksidantni efekat endokanabinoida, što je i potvrđeno smanjenjem intenziteta lipidne peroksidacije u grupama životinja koje se bile na kontrolnoj ishrani i HFD nakon tretmana rimonabantom. Moguće objašnjenje za ovakav rezultat odnosi se na antiinflamatorne i citoprotektivne efekte koji nastaju usled inhibicije CB1 receptora. Usled blokade CB1 receptora došlo je do smanjenja glikemije, insulinemije i HOMA-IR indeksa. Time se zapravo potvrđuje da endokanabinoidi preko CB1 receptora vrše negativnu modulaciju insulin-zavisnog preuzimanja glukoze. Osim toga, blokada CB1 receptora dovodi do normalizacije profila adipokina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu, kao i smanjenja produkcije proinflamatornih citokina, kako u jetri, tako i u masnom tkivu. Takođe, primena rimonabanta dovela je do značajnog smanjenja inflamatornog odgovora u tkivu jetre, poboljšavajući patohistološke promene i smanjujući koncentraciju IL-6 i IFN- γ u jetri. Utičući na smanjenje niskostepene inflamacije, blokada CB1 receptora mogla bi da ima značajnu ulogu u poboljšanju IR i normalizaciji glikemije uočenih u ovoj studiji. Naši rezultati ukazuju na potencijalnu korist blokade CB1 receptora u tretmanu HFD-indukovane NAFLD i to usled modulacije lipidnog profila, profila MK u jetri, kao i smanjenja oksidativnog/nitrozativnog stresa i poboljšanja patohistoloških promena u jetri.

Ključne reči: nealkoholna masna bolest jetre, endokanabinoidni sistem, rimonabant, oksidativni/nitrozativni stres, profil masnih kiselina, adipokini, proinflamatorni citokini

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj:

THE ROLE OF CANNABINOID CB1 RECEPTORS IN THE PATHOGENESIS OF NON ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE CAUSED BY HIGH-FAT DIET IN MICE

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses a wide range of liver diseases from initial steatosis to steatohepatitis, which may further progress to liver fibrosis or cirrhosis and potentially develop hepatocellular carcinoma. At the very beginning, insulin resistance (IR) in adipose tissue has the key role in the NAFLD pathogenesis, increasing lipolysis and supply of fatty acids (FA) to liver and also affecting the increase of *de novo* synthesis of FA in hepatocytes. In this manner steatosis occurs first, increasing the sensitivity to the damage occurred due to the factors which activate inflammatory cascade and fibrogenesis and lead to further progression of the disease towards steatohepatitis and liver fibrosis. The most significant among these factors are oxidative/nitrosative stress, mitochondrial dysfunction, lipotoxicity, proinflammatory cytokines, as well as the adipokine production imbalance. Previous experimental and clinical research has emphasized the considerable role of the endocannabinoid system (ECS) in the development of NAFLD. In our study we used high fat diet (HFD) which causes structural, functional and metabolic changes in mouse liver similar to the manifestations of NAFLD and metabolic syndrome in humans (increased level of oxidative and nitrosative stress in hepatocytes, development of dyslipidemia, IR, hepatic steatosis, inflammation and fibrosis).

The goals of this thesis were: to test the role of cannabinoid CB1 receptors in the pathogenesis of NAFLD with particular overview of their role in the development of oxidative/nitrosative stress, impact on the capacity of antioxidative protection, as well as Zn, Cu, Mn and Fe concentrations in liver tissue; to test the impact of CB1 receptors on the lipid profile, FA profile in liver (palmitic, stearic, oleic, linoleic and arachidonic), as well as adipokines (leptin, apelin, resistin and visfatin) and proinflammatory cytokines (IL-6 and IFN- γ) in adipose tissue and liver; to test the impact of blocking CB1 receptors on glycemia, insulin concentration and HOMA-IR index.

HFD was applied on 8 weeks old male mice of C57BL/6 strain, which caused NAFLD to occur. Before the very experiment all the animals (n=40) were fed a control diet. After 8 weeks the animals were divided into the following groups: 1. a control

group fed the control diet for 20 weeks (C; n=10); 2. a group fed a HFD in the period between week 9 and week 20 (HF; n=10); 3. a group fed the control diet for 20 weeks and treated with rimonabant (R; n=10); 4. a group fed the HFD in the period between week 9 and week 20 and treated with rimonabant (HFR; n=10). Daily doses of rimonabant (10 mg/kg) were administered to the HFR and R groups by means of an orogastric tube on a daily basis for the last two weeks. After week 20 the animals were sacrificed. The blood tests showed a certain activity of alanine-aminotransferase (ALT) and aspartate-aminotransferase (AST), lipid profile, glycemia and insulin concentration. Liver samples were used for the histopathological verification of NAFLD, FA profile determination, Zn, Cu, Mn and Fe concentrations, as well as for the determination of oxidative/nitrosative stress parameters (malondialdehydes /MDA/ and nitrites + nitrates /NO_x/) and antioxidative protection (reduced glutathione /GSH/, manganese superoxide dismutase /MnSOD/, copper/zinc superoxide dismutase /Cu/ZnSOD/) by means of spectrophotometric method. Epididymal and inguinal adipose tissue was surgically removed and then used to determine adipokines (apelin, leptin, visfatin and resistin) and proinflammatory cytokines (IL-6, IFN- γ) by means of ELISA method.

The results of our study showed that the activity of AST and ALT in the serum was significantly higher in the HF group as compared to the control group ($p < 0.01$). The rimonabant treatment led to a considerably reduced activity of AST and ALT in the R and HFR groups as compared to the C and HF groups ($p < 0.01$). HFD application led to moderate steatosis with portal inflammatory infiltrate and focal necrotic changes in the parenchyma. Conversely, the HFR group did not develop inflammatory infiltrate or focal necrotic changes, only moderate steatosis. The daily intake of food was significantly lower in the HF group in comparison to the control group ($p < 0.01$). The rimonabant treatment caused a considerable reduction of the daily food intake in the HFR group during weeks 19 and 20 as compared to the first 18 weeks ($p < 0.05$).

MDA and NO_x concentrations in liver were increased in the HF group as compared to the control group ($p < 0.05$). On the other hand, rimonabant induced the reduction in MDA and NO_x concentrations in the HFR group as compared to the HF group ($p < 0.01$). Total SOD activity was increased in the HF group in comparison to the C group ($p < 0.01$), while its activity was reduced in the HFR group as compared to the HF

group ($p < 0.01$). The activity of MnSOD and Cu/ZnSOD followed the changes of the total SOD. GSH concentration was lower in the HF group as compared to the control group ($p < 0.01$). However, there was an increased concentration of GSH in the HFR group compared to the HF group ($p < 0.01$). Zn concentration was substantially lower in the HF group compared to the control group ($p < 0.05$). However, the rimonabant application led to its increase in the HFR group compared to the HF group ($p < 0.01$). HFD application led to the increase of Fe concentration in liver with regards to the HF group ($p < 0.01$), whereas rimonabant led to its reduction compared to the HFR group ($p < 0.01$). Cu and Mn concentrations in the HF group were largely increased as compared to the control group ($p < 0.01$). A significant increase of Cu and Mn concentrations was observed in the HFR group as compared to the HF group ($p < 0.01$).

The concentration of total cholesterol, HDL and LDL fractions, in the plasma was increased in the HF group compared to the control group ($p < 0.01$). The rimonabant application led to the increase of total cholesterol and HDL in the HFR group compared to the HF group ($p < 0.01$). On the other hand, LDL cholesterol concentration was significantly lower in the HFR group than the HF group ($p < 0.01$). The rimonabant application caused the reduction of palmitic and oleic acids ratio in the HFR group as compared to the HF group ($p < 0.01$). It was observed that palmitic and oleic acids ratio was higher in the HF group than the control group ($p < 0.05$). Stearic acid ratio was higher in the HF group than the control group ($p < 0.01$). Linoleic acid ratio was higher in the HF group than the control group ($p < 0.05$). Considerable increase of linoleic acid ratio was observed in the HFR group as compared to the HF group ($p > 0.01$). Arachidonic acid ratio was lower in the HF group than the control group ($p < 0.01$). Conversely, rimonabant led to the increased ratio of arachidonic acid in the HFR group as compared to the HF group ($p < 0.01$).

Glycemia, insulin concentration in the plasma and HOMA-IR index were elevated in the HF group in comparison to the control group ($p < 0.01$). The rimonabant application led to the reduction of the concentration of glucose, insulin and HOMA-IR index in the HFR group as compared to the HF group ($p < 0.01$). Leptin, apelin, visfatin and resistin concentrations in the subcutaneous and visceral adipose tissue were higher in the HF group than the control group ($p < 0.01$). The rimonabant application led to the

lowered concentrations of all adipokines in the subcutaneous and visceral adipose tissue in the HFR group as compared to the HF group ($p < 0.01$).

Our study showed that the concentrations of IL-6 and IFN- γ in the subcutaneous and visceral adipose tissue were substantially higher in the HF group than the control group ($p < 0.01$). On the other hand, the rimonabant treatment caused a significant reduction of IL-6 and IFN- γ concentrations in both adipose tissues in the HFR group as compared to the HF group ($p < 0.01$). The analysis of cytokine concentration in liver tissue showed that the HFD led to the significantly increased IL-6 and IFN- γ concentrations as compared to the control group ($p < 0.01$). The level of both cytokines in liver was much lower in the HFR group than the HF group ($p < 0.01$).

Our results indicate the prooxidant effect of endocannabinoids, which was confirmed by the lowered intensity of lipid peroxidation in the groups of animals which were fed the control diet and HFD after rimonabant treatment. This result can be explained by antiinflammatory and cytoprotective effects which occur due to CB1 receptor inhibition. CB1 receptor blocking resulted in the reduction of glycemia, insulinemia and HOMA-IR index. This, in fact, confirms that endocannabinoids perform negative modulation of insulin-dependent glucose uptake via their CB1 receptors. Apart from this, CB1 receptor blocking leads to normalized adipokine profile in the subcutaneous and visceral adipose tissue and reduced production of proinflammatory cytokines both in liver and adipose tissue. Also, the rimonabant application caused a substantial reduction of inflammatory response in liver tissue, enhancing the histopathological changes and lowering IL-6 and IFN- γ concentrations in liver. By affecting the reduction of the low grade inflammation, CB1 receptor blocking may play a significant role in IR improvement and normalization of glycemia observed in this study. Our results show a potential advantage of blocking CB1 receptors in the treatment of HFD-induced NAFLD due to the modulation of lipid status, FA profile in liver, as well as reduction of oxidative/nitrosative stress and enhancement of pathohistological liver changes.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease, endocannabinoid system, rimonabant, oxidative/nitrosative stress, fatty acid profile, adipokines, proinflammatory cytokines

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Physiological sciences

UDK number:

SADRŽAJ

I	UVOD	1
1.1.	Pojam nealkoholne masne bolesti jetre	1
1.2.	Patohistološke karakteristike NAFLD	6
1.3.	Dijagnoza i kliničke manifestacije NAFLD	13
1.4.	Epidemiološke karakteristike NAFLD	17
1.5.	Patogeneza NAFLD	23
1.5.1.	Uloga insulinske rezitencije u patogenezi NAFLD-a	24
1.5.2.	Mehanizam akumulacije TG u hepatocitima	26
1.5.3.	Uloga masnih kiselina i lipotoksičnosti	30
1.5.4.	Uloga ceramida	33
1.5.5.	Uloga oksidativnog / nitrozativnog stresa i mitohondrijalne disfunkcije	35
1.5.6.	Mehanizmi progresije steatoze u steatohepatitis	40
1.5.7.	Uloga masnog tkiva, proinflamatornih citokina i adipokina u progresiji NAFLD	41
1.5.8.	Mehanizmi progresije NASH u fibrozu i cirozu jetre	47
1.6.	Opšte karakteristike i uloga endokanabinoidnog sistema u razvoju NAFLD	48
1.7.	Eksperimentalni modeli NAFLD	53
1.8.	Uticaj rimonabanta na patogenezu i progresiju NAFLD	55
II	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	57
III	MATERIJAL I METODE	58
3.1.	Eksperimentalne životinje	58
3.2.	Eksperimentalni dizajn	58
3.3.	Biohemijske analize	60
3.4.	Statistička analiza	63

IV	REZULTATI	64
4.1.	Uticaj rimonabanta na parametre hepatocelularnog oštećenja	64
4.2.	Uticaj rimonabanta na patohistološke promene u jetri	65
4.3.	Uticaj rimonabanta na odnos težine jetre i telesne težine	66
4.4.	Uticaj rimonabanta na dnevni unos hrane	67
4.5.	Uticaj rimonabanta na parametre oksidativnog/nitrozativnog stresa u jetri	68
4.6.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju oligoelemenata u jetri	71
4.7.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju triglicerida u plazmi	73
4.8.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju holesterola u plazmi	73
4.9.	Uticaj rimonabanta na težinu supkutanog i visceralnog masnog tkiva	75
4.10.	Uticaj rimonabanta na proporciju masnih kiselina u jetri	76
4.11.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju glukoze u plazmi	78
4.12.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju insulina u plazmi	79
4.13.	Uticaj rimonabanta na HOMA-IR indeks	80
4.14.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju leptina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu	81
4.15.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju rezistina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu	81
4.16.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju apelina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu	82
4.17.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju visfatina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu	82
4.18.	Uticaj rimonabanta na koncentraciju IL-6 u supkutanom i visceralnom masnom tkivu	83

4.19. Uticaj rimonabanta na koncentraciju IFN- γ 83 u supkutanom i visceralnom masnom tkivu	83
4.20. Uticaj rimonabanta na koncentraciju IL-6 I IFN- γ u tkivu jetre	86
V DISKUSIJA	88
VI ZAKLJUČCI	114
VII LITERATURA	116

I UVOD

1.1. POJAM NEALKOHOLNE MASNE BOLESTI JETRE

Jetra je sedište eterične duše.

Postulat drevne kineske medicine

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD, engl. *nonalcoholic fatty liver disease*) obuhvata širok spektar bolesti jetre, od inicijalne steatoze do steatohepatitisa (NASH, engl. *nonalcoholic steatohepatitis*), koji može dalje da progredira do fibroze i ciroze jetre, uz mogućnost razvoja hepatocelularnog karcinoma (1). Pojednostavljeno rečeno, NAFLD podrazumeva prisustvo većih količina masti u jetri, koje se daljim razvojem bolesti negativno odražava, kako na metabolizam brojnih lipidnih komponenti, tako i na metabolizam ugljenih hidrata, naročito glukoze (2, 3). S tim u vezi, kod NAFLD početna steatoza može da se razvije u NASH, koga odlikuje inflamacijski proces i hepatocelularno oštećenje. Sa progresijom NAFLD, dolazi do fibrogeneze, koja zatim u 10-20% obolelih osoba povećava rizik za nastanak ciroze jetre u naredne dve decenije njihovog života (4). Osim toga, progresija ove bolesti povezana je sa povećanjem mortaliteta usled terminalne hepatičke insuficijencije i hepatocelularnog karcinoma (1).

U razvijenim delovima sveta i zemljama u tranziciji, NAFLD predstavlja rastući zdravstveni problem, koji je usko povezan sa pandemijom gojaznosti i nastankom metaboličkog sindroma (MS) (4). Međutim, ova najčešća hronična bolest jetre nije svojstvena samo modernom društvu, o čemu govori i podatak da je izmenjen metabolizam masnih kiselina utvrđen kod egipatskih mumija, koje su stare preko 2000 godina (5).

NAFLD, kao hepatičko ispoljavanje MS, udružena je sa razvojem gojaznosti, hipertenzije, dislipidemije, insulinske rezistencije (IR) i dijabetesa melitusa (*diabetes mellitus*) tip 2 (DM tip II) (1, 4). Ovaj veoma čest skup patofizioloških poremećaja koji imaju metaboličko poreklo, označen još kao sindrom IR, prisutan je kod približno svake četvrte odrasle osobe (6). Koncept MS, prvi put je opisan 1923. godine, kada je švedski lekar Kilin (*Kylin*) istakao značaj udruženosti hiperglikemije, arterijske hipertenzije i hiperurikemije (7). Tokom narednih decenija, brojne epidemiološke i kliničke studije identifikovale su udruženost IR, povišenog nivoa triglicerida (TG) u plazmi, snižene

vrednosti lipoproteina velike gustine (HDL, engl. *high density lipoproteins*) u plazmi, poremećaja tolerancije glukoze, arterijske hipertenzije i povećanog rizika za razvoj kardiovaskularnih (KVS) oboljenja (8). Međutim, pravi početak razmišljanja o patogenezi MS vezan je za prepoznavanje ključne uloge IR i njenih posledica, kao i sagledavanje činjenice da je masno tkivo metabolički aktivan organ (6). S tim u vezi, Geri Raven (*Gerry Reaven*) je 1988. godine terminom sindrom X označio intoleranciju glukoze, arterijsku hipertenziju i dislipidemiju u čijoj osnovi je, zapravo, IR (9). Ubrzo potom, Kaplan je skrenuo pažnju naučnoj javnosti na povećano prisustvo abdominalnog (centralnog /visceralnog/) tipa gojaznosti kod obolelih od ovog sindroma, upotrebivši tom prilikom prvi put termin “smrtonosni kvartet” za udruženu pojavu intolerancije glukoze, arterijske hipertenzije, dislipidemije i visceralnog tipa gojaznosti (8). Pokazano je da je rizik da osobe sa MS ispolje NAFLD 4 do 11 puta veći u poređenju sa osobama kod kojih nije prisutna IR (10).

Povećano nakupljanje TG u jetri u odsustvu prekomernog unosa alkohola počelo je da pobuđuje naučnu pažnju početkom šezdesetih godina prošlog veka (11, 12). Naime, uprkos tome što već milionima godina nosi gen svog paleolitskog pretka koji se borio za svaki zalogaj hrane, čovek modernog doba se suočio sa prehrambenim izobiljem kome teško odoleva, pri čemu nije fizički aktivan kao u osvit civilizacije, pa se taj višak kalorija i zasićenih masti okrenuo protiv njega sa učestalijom pojavom MS. U tom smislu, moderan način ishrane (visok procenat šećera, masti i razni aditivi u hrani) i njen izmenjen hrononutritivni ritam čine da je ljudska populacija u razvijenim zemljama i zemljama u tranziciji u postprandijalnom stanju tokom celog dana (8). Prema *hipotezi o štedljivom genotipu* (genotipu “škrtrici”), koju je 1962. godine postavio američki genetičar Džejms Nil (*James Neel*), upravo genetska selekcija koja je omogućila efikasnije deponovanje masti, zapravo postaje maladaptivna promena u savremenom svetu. S tim u vezi, Džejms Nil je istakao da je čovek u toku evolucije često bio izložen periodima gladovanja, što je dovelo do favorizovanja onih gena koji promovišu efikasnije deponovanje masti između perioda gladovanja, koji su, shodno tome, nazvani štedljivi geni, jer omogućavaju pripremu za period gladovanja. Međutim gladovanje u savremenim uslovima izostaje, pa nastaje IR, sa posledičnom epidemijom gojaznosti (13). Pobornici hipoteze o štedljivom genotipu pojavu IR objašnjavaju pozitivnom selekcijom štedljivih gena, koja je obezbeđivala preživljavanje samo onih

pojedinaца u rodovsko-lovačkoj zajednici, čiji je metabolizam bio tako formiran da je u periodima “gozbe” mogao brzo da primi i deponuje velike količine hrane bogate energijom, koje bi, potom, u periodima gladovanja racionalno i štedljivo trošio. Takav metabolički profil u osnovi je imao receptorsku i postreceptorsku rezistenciju na insulin i predstavljao je prednost u uslovima tradicionalnog načina života. Nasuprot tome, u istoriji civilizacije periodi gladovanja su praktično nestali, tako da je postojeći metabolički profil postao nepoželjno nasleđe iz prošlosti. U takvim uslovima, IR zadobija patološke razmere, dovodeći najpre do kompenzacijske hiperinsulinemije, koja može trajati godinama. U tom periodu organizam sintetiše veliku količinu insulina, i na taj način održava nivo glukoze u normalnom opsegu. Vremenom se endokrini pankreas iscrpljuje i osoba iz faze hiperinsulinemije ulazi u fazu hipoinsulinemije. Tokom tog prelaza u jednom trenutku kapacitet lučenja insulina više nije dovoljan za prevazilaženje IR, pa nastaje relativan nedostatak insulina i manifestna hiperglikemija, koja je naročito izražena u periodu posle uzimanja hrane bogate ugljenim hidratima, zbog čega se naziva intolerancija glukoze. Kasnije se uspostavlja stalna hiperglikemija, koja odlikuje šećernu bolest (3, 8, 14). Pored toga, fenomen IR je značajan i za nastanak nekih poremećaja metabolizma lipida, gojaznosti i povišenog krvnog pritiska (6).

Termin NASH prvi put je upotrebio Jirgen Ludvig (*Jürgen Ludwig*) 1980. godine (15). Pod ovim terminom on je podrazumevao nagomilavanje TG u jetri kod 20 pacijenata (12 žena i 8 muškaraca) sa hroničnim oboljenjem jetre, koji su duže od 10 godina bili ispitivani na Klinici Mejo (*Mayo Clinic*) u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (15). Kod 18 pacijenata (90%) je verifikovana gojaznost (15). Svi pacijenti su negirali konzumiranje alkohola, iako je patohistološki nalaz ukazivao na lezije koje su tipične za alkoholni hepatitis (steatoza, lobularna inflamacija, balonirajuća degeneracija hepatocita uz prisustvo Malorijevih */Mallory-Denk/* telašaca, i dr.) (15). Tako je NASH, koji je kod ovih bolesnika potvrđen biopsijom, “*doveo lekare kliničare u situaciju da ne odustaju od pokušaja da od pacijenata dobiju priznanje o prekomernom unosu alkohola, odnosno da istrajavaju u svojim nastojanjima da im rođaci pacijenata potvrde prisustvo te štetne navike*” (15). Osim toga, daljim ispitivanjem ustanovljeno je da NASH u odnosu na alkoholni hepatitis ima različit klinički i biološki profil (16, 17). Utvrđeno je, takođe, da se NASH sporije razvija u odnosu na alkoholni hepatitis (18). Tako se rasvetljavanje enigme NASH kretalo u

opsegu od pseudoalkoholnog hepatitisa, steatonekroze i dijabetesnog hepatitisa, do NAFLD kao multisistemske bolesti (19).

Mogući uzroci NAFLD prikazani su u tabeli 1 (20, 21). Shodno *hipotezi o štedljivom fenotipu*, koju su Hejls i Barker (*Hales i Barker*) postavili 1992. godine, novorođena deca koja su se razvijala u uslovima intrauterine malnutricije, adaptiraju se na oskudnu ishranu smanjenjem energetske potrošnje (22). Pokazalo se da su ovakve metaboličke adaptacije korisne kada se osobe slabije hrane u periodu detinjstva i odraslog doba. Međutim, sa porastom unosa hrane ove metaboličke adaptacije povećavaju rizik za nastanak MS kasnije tokom života. U prilog tome govori i povezanost male telesne težine na rođenju, izazvane intrauterinom malnutricijom, i razvoja IR i dijabetesa tip 2 u kasnijem životnom dobu (23).

Savremeno poimanje NAFLD definiše kao multisistemsku bolest, koja povećava rizik za nastanak i razvoj dijabetesa tip 2, oboljenja srca (disfunkcija i hipertrofija leve komore, fibrilacija pretkomora i kalcifikacija zalistaka) i krvnih sudova, kao i hronične bubrežne bolesti (19). Uz to, NAFLD je povezana i sa drugim hroničnim bolestima, kao što su iznenadni prestanak disanja u toku spavanja (*sleep apnea* u sklopu hronične opstruktivske plućne bolesti /HOBP/), maligne bolesti (karcinom kolona, karcinom rektuma, itd.), osteoporoza, psorijaza, endokrinopatije (sindrom policističnih jajnika, i dr.) (19).

Uprkos neprekidnom ovladavanju biomedicinskim znanjima i tehnikama, naučnici su još uvek daleko od potpunog razumevanja patogeneze NAFLD. S tim u vezi, u okviru savremenog pristupa ovoj bolesti, najšire prihvaćena je *hipoteza dva udara*. U prvom udaru, usled IR povećava se lipolitička aktivnost masnog tkiva. Na taj način se povećava transport slobodnih masnih kiselina (SMK) u jetru (palmitinske, stearinske, oleinske, linoleinske, arahidonske kiseline, i dr.), kojeg prati *de novo* lipogeneza, dovodeći do akumulacije TG u hepatocitima (4). U drugom udaru, oksidativni stres, lipotoksičnost i prekomerna produkcija proinflamatornih citokina dovode do progresije steatoze u NASH i fibrozu (1). S obzirom da hipoteza dva udara ne objašnjava sve molekulske i metaboličke promene koje nastaju u toku NAFLD, u poslednje vreme se patogeneza ove bolesti sve više sagledava kroz prizmu *hipoteze višestrukih udara*. Naime, ova hipoteza se zasniva na višestrukim udarima koji deluju zajedno kod genetski predisponiranih osoba (IR, adipokini /leptin, apelin, rezistin,

visfatin, i dr./), proinflamatorni citokini (interleukin-6 /IL-6/, interferon- γ /INF- γ /, i dr.), nutritivni faktori, uticaj crevne mikroflore, kao i genetski i epigenetski faktori) (24).

Tabela 1. Mogući uzroci NAFLD (modifikovano prema referencama 20 i 21)

<p>Metabolopatije Nedostatak apolipoproteina B (abetalipoproteinemija) Bolesti deponovanja glikogena (glikogenoze) Veber-Kristianova (<i>Weber-Christian</i>) bolest Volmanova (<i>Volman</i>) bolest (nedostatak lizozomske kisele lipaze) Akutno nastala masna bolest jetre u trudnoći Lipodistrofija Hemohromatoza Nedostatak α-1 antitripsina Vilsonova (<i>Wilson</i>) bolest</p>
<p>Endokrinopatije Hipopituitarizam Hipotireoidizam</p>
<p>Lekovi Metotreksat Diltiazem HAART (engl. <i>highly active antiretroviral therapy</i>) Amiodaron Glukokortikoidi</p>
<p>Toksini Alkohol Toksini iz spoljašnje sredine (toksini otrovnih gljiva, i sl.)</p>
<p>Nutritivni faktori Malnutricija i gladovanje Parenteralna ishrana Nagli gubitak telesne težine Hirurške intervencije (gastrični bajpas, jejunno-ilealni bajpas, i sl.) Divertikuloza jejunuma praćena olakšanim razmnožavanjem bakterija</p>
<p>Autoimunske bolesti Autoimunski hepatitis Celijska bolest (glutenska enteropatija)</p>
<p>Inflamacija Infekcija izazvana HIV virusom (HIV, engl. <i>human immunodeficiency virus</i>) Hronična infekcija izazvana hepatitis C virusom</p>
<p>Genetski faktori Varijanta sekvence rs738409 C> G u PNPLA3 (engl. <i>patatin-like phospholipase domain-containing 3</i> /PNPLA3, odnosno adiponutrin/) genu određuje količinu masti u jetri Prisustvo E167K varijante TM6SF2 (engl. <i>transmembrane 6-superfamily member 2</i>) gena je prediktor progresije NAFLD Polimorfizam GCKR (engl. <i>glucokinase /hexokinase 4/ regulator</i>), SNP rs780094 utiče na stepen oštećenja jetre (SNP, engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)</p>
<p>Epigenetski faktori Metilacija MTTP promotora; poremećaj acetilacije histona-Sirtuini (SIRTs, engl. <i>Silent Information Regulator-2 family</i>); smanjena metilacija Cdkn1 inhibitora hepatičnog ćelijskog ciklusa; Nekodirajuće RNK sekvence – miRNA (engl. <i>microRNA</i> /mikroRNK/)</p>

1.2. PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE NAFLD

U patohistološkom smislu NAFLD obuhvata steatozu, koja predstavlja relativno benigno stanje bez hepatocelularnog oštećenja, zatim NASH, koji podrazumeva steatozu u zoni 1, kao i inflamaciju i fibrozu, koje se uglavnom uočavaju kod dece u prepubertetskom periodu. Različiti sistemi za određivanje stadijuma i gradusa NAFLD su ustanovljeni u cilju utvrđivanja promena u toku ove bolesti, predstavljajući na taj način pogodno sredstvo za klinička istraživanja (25, 26).

Kod odraslih NAFLD je klasifikovana u dve kategorije. Prvu kategoriju predstavlja NASH kao progresivna bolest jetre, koju karakterišu steatoza, inflamatorne promene i hepatocelularno oštećenje, dok se u drugoj kategoriji nalazi steatoza bez karakteristika NASH, za koju se koristi izraz nealkoholna masna jetra (NAFL) (27). NAFL, koja se često označava i kao "jednostavna steatoza", mogu odlikovati inflamacija i drugi tipovi oštećenja hepatocita. Za razliku od NAFL koja se generalno smatra benignim stanjem, NASH je progresivna bolest koja može dalje da se razvija do ciroze jetre i hepatocelularnog karcinoma (1, 4, 25, 28-30). S tim u vezi, opisani su slučajevi progresije NAFL u NASH, pri čemu faktori rizika koji do toga dovode nisu u potpunosti poznati (31, 32). Stoga, ma koliko klasifikacija NAFL i NASH izgledala jednostavno, prilikom dijagnostikovanja NASH, uvek treba imati na umu i individualne varijacije između patologa (25).

U većini slučajeva patohistološke karakteristike NAFLD se ne mogu razlikovati od onih koje karakterišu alkoholnu bolest jetre, pa je zbog toga neophodno da se patolog oslanja na kliničara, kako bi isključio alkohol kao etiološki faktor. U dijagnostičkom smislu, patolozi dele NAFLD na NAFL (pretežno makrovezikularna steatoza sa ili bez nespecifičnih zapaljenjskih promena) i NASH. Patohistološke karakteristike NASH podrazumevaju makrovezikularnu steatozu, balonirajuću degeneraciju hepatocita, diseminovanu (uglavnom lobularnu) inflamaciju, kao i prisustvo apoptotskih i Mallorijevih telašaca. Takođe, potrebno je istaći da iako je izvestan stepen fibroze često prisutan, on nije neophodan za postavljanje dijagnoze. Nasuprot NAFL, NASH odlikuju specifična oštećenja jetre, koja se mogu prepoznati čak i u prisustvu drugih oboljenja jetre. U ranim fazama bolesti, najizraženije patohistološke promene se uočavaju u zoni 3

hepatičnog acinusa. Postavljanje dijagnoze NASH otežava i činjenica da patohistološke karakteristike steatohepatitisa nisu prisutne u jednakoj meri u svakoj biopsiji, kao i da nijedna karakteristika sama po sebi nije dovoljna za utvrđivanje dijagnoze. Imajući u vidu da NAFLD ima kompleksnu patogenezu i široki spektar patohistoloških nalaza, radi što preciznije procene težine NAFLD koriste se scoring sistemi (25).

Steatoza.- Steatoza je patohistološka karakteristika koja se uočava u različitim oblicima NAFLD. Nju karakteriše akumulacija lipida, prvenstveno TG u zoni 3. Međutim, ova nespecifična promena se može uočiti i u sklopu drugih bolesti jetre. Po pravilu, klinički značajnom smatra se steatoza koja obuhvata najmanje 5% hepatocita (pri vizuelnoj proceni) (33). Uprkos tome, steatoza može biti teško prepoznatljiva u toku ciroze jetre. U svakom slučaju NASH se može dijagnostikovati na osnovu ključnih karakteristika (balonirajuća degeneracija i Malorijeva telašca) (25).

U NAFLD steatoza je najčešće makrovezikularna, mada može biti sastavljena i od mešavine velikih i malih vakuola (34). Kod makrovezikularne steatoze jedna veća ili nekoliko manjih, dobro definisanih masnih kapi zauzimaju veći deo citoplazme, potiskujući jedro na periferiju. Ovakav oblik steatoze osim u NAFLD, može se uočiti i u toku alkoholne bolesti jetre, primene nekih lekova (nifedipin, diltiazem, tamoksifen, estrogeni, kortikosteroidi, i dr.), kod infekcija izazvanih virusima heptatitisa B, C i D, poremećaja metabolizma lipoproteina (abetalipoproteinemija i familijarna hipobetalipoproteinemija), poremećaja ishrane (totalna parenteralna ishrana, proteinsko-energetska malnutricija /kvašiorkor/, gastrični i jejunoilealni bajpas i nagli gubitak telesne težine) (20, 21).

Makrovezikularna steatoza odlikuje 90% slučajeva NAFLD, dok je mikrovezikularna steatoza retko prisutna (do 10% slučajeva) (35). Tipična mikrovezikularna steatoza, koju odlikuje penast izgled citoplazme, nikada nije difuzno raspoređena, već se uočava ili u pojedinačnim hepatocitima, ili u malim grupama hepatocita. Ona se učestalo javlja kod obolelih od Rejovog sindroma i urođenih poremećaja metabolizma masnih kiselina. Osim toga, ovaj oblik steatoze nastaje i kao posledica intoksikacije aflatoksinom i pojedinim lekovima (salicilati, natrijum-valproat, tetraciklini, didanozim, stavudin, fialuridin, propofol, i dr.) (35). Na samom početku bolesti, steatoza je najizraženija u zoni 3 hepatičnog acinusa. Međutim, kako bolest

napreduje, steatoza se može ravnomerno proširiti duž hepatičnog acinusa, ili imati nepravilnu distribuciju (35).

Inflamacija u NASH.- Inflamacija u toku NASH podrazumeva prisustvo mešovitog inflamatornog infiltrata, uglavnom lobularne distribucije. Lobularni infiltrat se sastoji od mešavine CD4 (+) i CD8 (+) limfocita i diseminovanih agregacija Kupferovih ćelija (mikrogranulomi) (36). Osim toga, mogu se videti i polimorfonuklearni leukociti (PMN), naročito u blizini Malorijevih telašaca. U nekim slučajevima mogu se uočiti i eozinofili. Takođe, u portnim prostorima ili u blizini hepatičnih vena mogu biti prisutni i lipogranulomi. Ukoliko je u toku NASH prisutna inflamacija portnih prostora, onda je ona obično blaga. U portnom infiltratu tada dominiraju CD8 (+) limfociti i makrofagi, a težina inflamacije portnih prostora se povezuje sa stadijumom fibroze (37, 38). U slučaju izražene inflamacije portnih prostora neophodno je isključiti prisustvo virusnog ili autoimunskog hepatitisa. Značajno je istaći i da izražena inflamacija, iako nije neophodna za dijagnozu NASH, često ukazuje na napredovanje bolesti (39).

Hepatocelularno oštećenje u toku NASH - Hepatocelularno oštećenje u toku NASH može da varira od balonirajuće degeneracije i apoptoze do manje specifičnih reaktivnih promena. Balonirajuća degeneracija je patohistološka karakteristika od velikog značaja u dijagnostici NASH. Štaviše, prisustvo samo jedne balonirane ćelije može da usmeri dijagnozu u pravcu NASH. Uz to, njeno prisustvo ima i prognostički značaj, jer ukazuje na povećan rizik od progresije bolesti ka cirozi (40). Balonirana ćelija je obično velika (nekoliko puta veća od neizmenjenog hepatocita). U bledoj ili bistroj citoplazmi ovih ćelija, uočavaju se eozinofilne niti (najčešće u vidu perja ili paperja) i veliko hiperhromatično jedro sa izraženim jedarcem. Pored toga, PMN mogu da okružuju balonirane hepatocite, što je označeno kao satelitoza (41-43).

Malorijeva telašca, ranije označena kao *Mallory-Denk* telašca (44), su zapravo eozinofilne intracitoplazmatske inkluzije sastavljene od nesavijenih intermedijernih filamenata (uglavnom keratina), šaperonskih proteina, proteina toplotnog šoka (engl. *heatshock proteins*), kao i drugih sastojaka (44-47). Uprkos tome što Malorijeva telašca nisu neophodna za patohistološku identifikaciju NASH, njihovo prisustvo ima prognostički značaj, jer ukazuje na pogoršanje bolesti, naročito kada su udružena sa

steatohepatitisom i fibrozom (40). Malorijeva telašca, koja su 1911. godine otkrili Frenk i Malori (*Frank i Mallory*) kod obolelih od alkoholnog hepatitisa, nisu specifična za NASH (48). Osim toga, njihovo prisustvo se može uočiti i u toku steatohepatitisa izazvanog lekovima (naročito amjodaronom), hronične holestaze i hepatocelularnog karcinoma (25).

Fibroza u toku NASH.- U normalnim uslovima perisinusoidni ekstracelularni matriks se sastoji iz matriksa po sastavu sličnom bazalnoj membrani, koji sačinjavaju kolagen tip IV i VI, kao i male količine kolagena tip I i III (39, 49). U toku NASH fibroza je često prisutna i obično je perisinusoidna ili pericelularna u zoni 3 hepatičnog acinusa. Kolagen i drugi proteini ekstracelularnog matriksa, koji su najčešće istaloženi duž sinusoida oko hepatocita, mogu se vizuelizovati Mason trihrom (*Massone trichrome*) bojenjem. Fibroza jetre koja nastaje u kasnijim stadijumima ukazuje na disbalans između stvaranja i razgradnje ekstracelularnog matriksa. Sa pogoršanjem bolesti portna fibroza postaje sve uočljivija i može da doživi dalju progresiju do uznapredovale (bridžing, engl. *bridging*) fibroze i ciroze. Naime, u toku fibroze kao i ciroze jetre, u Diseovim prostorima akumulira se fibronektin, laminin, kolagen tip III, kao i proteoglikani, tenascin, dekorin i biglikan (39, 49). Treba napomenuti i opisane slučajeve NASH u gojazne dece, kod kojih je bila evidentirana samo fibroza portnih prostora. U pojedinim uzorcima biopsija u toku ciroze jetre nije verifikovana perisinusoidna/pericelularna fibroza, kao i patohistološke karakteristike aktivnog oboljenja. Stoga, bez NASH koji je prethodno potvrđen biopsijom, ciroza jetre se može označiti jedino kao kriptogena (49).

U toku NAFLD mogu se uočiti i apoptotska (acidofilna) tela. Ova tela su nespecifični pokazatelji oštećenja jetre, koji se osim kod NASH, viđaju i u toku virusnog hepatitisa i drugih hepatičnih oštećenja. Hepatociti koji su doživeli programiranu ćelijsku smrt (apoptozu), postaju mala, eozinofilna tela, nekad u vidu nepravilnih, diseminovanih jedarnih fragmenata (50).

Formiranje megamitohondrija u toku NASH može biti posledica hepatocelularnog oštećenja nastalog usled stvaranja oksidovanih fosfolipida ili lipoproteina (51, 52). Međutim, prisustvo megamitohondrija nije karakteristično samo za NASH, već se ovako izmenjene ćelijske organele mogu uočiti i kod obolelih od alkoholnog steatohepatitisa,

kao i toksičnog oštećenja jetre izazvanog lekovima (53). Osim toga, u toku NASH u periportnim hepatocitima često su prisutna vakuolizovana glikozilirana jedra. Ova jedra pojedinačno nemaju dijagnostički značaj. Međutim, ona mogu da ukažu na nealkoholnu etiologiju, s obzirom da su odsutna u 90% slučajeva steatohepatitisa izazvanih alkoholom (54). Uz to, u uzorcima biopsija obolelih od NAFLD često se uočava neznatno deponovanje gvožđa. Naime, ovaj mikroelement se najčešće akumulira u hepatocitima i ćelijama retikuloendotelnog sistema (RES). Nakupljanje gvožđa u RES-u dovodi se u vezu sa uznapredovalim oblicima fibroze. Međutim, značaj ove hemosideroze nije u potpunosti rasvetljen. S tim u vezi, deficit gvožđa izazvan flebotomijom razmatra se kao dodatna terapija NASH (55, 56).

Skoring sistem, gradusi i stadijumi.- Sistem za procenu gradusa i stadijuma NASH, koji su predložili Brant (*Brunt*) i saradnici u upotrebi je od 1999. godine (57). Oni su za određivanje gradusa bolesti predložili patohistološke karakteristike (steatoza, balonirajuća degeneracija i stepen inflamacije), dok su stadijum bolesti određivali na osnovu lokalizacije fibroze. Na osnovu ovako predloženog sistema, NASH se može ispoljiti u vidu tri gradusa (blagi, umereni i teški), u kombinaciji sa četiri moguća stadijuma fibroze (Tabela 2). Ovaj sistem je koristan i primenjuje se za patohistološku procenu samo onih slučajeva koji su dijagnostikovani kao NASH. Uz to, ovaj se sistem može koristiti u pedijatrijskoj populaciji, kod koje se NASH tipično ispoljava (25).

Tabela 2. Brantov sistem određivanja gradusa i stadijuma steatohepatitisa (57)

Gradus steatohepatitisa	Steatoza	Baloniranje	Lobularna inflamacija	Portna inflamacija	Stadijum fibroze	Fibroza
Blagi	Obuhvata do 2/3	Povremeno u zoni 3	Rasuta, blaga akutna i hronična	Odsutna ili blaga	0	Odsutna
Umereni	Bilo koji stepen	Često u zoni 3	Blaga udružena sa baloniranjem	Blaga do umerena	1	Zona 3 perisinusoidna fibroza
Teški	Tipično više od 2/3	Izraženo u zoni 3	Blaga do umerena	Blaga do umerena	2	Zona 3 perisinusoidna i periportna fibroza
					3	Bridžing fibroza do progresivne fibroze
					4	Ciroza

Grupa eksperata Nacionalnog Instituta za dijabetes, digestivne bolesti i bolesti bubrega (engl. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases /NIDDK/*) je 2002. godine osnovala multicentričnu NASH kliničku istraživačku mrežu (engl. *NASH Clinical Research Network /NASH CRN/*) u cilju ispitivanja etiopatogeneze i terapije NASH. Stručnjaci te istraživačke mreže koji se bave patologijom predstavili su svoj sistem za validaciju i procenu celokupnog spektra patohistoloških promena u toku NAFLD kod dece i odraslih (58). Ključne karakteristike tog sistema prikazane su u Tabeli 3.

Nedavno je Bedosa (*Bedossa*) sa svojim saradnicima predložio dodatni scoring sistem za dijagnostičku kategorizaciju NAFLD u NAFL i NASH. Ovaj sistem je sličan NASH CRN scoring sistemu. Međutim, on sadrži dodatni algoritam na osnovu koga steatoza skor od najmanje 1 ukazuje na NAFL i NASH. Osim toga, prema ovom scoring sistemu razlikovanje NAFL od NASH zavisi od prisustva lobularne inflamacije i baloniranih hepatocita. Za dijagnostikovanje NASH na obe skale (NASH CRN scoring sistem i scoring sistem po Bedosi i saradnicima) neophodan je skor 1 (59).

Specifični slučajevi (dečji uzrast).- Švimer (*Schwimmer*) i njegovi saradnici su opisali dve vrste steatohepatitisa u pedijatrijskoj populaciji. Prvi tip steatohepatitisa, koji se češće javlja kod devojčica, ispoljava se na sličan način kao steatohepatitis kod odraslih (steatoza pretežno u zoni 3) (60). Nasuprot tome, drugi tip steatohepatitisa, koji se češće javlja kod dečaka, karakteriše panacinusna steatoza, ili je steatoza ograničena na zonu 1. Pored toga, značajno je istaći da NAFLD u dece retko prati balonirajuća degeneracija, dok je fibroza generalno blaga ili odsutna (61).

Specifični slučajevi (barijatrijska hirurgija).- Većina gojaznih pacijenata koji su podvrgnuti operacijama u cilju gubitka telesne mase (barijatrijska hirurgija) ima izraženu steatozu u uzorcima biopsija jetre (62, 63). Patohistološke promene u toku NASH nakon ovakvih operacija su nedovoljno istražene (64). S tim u vezi, nedavno je sprovedena opsežna meta-analiza, koja je obuhvatila 1620 uzoraka biopsija pacijenata podvrgnutih barijatrijskoj hirurgiji. Njeni rezultati su pokazali visoku prevalenciju steatoze (u 91% uzoraka biopsija), i steatohepatitisa (u 37% slučajeva) (65). Uprkos visokom riziku za razvoj NAFLD, biopsija se ne sprovodi rutinski kod gojaznih pacijenata. Osim toga, bitno je napomenuti da normalna aktivnost aminotransferaza u

serumu ne garantuje odsustvo hepatocelularnih oštećenja. U prilog tome govori i studija Konzorcijuma barijatrijske hirurgije, koja je pokazala da je u 8% slučajeva steatohepatitisa aktivnost aminotransferaza bila normalna.

Tabela 3. Glavni elementi NASH CRN scoring sistema (56)

Gradus ili stadijum	Karakteristike
<i>Fibroza</i>	
0	Odsutna
1	Perisinusoidna/periportna; definisana 3 podstadijuma
2	Perisinusoidna i periportna fibroza
3	Bridžing fibroza
4	Ciroza
<i>Baloniranje</i>	
0	Odsutno
1	Nekoliko
2	Mnogo
<i>Lobularna inflamacija</i>	
0	Nema fokusa
1	Manje od 2 fokusa na 20x / polje
2	2-4 fokusa na 20x / polje
3	>4 fokusa na 20x / polje
<i>Portna inflamacija</i>	
0	Nema
1	Blaga
2	Izraženija od blage
3	
<i>Steatoza</i>	
0	<5%
1	5%-33%
2	33%-67%
3	>67%

Uz to, u približno 5% uznapredovalih oblika fibroze registrovana je fiziološka aktivnost ovih enzima (66). Osim toga, *Lassailly* i njegovi saradnici su ustanovili povlačenje patohistoloških promena nakon barijatrijske operacije kod 85% pacijenata, što se povezuje sa smanjenjem telesne težine i aktivnosti aminotransferaza u serumu (67).

1.3. DIJAGNOZA I KLINIČKE MANIFESTACIJE NAFLD

Dijagnoza NAFLD se postavlja uz pomoć odgovarajućih tehnika vizuelizacije jetre (imidžing tehnike) i/ili na osnovu patohistološkog nalaza tkiva jetre, pri čemu su isključeni prekomerno konzumiranje alkohola, virusni hepatitis, neadekvatna upotreba hepatotoksičnih lekova, kao i autoimunske bolesti jetre, nasledna hemohromatoza i Vilsonova bolest (68, 70). U većini slučajeva, NAFLD se ispoljava bez simptoma (69, 70). Kod nekih pacijenata prisutni su blagi nespecifični simptomi i znaci (hepatomegalija, tupi bol u gornjem desnom kvadrantu abdomena i hronični zamor), koji nisu pouzdani pokazatelji stadijuma bolesti (69, 70). Kod ovih pacijenata često se objektivno uočava i abdominalna gojaznost, blaga osetljivost donjeg desnog kvadranta abdomena na palpaciju, kao i *acanthosis nigricans*, i druge manifestacije IR (70, 71).

Biopsija jetre.- Biopsija jetre predstavlja zlatni standard u dijagnostici NAFLD (69, 72), uprkos tome što je povezana sa nastankom potencijalnih rizika i komplikacija (73). Tako, ova invazivna metoda omogućava isključivanje drugih uzroka hepatocelularnog oboljenja i oštećenja. Uz to, na osnovu biopsije jetre vrši se procena masne i balonirajuće degeneracije hepatocita, određuje se opseg lobularne inflamacije, kao i prisustvo i intenzitet fibroze jetre (57, 58). Pri tom, uvek treba imati na umu da interpretacija patohistološkog nalaza jetre koji je dobijen biopsijom često zavisi od subjektivne procene patologa (74). Osim toga, biopsijom se ispituje samo mali uzorak tkiva jetre, na osnovu koga nije uvek moguće zaključiti kakve sve patološke promene postoje u preostalom jetrinom parenhimu (75).

U cilju zaobilaženja biopsije, u dijagnostici NAFLD se kao alternativne metode manjeg rizika i manje senzitivnosti i specifičnosti u poređenju sa biopsijom često koriste serumski biohemijski markeri i tehnike vizuelizacije jetre (69, 73).

Serumski biohemijski markeri.- Kao što je već istaknuto, NAFLD karakteriše asimptomatsko ispoljavanje, pa se shodno tome, na ovu bolest najčešće posumnja kada

su prisutni faktori rizika udruženi sa povišenim vrednostima serumskih biohemijskih markera (aminotransferaza /transaminaza/, gama-glutamiltanspeptidaze / γ -GT/ i feritina) (20, 75). Tipično se uočava dvostruki ili trostruki porast aktivnosti aminotransferaza u serumu (alanin aminotransferaze /ALT/ i aspartat aminotransferaze /AST/), pri čemu je njihov međusobni odnos (AST/ALT) manji od 1 (70, 76). S tim u vezi, značajno je pomenuti da rane stadijume bolesti odlikuje povišena aktivnost ALT u poređenju sa AST. Međutim, kako NASH progredira ka cirozi, dolazi do promene, pa aktivnost AST postaje veća u odnosu na ALT (75). Uopšteno govoreći, među lekarima u praksi je postignut konsenzus da je svrsishodno preći na suptilnije procedure za utvrđivanje NAFLD, nakon dobijanja povišene aktivnosti ALT (veće od dvostruke normalne vrednosti), koja je ustanovljena na osnovu dva merenja aktivnosti ovog enzima (20). Pored toga, važno je napomenuti da aminotransferaze nisu specifični indikatori procesa inflamacije i fibroze u jetri. Štaviše, u preko 78% pacijenata sa NAFLD aktivnost jetrinih aminotransferaza može ostati u fiziološkim granicama (20, 69).

Nasuprot tome, utvrđena je korelacija između povišene aktivnosti γ -GT u jetri i uznapredovale fibroze (20, 77). Osim toga, trombocitopenija, hiperbilirubinemija, hipoalbuminemija i produženo protrombinsko vreme ukazuju na razvoj ciroze jetre i portne hipertenzije (69). Takođe, u novije vreme, u serumu se određuje i koncentracija citokeratina-18 (CK-18), koji predstavlja marker apoptoze hepatocita. Pokazano je da je ovaj serumski marker značajno povišen u obolelih od NASH (75). Pored toga, uočeno je da je dijagnoza NASH i NAFLD umnogome olakšana kada se ovaj marker analizira u kombinaciji sa fibroblastnim faktorom rasta-21 (FGF-21) (78).

Izmenjen metabolizam gvožđa (povišena serumska koncentracija feritina i zasićenost /saturacija/ transferina) je registrovan u približno 50% obolelih od NASH (79). U tom smislu, rezultati kliničke studije koja je obuhvatila 600 pacijenata sa NAFLD su ukazali na povezanost povišene serumске koncentracije feritina i progresivnog razvoja fibroze jetre, zbog čega je ovaj serumski biohemijski marker svrstan u nezavisne prediktore uznapredovale fibroze (69).

Tehnike vizuelizacije jetre.- NAFLD se u humanoј populaciji primarno ispituje neinvazivnim imidžing metodama, kao što su na primer, dvojni radiološki skrining protokol koji se sastoji od ultrasonografije i pregleda jetre kompjuterizovanom

tomografijim (CT), tranzicionalni elastografski pregled jetre (tranzicionalna elastografija), i dr. (20, 69).

Za detekciju steatoze u svakodnevnoj kliničkoj praksi najčešće se primenjuje ultrazvučni pregled abdomena (ultrasonografija) (15, 20, 69, 75). Senzitivnost ove relativno jeftine i široko dostupne metode je od 60% do 94%, dok se specifičnost kreće od 66% do 95% (75). Mada dijagnostički kapacitet ultrasonografije raste sa povećanjem stepena steatoze (20, 80, 81), pomoću ove metode nije moguće napraviti preciznu razliku između deponovanja masti u jetri i steatohepatitisa (20, 69). Uz to, kod gojaznih pacijenata ograničenje ove metode se manifestuje u vidu smanjenja senzitivnosti (69).

CT koji se zasniva na upotrebi kontrasta se može koristiti za verifikaciju steatoze (69, 82). Međutim, senzitivnost i specifičnost ove metode je niža u odnosu na CT bez kontrasta (20). Pored toga, ova metoda nije pogodna za ispitivanje inflamacije u tkivu jetre (69). CT bez kontrasta je pokazala dobre rezultate u proceni intenziteta steatoze (senzitivnost 82% i specifičnost 100%) (20, 75, 83, 84). U gojaznih pacijenata sa NAFLD dijagnostičke mogućnosti tranzicionalne elastografije koja se zasniva na primeni ultrazvuka je neophodno dalje istraživati (69).

U današnje vreme magnetna rezonanca (MR) predstavlja najprecizniju imidžing tehniku za detekciju steatoze (senzitivnost 100%, specifičnost 92.3%) (20, 69, 85, 86). Tako je uz pomoć ove metode moguće vizuelizovati masne promene u jetri, čak i kada su one zastupljene u količini manjoj od 3% (69, 85). Nedavno je naučna javnost upoznata sa relativno novom MR imidžing tehnikom (^1H -MRS, engl. *1.5 Tesla ^1H -Magnetic Resonance Spectroscopy*), koja postiže odlične rezultate u dijagnostici masnih promena u jetri (69). Pokazalo se, takođe, da su nalazi dobijeni korišćenjem ove metode u korelaciji sa patohistološkim nalazima biopsije jetre (20, 69, 87, 88).

Prirodni tok NAFLD.- Prirodni tok NAFLD može biti različit. U prognostičkom smislu pacijenti sa NAFLD se svrstavaju u dve kategorije. Prvu kategoriju čine pacijenti sa nealkoholnom masnom jetrom (NAFL, engl. *nonalcoholic fatty liver*), koja je najčešće okarakterisana kao jednostavna steatoza, dok se u drugoj kategoriji nalaze pacijenti sa NASH (21, 89, 90). Za razliku od NASH, koji je uglavnom progresivnog toka, NAFL ne progredira, ili se razvija u teže oblike bolesti neuporedivo sporije u odnosu na NASH (1, 89, 90). S tim u vezi, utvrđeno je da NAFL može da progredira u NASH u 5-20% pacijenata, dok se progresivna fibroza jetre uočava u 10-20% pacijenata

sa NAFL. Osim toga, u manje od 5% pacijenata NAFL može da direktno progredira u cirozu jetre (90, 91).

Rezultati kliničke studije u kojoj su duže od 10 godina praćeni pacijenti sa NASH su pokazali da se kod približno 20% pacijenata NASH može razviti u cirozu. Uz to, smrtonosni oblik ove bolesti registrovan je u 8% pacijenata (4, 92). Takođe, u pacijenata sa NASH je utvrđeno i da je uznapredovala fibroza jetre (stadijum fibroze veći od 2) povezana sa većom stopom smrtnosti u odnosu na pacijente sa NASH kod kojih je fibroza bila prisutna u početnim stadijumima (4, 89, 92, 93). Važno je istaći da se NAFL i NASH, uključujući i one oblike ovih bolesti koje ne progrediraju u cirozu, nalaze na listi najznačajnijih faktora rizika za nastanak hepatocelularnog karcinoma (1, 4, 94-98).

Uopšteno govoreći, NAFLD i u dece i u odraslih podleže sporij progresiji. Međutim, proces fibrogeneze se odvija brzo, tako da se fibroza prvog stepena u NAFL javlja 14 godina nakon postavljanja dijagnoze, dok se u NASH ona konstatuje posle 7 godina od početka bolesti. Međutim, ukoliko oboleli od NAFL, odnosno NASH istovremeno pate i od povišenog arterijskog krvnog pritiska, fibroza prvog stepena se razvija u dvostruko kraćem vremenskom periodu (21, 99). Utvrđeno je, takođe, da u prisustvu ciroze, čija se prevalencija u opštoj populaciji kreće u opsegu od 0.05% do 0.3% (90, 100), rizik za nastanak hepatocelularnog karcinoma dostiže 2% na godišnjem nivou (90, 101).

Posebno je zabrinjavajuća činjenica da se ciroza jetre javlja u sve mlađem životnom dobu. Tako su Švimer i njegovi saradnici opisali cirozu kod osmogodišnjeg deteta sa NASH (60). Osim toga, u dece i adolescenata sa NAFLD registrovani su metabolički faktori rizika i KVS oboljenja (102). Progresivna priroda NASH ogleda se i u sve većoj incidenciji kriptogene ciroze, koja se u današnje vreme smatra sastavnim delom sindroma izgaranja na poslu (engl. *burn out syndrome*) (89). S tim u vezi, u preko 70% pacijenata sa kriptogenom cirozom uočavaju se gojaznost i dijabetes melitus tip 2 (4, 89).

1.4. EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE NAFLD

Hronične nezarazne bolesti.- Hronične nezarazne bolesti su vodeći uzrok mortaliteta na globalnom nivou, to jest kako u nerazvijenim zemljama, tako i u zemljama u tranziciji i razvijenim zemljama (103). Naime, od 38 miliona smrtnih ishoda uzrokovanih hroničnim nezaraznim bolestima u svetu, na godišnjem nivou više od 40% (16 miliona) čini prevremeni mortalitet koji se odnosi na osobe mlađe od 70 godina (103, 104). Prevalencija hroničnih nezaraznih bolesti je takođe u porastu (104). Tako, 17.5 miliona svih smrtnih slučajeva godišnje širom sveta su posledica različitih KVS oboljenja, malignih bolesti (8.2 miliona smrtnih slučajeva godišnje), moždanog udara (6 miliona smrtnih slučajeva godišnje), HOBP (4 miliona smrtnih slučajeva godišnje) i dijabetesa melitusa (1.5 milion smrtnih slučajeva godišnje) (103, 104). U našoj zemlji najčešći uzroci prevremene smrtnosti su ishemijska bolest srca, moždani udar, kardiomiopatije, karcinom pluća i samopovređivanje (104, 105). S druge strane, ako se u našoj zemlji posmatra period od 1990. godine do 2010. godine, može se uočiti opadanje smrtnosti od zaraznih bolesti i porast prevremene smrtnosti zbog hroničnih nezaraznih bolesti (104, 106).

Različite hronične nezarazne bolesti se međusobno razlikuju u odnosu na broj godina zdravog života koji je izgubljen zbog onesposobljenosti ili prevremene smrtnosti (DALYs, engl. *disability adjusted life years*) (104, 105). Većinu hroničnih nezaraznih bolesti karakteriše povećanje vrednosti ovog parametra u periodu između 1990. godine i 2010. godine (106). Suočena sa ovim trendom, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je do 2025. godine postavila 9 meta za borbu protiv hroničnih nezaraznih bolesti (104). Jedna od njih je smanjenje prevremene smrtnosti za 25%, šest se odnosi na redukciju faktora rizika, a preostale dve na dostupnost medicinskih tehnologija i lekova, i odgovarajuću pokrivenost populacije (104, 107).

Gojaznost i NAFLD.- Prema broju izgubljenih godina zdravog života (DALYs), gojaznost spada među prvih deset faktora rizika za nastanak hroničnih nezaraznih bolesti, pa samim tim i NAFLD kao hepatičke manifestacije MS (8). SZO je 2014. godine objavila podatak da je 1.9 milijardi odraslih osoba gojazno. Ova organizacija predviđa da će do 2025. godine 2.3 milijarde odraslih osoba patiti od gojaznosti (108). Poražavajućim podacima SZO se pridružuje i činjenica da 20 miliona dece u svetu,

mlađe od 5 godina, ima prekomernu telesnu masu (8, 108). Osim toga, prosečna vrednost indeksa telesne mase (BMI, engl. *body mass index*) odraslog stanovništva Evrope iznosi 26.5 kg/m². To znači da 400 miliona Evropljana ima prekomernu telesnu masu, dok je 130 miliona Evropljana gojazno. Uz to, stanje uhranjenosti dece u Evropi je takođe zabrinjavajuće, s obzirom da 20% dece ima prekomernu telesnu masu, a 33% je gojazno (8).

Takođe, prekomerna telesna masa i gojaznost Evropljana su povezani sa više od milion smrtnih slučajeva godišnje i 12 miliona izgubljenih godina zdravog života (DALYs) (8, 108). Slično tome, u SAD u periodu od 1988. godine do 2008. godine prevalencija visceralne gojaznosti je porasla sa 35% na 51% (90). U sklopu pandemije gojaznosti, procenjuje se da je prevalencija NAFLD između 80% i 90% (69), dok prevalencija ove bolesti kod patološki gojaznih osoba raste i preko 90% (109). Pored toga, prevalencija NAFLD kod gojazne dece izrazito raste (40-70%), i u proseku iznosi 53% (102). Poznato je, takođe, da u ljudi koji često konzumiraju veće količine alkohola, gojaznost dvostruko povećava rizik za nastanak steatoze (30). Osim toga, u gojaznih ljudi prevalencija NASH se kreće u opsegu od 10% do 56%, pri čemu srednja prevalencija iznosi 33% (89).

Do podataka o prevalenciji NAFLD u našoj zemlji se, za sada, jedino može doći na indirektan način, imajući u vidu da ne postoje registri obolelih osoba. S obzirom da je NAFLD hepatično ispoljavanje MS udruženo sa razvojem gojaznosti, statistički podaci koji se odnose na ove hronične nezarazne bolesti su alarmantni. Naime, u Srbiji polovina odraslog stanovništva ima prekomernu telesnu masu, dok je svaki peti odrasli stanovnik gojazan (110). Uz to, na ovom geografskom području, kao što je već istaknuto, hronične nezarazne bolesti su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta, pri čemu je udeo KVS bolesti u opštem mortalitetu 55.2% (8, 110). Osim toga, na teritoriji Vojvodine je utvrđeno da 74.3% stanovništva oba pola, uzrasta 45 godina i starijeg ima prekomernu telesnu masu i/ili gojaznost, dok je 33.3% osoba navedenog starosnog doba gojazno. S tim u vezi, u Vojvodini, u osoba oba pola, uzrasta 45 godina i starijeg, učestalost MS iznosi 16.9%. Oko 15% dece na ovom području je gojazno, sa tendencijom razvoja MS kod svakog trećeg deteta (8). Ako se nastavi porast broja gojaznih osoba, stručnjaci SZO predviđaju da će 2025. godine 3.27 miliona odraslih ljudi u Srbiji imati prekomernu telesnu masu, a pretpostavlja se da će se čak 249.000

dece školskog uzrasta svrstati u grupu gojaznih ili onih koji imaju višak kilograma. To takođe znači da će 2025. godine 32.000 dece imati ispoljen prvi stepen masne jetre (110).

MS i NAFLD.- MS predstavlja značajan faktor rizika za nastanak i razvoj NAFLD (111). Ovaj sindrom je zasnovan na interakciji endogenih (genetskih) faktora i egzogenih faktora (gojaznost, fizička neaktivnost, unos hrane velike energetske gustine /hrana bogata ugljenim hidratima i mastima/, uzrast, pol, rasa, pozitivna porodična anamneza gojaznosti i/ili arterijske hipertenzije i/ili dijabetesa melitusa, otežano prilagođavanje stresnim situacijama, hronični stres, i dr.), koji dovode do nastanka IR i povećanja količine visceralnog masnog tkiva (6, 8). MS je najviše odgovoran za razvoj KVS oboljenja u poslednjoj deceniji (6, 112). Osobe sa MS imaju dva puta veći rizik za nastanak mortaliteta usled KVS oboljenja i tri puta veći rizik da obole od infarkta miokarda ili moždanog udara u odnosu na zdrave osobe. Uz to, ove osobe imaju i višestruko veći rizik da obole od dijabetesa tip 2 (3, 112). Takođe, sve komponente MS su nezavisni uzročnici KVS događaja, kao što su moždani udar, kardiomiopatija, bolest koronarnih arterija, infarkt miokarda, srčana insuficijencija i iznenadna srčana smrt (6, 112). Štaviše, NAFLD se danas ubraja u nezavisne faktore rizika za nastanak KVS oboljenja (113, 114).

Prevalencija MS značajno varira u zavisnosti od kriterijuma koji su korišćeni za njegovu dijagnozu, kao i uzrasta, pola i etničke pripadnosti obolelih osoba (8, 112). U tom smislu, prevalencija MS u SAD iznosi 16% u crnog stanovništva, 25% u belaca i 36% u populaciji Hispanoamerikanaca (8). Nasuprot tome, učestalost MS u populaciji tinejdžera u SAD iznosi 9.1% u mladića i 3.7% u devojaka (8, 112). Međutim, pokazano je da prevalencija MS raste sa godinama i iznosi 44% kod osoba starih između 60 i 69 godina (8). Takođe, rezultat opsežne studije sprovedene u Australiji ukazuje da svaki peti stanovnik ovog kontinenta pati od MS (8, 112). Slično tome, svaki šesti stanovnik Evrope ima MS, dok u zemljama Evropske unije svaki treći stanovnik boluje od ovog sindroma (112).

Nutritivno objašnjenje za visoku prevalenciju MS i njegovih posledica u našoj zemlji, ostalim zemljama u tranziciji i razvijenim zemljama u svetu nalazi se u povećanju dnevnog energetskeg unosa i energetske gustine hrane (visok sadržaj masti u dnevnom energetskeg unosu), kao i nedovoljnoj fizičkoj aktivnosti. Tako se u periodu

od 1964. godine do 2000. godine prosečan dnevni energetska unos pojedinca u svetu povećao sa 2358 kcal na 2803 kcal, dok se unos masti povećao sa 53 grama na 73 grama (8). Važno je napomenuti i da približno 50% uvećanog unosa kalorija nastaje usled konzumiranja zašćerenih pića (115). Pokazano je, takođe, da je procentualni odnos unosa masti i dnevnog energetskeg unosa (FER, engl. *fat to energy ratio*) najvažniji pokazatelj energetske gustine hrane. Stoga, ukoliko je FER viši, utoliko je rizik za nastanak MS i njegovih posledica veći (8, 112). Osim toga, prema podacima SZO, 1.7 miliona smrtnih ishoda (2.8%) na globalnom nivou su posledica nedovoljnog konzumiranja voća i povrća (104, 116). Takođe, procenjuje se da bi smanjenje korišćenja soli u ishrani sa 9-12 g/dan, koliko sada iznosi svetski prosek, na preporučenih 5 g/dan, moglo da značajno utiče na smanjenje incidencije arterijske hipertenzije i drugih metaboličkih poremećaja u čijoj osnovi se nalazi IR (6, 116).

Rezultati istraživanja prehrambenih navika stanovništva naše zemlje ukazuju na neophodnost podizanja nivoa i kvaliteta znanja u vezi sa pravilnom ishranom, budući da se tek svaki deseti odrasli stanovnik Srbije adekvatno hrani. Osim toga, ustanovljeno je da samo 15.5% odraslih ljudi u Srbiji svakodnevno unosi dve porcije voća, dok svega 12.2% redovno konzumira tri i više porcija povrća svakog dana (110). U vezi sa navedenim činjenicama, u oblasti nutrigenomike na primeru MS, kao multifaktorske i poligenske bolesti, aktivno se traga za takozvanim “*genomic-based*” fenotipskim biomarkerima, koji bi bili validni i omogućili otkrivanje bolesti u prekliničkoj fazi i efektivnu primenu strategija ishrane u prevenciji (104).

Brojne epidemiološke i kliničke studije su ukazale na čvrstu povezanost NAFLD i svake pojedinačne komponente MS (1, 2, 4, 6, 8, 12, 19, 21, 90, 111, 117-123).

Dijabetes i NAFLD.- Dijabetes melitus svakih šest sekundi odnese jedan život, a dve osobe u svetu obole od ove bolesti (124). Zbog svog evolutivnog toka i velike učestalosti, ova bolest je u savremenoj literaturi označena kao pandemijski problem morbiditeta i mortaliteta (125). Definiše se kao stanje hronične hiperglikemije nastale usled apsolutnog ili relativnog nedostatka insulina, koje dovodi do poremećaja metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina, a kao jednu od dominantnih posledica ima razvoj hroničnih angiopatskih komplikacija u vidu ateroskleroze i mikroangiopatije (126).

Prema aktuelnim podacima Međunarodnog udruženja za borbu protiv dijabetesa (IDF, engl. *International Diabetes Federation*), od dijabetesa boluje više od 415 miliona ljudi širom sveta, a očekuje se da taj broj do 2040. godine poraste na 642 miliona (127). Preko 35 miliona ljudi u Evropi boluje od dijabetesa, a procenjuje se da će do 2030. godine 43 miliona ljudi oboleti od ove bolesti (14). U Srbiji 710000 ljudi ima dijabetes, a to je ujedno i peti vodeći uzrok smrti u našoj zemlji. Čak 90% ovih pacijenata boluje od dijabetesa tip 2, a zbog blagih simptoma bolesti trećina njih i ne zna da su oboleti (110).

Dijabetes i KVS oboljenja su uzročnici više od 70% smrtnih slučajeva u svetu (104, 128). Svake godine broj obolelih od dijabetesa tip 1 (prema prethodnoj klasifikaciji označen kao insulin zavisni dijabetes) poraste za 3% (127). Ovaj tip dijabetesa je hronična autoimunska bolest koja pogađa decu u najranijem uzrastu (129). Javlja se naglo, često i kod zdravih i vitkih ljudi (126, 129).

Najčešća forma dijabetesa je tip 2 (prema prethodnoj klasifikaciji označen kao insulin nezavisni dijabetes), jer devetoro od deset ljudi ima upravo ovaj tip dijabetesa (130, 131). Dijabetes tip 2 je progresivna bolest, koja sve više pogađa mlade i osobe između 35. i 64. godine. Karakteriše se dugim asimptomatskim predijabetesnim stanjem, koje može da traje godinama (126, 130, 131). Za njegov nastanak su, pored starenja populacije, uglavnom odgovorni nepravilna ishrana, sedentarni način života i nasledna osnova (124, 126-128). Povećana prevalencija dijabetesa kod radno aktivnog stanovništva, zbog dugotrajnog toka bolesti i prapatnih komplikacija povećava troškove lečenja (110, 125, 130, 131).

Kod pacijenata sa dijabetesom tip 2 rizik za nastanak NAFLD je izuzetno veliki. Štaviše, u ovih osoba zabeležen je porast mortaliteta usled razvoja ciroze jetre (3, 19, 132).

Prevalencija NAFLD i NASH.- Prevalencija NAFLD se razlikuje u zavisnosti od dijagnostičke procedure, godina starosti, pola i etničke pripadnosti ispitanika, kao i geografskog područja i načina ispitivanja (populacione ili kliničke studije) (4, 21, 89, 90, 121, 123).

Globalno posmatrano, prevalencija NAFLD se kreće u opsegu od 4% do 46% (89, 123). Procenjuje se da 11-46% odraslog stanovništva u Severnoj Americi boluje od ove bolesti (121). Tako je u SAD prevalencija NAFLD u populaciji Hispanoamerikanaca

najveća i iznosi 45%, u belaca je 33%, dok je najniža u Afroamerikanaca (24%) (121). Procenjuje se, takođe, da u proseku svaki četvrti odrasli stanovnik u Evropi ima NAFLD (4-49%) (121). Pri tom, prevalencija varira od regiona do regiona (najniža je u Rumuniji /8%/, a najviša u Grčkoj /45%/) (4). Pored toga, prevalencija NAFLD je u porastu i na ostalim kontinentima (u Južnoj Americi je 27-35%, u Aziji je 15-44% i u Africi je 9-20%) (121). U Australiji je NAFLD ustanovljena kod 12.8% adolescenata (16.3% devojaka i 10.1% mladića) (90).

Prevalencija NAFLD je veća u gradovima i ostalim industrijskim zonama u odnosu na ruralnu sredinu (4, 121). Do porasta prevalencije NAFLD dovodi i starenje (90, 123). Takođe, muškarci češće boluju od ove bolesti u odnosu na žene (90, 123). S tim u vezi, nedavno je objavljen podatak da je prevalencija NAFLD u muškaraca 30-40%, a u žena 15-20% (19). Tako je, na primer, prevalencija NAFLD 35% u Holandana starijih od 76 godina (90). S druge strane, kod dece je prevalencija 3-10%, pri čemu je ova bolest dvostruko češća kod dečaka (121). Nasuprot tome, NAFLD koja je prisutna u 7% normalno uhranjenih osoba, češće se javlja u žena u poređenju sa muškarcima (21). Uz to, u Japanu, u zdravih normalno uhranjenih davalaca tkiva jetre prevalencija NAFLD je iznosila 17.9%, dok je u SAD, u ispitivanoj grupi donora tkiva jetre, koji su takođe bili zdravi i normalno uhranjeni, prevalencija ove bolesti bila približno dvostruko veća (34%) (123).

Kao što je već pomenuto, prevalencija NAFLD zavisi i od dijagnostičkih metoda koje se koriste u njenoj proceni. Shodno tome, primenom ultrasonografije procenjeno je da se prevalencija NAFLD kreće u opsegu od 17% do 46%, dok uz pomoć ¹H-MRS njena vrednost iznosi 31% (121).

Podaci koji se odnose na epidemiološke karakteristike NASH su oskudni. Pretpostavlja se da 3-5% ljudi na svetu boluje od NASH (4, 121, 123). Pretpostavlja se, takođe, da približno isti procenat stanovništva SAD ima ovu bolest (4). Osim toga, procenjuje se da je prevalencija NASH u pacijenata sa NAFLD veća od 59.1% (121).

Gojaznost, dijabetes melitus tip 2, MS, kao i njegove pojedinačne komponente su najznačajniji faktori rizika za nastanak i razvoj NAFLD, koji umnogome povećavaju prevalenciju NAFLD i NASH (1-4, 19-21, 89, 90, 121).

Incidencija NAFLD i NASH.- Ne postoje precizni podaci o incidenciji NAFLD, što je delimično posledica činjenice da je NAFLD uglavnom „tiha“ bolest (4). Na

osnovu ultrazvučnog pregleda abdomena, incidencija NAFLD se godišnje kreće u opsegu od 20 do 86 slučajeva na posmatраних 1000 ljudi, dok njena vrednost iznosi 34 slučaja godišnje kada se isti broj ispitanika pregleda uz pomoć ¹H-MRS (21). Uz to, smatra se da su gojaznost, IR, sedentarni način života i nepravilna ishrana naročito odgovorni za povećanje incidencije NAFLD do 40% kod stanovnika Zapadne Zemljine hemisfere (123). Slična situacija se uočava i u Africi, Aziji, Australiji, Srednjem Istoku i Latinskoj Americi (120, 121, 123).

1.5. PATOGENEZA NAFLD

Kao što je prethodno već istaknuto, NAFLD ne prestaje da pobuđuje interesovanje naučnika. Do sada je najšire bila prihvaćena „hipoteza dva udara”, prema kojoj IR i *de novo* sinteza SMK predstavljaju ključne mehanizme u razvoju NAFLD. Najpre, IR u masnom tkivu povećava lipolizu i dopremanje SMK u jetru, a takođe utiče i na porast *de novo* sinteze masnih kiselina u hepatocitima (133). Tako, u prvom udaru dolazi do steatoze (akumulacije TG u hepatocitima), koja povećava osetljivost tkiva jetre na oštećenje, do koga dovodi drugi udar. U tom smislu, drugi udar podrazumeva sinergističko dejstvo različitih faktora koji aktiviraju inflamatornu kaskadu i fibrogenezu. Na taj način dolazi do dalje progresije bolesti u steatohepatitis i fibrozu jetre. Do drugog udara dovode oksidativni/nitrozativni stres, mitohondrijalna disfunkcija, lipotoksičnost, proinflamatorni citokini, kao i disbalans u produkciji adipokina (133). Ova hipoteza je u velikoj meri podržana animalnim modelima gojaznosti (leptin deficijentni ob/ob miševi, i dr.) sa karakteristično izraženom akumulacijom TG u hepatocitima, koja tek nakon dejstva faktora drugog udara dovodi do progresije u steatohepatitis i fibrozu jetre (134). Dosadašnja istraživanja jasno ukazuju da SMK imaju direktnu ulogu u oštećenju hepatocita, što je vremenom dovelo do modifikacije ove teorije. U toku gojaznosti, kao i u toku IR, postoji povećano dopremanje SMK u jetru, gde podležu procesu β -oksidacije ili esterifikacije sa glicerolom, gradeći TG (135). Poznato je da SMK ispoljavaju direktan toksičan efekat, povećavajući intenzitet oksidativnog stresa i aktivaciju inflamatornih puteva u ćeliji. Shodno tome, akumulacija TG u hepatocitima može biti protektivni mehanizam, kojim se sprečavaju toksični efekti neesterifikovanih SMK (135). U međuvremenu, istraženi su i novi faktori od značaja za progresiju NAFLD. Tako je uveden termin „treći udar”,

kojim se označava neadekvatna proliferacija hepatocita (135). U fiziološkim uslovima, nekroza hepatocita stimuliše proliferaciju zrelih hepatocita, u cilju održavanja strukture i funkcije jetre (135). Međutim, oksidativni stres, kao centralna patobiohemijska karakteristika ove bolesti, inhibira proliferaciju zrelih hepatocita, dovodeći do ekspanzije populacije progenitorskih (ovalnih) ćelija, koje imaju sposobnost diferentovanja u ćelije slične hepatocitima (135). Porast broja oba tipa ćelija je u pozitivnoj korelaciji sa postojanjem fibroznih promena u jetri (135). Osim toga, smatra se da aktivacija ovih ćelija može imati ulogu u hepaticnoj kancerogenezi (135). Imajući u vidu da razvijeni stadijumi bolesti (fibroza/ciroza jetre) u velikoj meri zavise od efikasnosti regeneracije hepatocita, odumiranje hepatocita i neadekvatna proliferacija hepatocitnih progenitora su označeni kao "treći udar" u patogenezi NAFLD (135).

Novija saznanja omogućila su bolje razumevanje složenih etiopatogenetskih mehanizama humane NAFLD. Kako prethodna hipoteza ne objašnjava u potpunosti sve molekularne i metaboličke promene koje nastaju u toku ove bolesti, u poslednje vreme je sve više u literaturi zastupljena „hipoteza višestrukih udara” (136). Ova hipoteza, kao što je već prethodno istaknuto, zasniva se na višestrukim udarima koji deluju sinergistički kod genetski predisponirane osobe. Ovi udari podrazumevaju IR, hormone masnog tkiva, proinflamatorne citokine,

nutritivne faktore, uticaj crevne mikroflore, kao i genetske i epigenetske faktore (136).

1.5.1. Uloga insulinske rezitencije u patogenezi NAFLD

Danas se smatra da NAFLD predstavlja hepaticnu manifestaciju MS (133). MS predstavlja udruženu pojavu intolerancije glukoze, arterijske hipertenzije, dislipidemije, centralnog (abdominalnog /visceralnog/) tipa gojaznosti, kao i postojanje drugih metaboličkih poremećaja u čijoj se osnovi nalazi IR. Ovaj sindrom odlikuje ćelijski defekt dejstva insulina, tj. insulin usled neadekvatne intracelularne signalne transdukcije ne ostvaruje svoje biološke efekte. U takvim uslovima, IR u kombinaciji sa posledičnom hiperinsulinemijom izaziva brojne metaboličke poremećaje, koji imaju ključnu ulogu u nastanku, kako steatoze, tako i steatohepatitisa (135). Primećeno je da pacijenti koji imaju steatozu ili NASH u odsustvu DM tip 2, imaju smanjenu insulinsku senzitivnost (137, 138). IR ima vrlo značajnu ulogu u nastanku steatoze i njenoj progresiji u NASH, jer je u direktnoj vezi sa razvojem lipotoksičnosti, oksidativnog stresa i aktivacije

inflamatorne kaskade (139). S tim u vezi, smatra se da je IR u toku NAFLD primarni metabolički poremećaj, koji je kod ovih pacijenata prisutan nezavisno od komorbiditeta (gojaznosti i DM tip 2), što je pokazano kod normalno uhranjenih pacijenata sa NAFLD koji nisu imali dijabetes (140).

IR, kako na receptorskom nivou (snižena autofosforilacija tirozina), tako i na postreceptorskom nivou (smanjeno preuzimanje glukoze i smanjeno stvaranje sekundarnih glasnika), bitno doprinosi nastanku poremećaja metabolizma (disglikemije, dislipidemije, gojaznosti, DM tip 2 i NAFLD) (141, 142). Ona može biti periferna (smanjeno insulinom posredovano preuzimanje glukoze u skeletne mišiće i masno tkivo) i hepatična (nemogućnost insulina da smanji produkciju glukoze u jetri) (143). Važno je napomenuti da oboleli od NAFLD pokazuju značajan stepen IR na nivou mišića, koji se ispoljava neadekvatnim preuzimanjem glukoze. Uz to, na nivou jetre IR smanjuje sposobnost insulina da inhibira hepatičnu glukoneogenezu i glikogenolizu. Osim toga, IR u masnom tkivu povećava intenzitet lipolize, dovodeći do porasta koncentracije cirkulišućih SMK (144).

Insulin svoje efekte (povećan transport glukoze u ćelije, inhibicija lipolize, stimulacija sinteze proteina, povećan aktivni transport aminokiselina, i dr.) ostvaruje vezivanjem za insulinske receptore na ćelijskim membranama insulinske ćelije. Nakon toga, dolazi do autofosforilacije tirozinskih rezidua β -subjedinice receptora, tj. aktivacije tirozin kinaze. Na taj način aktiviraju se signalni putevi, označeni kao PI-3K (signalni put fosfatidil-inozitol-3 kinaze) i MAP (mitogen aktivirani signalni put protein kinaze). Shodno tome, aktivirani insulinski receptor vrši aktivaciju IRS-1/2/3/4 (supstrati za insulinski receptor). Poznato je da IRS-1 ima glavnu ulogu u procesu sinteze glikogena u skeletnim mišićima, dok IRS-2 uglavnom posreduje u efektima insulina u glukoneogenezi i glikogenezi u jetri (143, 145).

U stanjima koja su praćena pojavom IR, aktivnost MAP kinaze je očuvana, dok je PI-3K put blokiran usled fosforilacije serinskih rezidua IRS-1 i insulinskog receptora (146). Uprkos tome što je potvrđena povezanost IR i NAFLD, i dalje ostaje nejasno da li IR uzrokuje povećanu akumulaciju TG u jetri, ili povećanje TG i/ili njihovih metabolita doprinosi razvoju hepatične i sistemske IR (147, 148). U svakom slučaju, NAFLD i NASH predstavljaju dve najzastupljenije bolesti jetre povezane sa IR (149).

Brojni činioci mogu da remete signalnu kaskadu insulina i time olakšaju nastanak IR i NAFLD (SMK, faktor tumorske nekroze- α /TNF- α , engl. *tumor necrosis factor- α* , nuklearni faktor kapa B /NF- κ B/, ceramidi, jun-N-terminalna kinaza-1/JNK-1/, supresori citokinske signalizacije /SOCS, engl. *suppressor of cytokine signalling*/ i citohromni enzimski sistem CYP2E1) (135, 150). Pokazano je da u stanjima IR, hiperinsulinemija dovodi do ushodne regulacije transkripcionog faktora za SREBP-1c (engl. *sterol regulatory element-binding protein-1c*), koji ima ključnu ulogu u regulaciji gena uključenih u *de novo* lipogenezu (135). Osim toga, hiperinsulinemija dovodi i do inhibicije β -oksidacije masnih kiselina, što dalje doprinosi akumulaciji masti u hepatocitima i nastanku NAFLD (150).

1.5.2. Mehanizam akumulacije TG u hepatocitima

S obzirom da u fiziološkom smislu jetra ne predstavlja depo masti, količina TG u hepatocitima je normalno niska (151). Jedna od ključnih karakteristika NAFLD je akumulacija TG, koji u hepatocitima nastaju esterifikacijom SMK sa glicerolom. Lipoliza u masnom tkivu (hidroliza TG u adipocitima do SMK i glicerola), dijetarne masti i *de novo* lipogeneza koja se odvija u hepatocitima, predstavljaju glavne izvore SMK u jetri (152). SMK koje se nalaze u hepatocitima podležu procesu β -oksidacije ili se reesterifikuju do TG i, potom, dalje sekretuju u formi lipoproteinskih čestica veoma male gustine (VLDL, engl. *very low density lipoproteins*) (152). Shodno tome, akumulacija TG u hepatocitima nastaje usled povećanog dopremanja SMK, povećanja *de novo* sinteze MK, smanjene sekrecije VLDL iz hepatocita ili smanjenja intenziteta β -oksidacije (152). U cilju utvrđivanja značaja svakog od ova tri izvora SMK u patogenezi NAFLD, *Donnelly* je sa svojim saradnicima koristio višestruko stabilnu izotopsku metodu. kojom je utvrđeno da 60% sadržaja TG u hepatocitima nastaje esterifikacijom SMK iz masnog tkiva, 26% od *de novo* lipogeneze i 15% su dijetarne SMK (153). Nasuprot tome, kod zdravih ispitanika *de novo* lipogeneza učestvuje sa manje od 5% u formiranju hepatičnih TG (154). Kod zdravih osoba, u periodu između obroka, lipoliza u masnom tkivu dovodi do oslobađanja neesterifikovanih SMK, čija koncentracija u plazmi raste, tako da ih tkiva koriste kao izvor energije. Takođe, ove SMK jetra koristi i u procesu glukoneogeneze. Nasuprot tome, nakon obroka pankreas povećeva sekreciju insulina, povećavajući intenzitet lipogeneze, i inhibirajući pri tom lipolizu i β -oksidaciju SMK u mitohondrijama (135). Na taj način stimuliše se korišćenje glukoze kao

energetskog izvora, smanjuje se korišćenje SMK i omogućava njihovo deponovanje u masnom tkivu (135). Kao posledica IR, smanjuje se inhibitorni uticaj insulina na lipolizu u masnom tkivu i povećava koncentracija SMK u cirkulaciji (135). Imajući u vidu značajnu lipolitičku i metaboličku aktivnost visceralnog masnog tkiva, SMK koje ovo masno tkivo oslobađa odlaze direktno do jetre putem portne cirkulacije (155).

SMK, koje hepatociti reesterifikuju u TG, potiču iz plazme, ili ih hepatociti sami sintetišu iz nelipidnih prekursora u procesu *de novo* lipogeneze (151). Smatra se da *de novo* lipogeneza ima značajnu ulogu u razvoju steatoze, s obzirom da učestvuje u nastanku 26% hepatičnih TG u toku NAFLD (151). Glavni prekursori u procesu *de novo* lipogeneze su glukoza, aminokiseline i etanol. Naime, njihovim katabolizmom nastaje acetil-koenzim A (acetil-CoA), zbog čega su ovi prekursori pogodni za sintezu masnih kiselina u toku intermedijernog metabolizma (156). U toku glikolize, glukoza se konvertuje u piruvat, koji se dalje procesom oksidativne dekarboksilacije prevodi u acetil-CoA. U sledećem koraku, iz acetil-CoA nastaje malonil-CoA pod katalitičkim dejstvom acetil-CoA karboksilaze (ACC). Sintaza masnih kiselina (FAS, engl. *fatty acid synthase*) koristi malonil-CoA kao supstrat u procesu sinteze palmitinske kiseline. Tako nastala palmitinska kiselina se dalje procesom elongacije i desaturacije, uz pomoć elongaze dugolančanih masnih kiselina 6 (ELOVL6, engl. *long chain fatty acid elongase 6*) i stearoil-CoA desaturaze 1 (SCD1) prevodi u mononezasićene masne kiseline, koje zatim predstavljaju glavne supstrate u procesu sinteze hepatičnih TG (151). IR udružena sa hiperinsulinemijom dovodi do ushodne regulacije SREBP-1c, koji je ključni transkripcioni faktor regulacije *de novo* lipogeneze, kao i inhibicije β -oksidacije, čime se stimuliše dalja akumulacija TG u hepatocitima (135). Proces lipogeneze je kontrolisan na transkripcijskom nivou. U toku IR, kao i u postprandijalnom periodu, dolazi do porasta koncentracije glukoze i insulina u plazmi, pri čemu obe ove komponente stimulišu proces *de novo* lipogeneze (151). Glukoza i insulin stimulišu lipogenezu aktivacijom transkripcionih faktora, ChREBP (engl. *carbohydrate responsive element-binding protein*) i SREBP-1c. Oba ova transkripciona faktora potom pokreću proces transkripcije lipogenih gena, vezujući se za nuklearni receptor, odnosno specifičnu nukleotidnu sekvencu (respondivni element) u promotorskom regionu velikog broja gena (151). Stim u vezi, vezivanje liganda dovodi do konformacione promene nuklearnog receptora, što rezultuje koordinisanom

disocijacijom korepresora i angažovanjem koaktivacijskih proteina u cilju odvijanja procesa transkripcije. SREBP-1c je transkripcioni faktor koji podstiče ekspresiju lipogenih gena, uključujući gene za FAS, ACC i SCD1 (157). Postoje različite izoforme SREBP. Tako su SREBP-1c i SREBP-2 su izrazito eksprimirani u jetri, dok SREBP-1a ima veoma nizak nivo ekspresije u jetri odraslih miševa, pacova i ljudi (157). SREBP-1c je predominantna forma u jetri, uključena u regulaciju transkripcije gena koji kontrolišu *de novo* lipogenezu, dok SREBP-2 ima značajniju ulogu u procesu biosinteze i metabolizma holesterola. SREBP-1a, koja je neznatno zastupljena u jetri, takođe reguliše lipogenezu i metabolizam holesterola (157). Transkripciju SREBP-1c mogu da pokrenu insulin i LXR α (transkripcioni faktor koji deluje kao senzor holesterola) (157). Insulin stimuliše transkripciju SREBP-1c preko još uvek nedovoljno objašnjenog PI3K-zavisnog mehanizma, uz učešće hepatičnog X receptora (LXR, engl. *liver X receptor*). LXR je nukleusni hormonski receptor uključen u regulaciju homeostaze holesterola, čiju aktivaciju podstiču oksisterolski metaboliti holesterola. Nakon aktivacije ovog nukleusnog hormonskog receptora, dolazi do njegove heterodimerizacije sa retinoidnim X receptorom (RXR), pri čemu se stimuliše ekspresija gena od ključnog značaja za katabolizam i eliminaciju holesterola. LXR α je najzastupljenija izoforma u jetri, i ujedno veoma potentan aktivator SREBP-1c, čijim posredstvom insulin u najvećoj meri stimuliše hepatičku lipogenezu (151). Pored insulina i glukoza stimuliše *de novo* lipogenezu, prvenstveno preko proteina koji vezuje ChREBP. Osim toga, utvrđeno je da je ChREBP direktna meta za LXR, koji je značajan regulator lipogenih puteva, u sklopu transkripcione kontrole SREBP-1c. Poznato je da su oksisteroli ligandi za LXR. Takođe, utvrđeno je da glukoza može da aktivira ovaj receptor, i time indukuje ekspresiju ChREBP i drugih gena uključenih u proces hepatičke lipogeneze (157). U uslovima hiperglikemije raste hepatička koncentracija fosforilisanih intermedijera koji aktiviraju ChREBP, što zatim dovodi do njegovog vezivanja za promotore gena u formi heterotetramera zajedno sa Mlx (engl. *Max-like protein X*). ChREBP ne utiče samo na ekspresiju enzima glikolize i lipogeneze kao predisponirajući faktor razvoja steatoze, već i na glukokinazni regulatorni protein, koji inhibira preuzimanje glukoze u jetru. Indukcija transkripcije ovog gena ispoljava se kao hepatična glukozna intolerancija ili hepatična IR (157).

Razvoju steatoze doprinosi i smanjenje intenziteta oksidacije SMK. Osim insulina, značajan faktor koji reguliše proces oksidacije SMK je i PPAR (engl. *peroxisome proliferator activated receptor*). Postoje različite izoforme PPAR. Tako, na primer, u hepatocitima se preko PPAR- α vrši kontrola gena koji su važni za transport lipida i njihovu oksidaciju. Poznato je, takođe, da se u adipocitima posredstvom PPAR- γ odvija kontrola lipogeneze, deponovanja lipida i diferencijacije masnih ćelija (158). Važno je napomenuti da se PPAR- α nalazi i u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, dok se u endotelnim ćelijama i makrofazima nalaze oba tipa PPAR, α i β , što je od značaja za ispoljavanje endotelne disfunkcije (smanjena produkcija azot monoksida /NO/, povećano stvaranje endotelina-1 /ET-1/ i tromboksana A₂ /TXA₂/ i smanjena fibrinolitička aktivnost usled povišenog nivoa inhibitora aktivatora plazminogena-1 /PAI-1, engl. *plasminogen activator inhibitor-1*) (159). PPAR- α u jetri ima ključnu ulogu u metabolizmu SMK, kao stimulator ekspresije gena uključenih u mitohondrijalnu i peroksizomalnu oksidaciju SMK, što posledično smanjuje hepatici depo TG (157). PPAR- α formira heterodimer sa RXR, koji se zatim vezuje za specifične DNK sekvence, poznate kao PPREs (engl. *peroxisome proliferator response elements*). Ovaj transkripcioni kompleks, potom, stimuliše ekspresiju gena koji promovišu oksidaciju SMK. Osim toga, utvrđeno je da PPAR- α direktno stimuliše produkciju fibroblastnog faktora rasta 21 (FGF21, engl. *fibroblast growth factor 21*). FGF21 se sintetiše u jetri i oslobađa u cirkulaciju, tako da deluje kao hormon, stimulišući oksidaciju SMK, ketogenezu i glukoneogenezu u periodu gladovanja (160).

Jetra sintetiše VLDL čestice, koje zatim odlaze do perifernih tkiva (prvenstveno skeletnih mišića, masnog tkiva i srčanog mišića), u kojima služe kao izvor TG. VLDL je nosač TG, koji se sastoji iz hidrofobnog jezgra, izgrađenog najvećim delom od TG i estara holesterola. Svaka VLDL čestica je stabilizovana apolipoproteinom B 100 (ApoB 100). ApoB 100 je dugolančani polipeptid, koji se u lumenu endoplazmatskog retikuluma (ER) povezuje sa lipidima, uz pomoć mikrozomalnog trigliceridnog transfer proteina (MTP). Takve nascentne VLDL čestice se dalje vezikulama dopremaju do Goldžijevog aparata, gde u potpunosti sazrevaju. Zrele VLDL čestice sekretuju se egzocitozom u Diseove (*Diss*) prostore, odakle dospevaju do hepaticnih sinusouda i sistemske cirkulacije (161). U perifernim tkivima, VLDL podleže hidrolizi pod dejstvom lipoproteinske lipaze (LPL), pri čemu nastaju lipoproteini srednje gustine

(IDL, engl. *intermediate density lipoproteins*) i lipoproteini male gustine (LDL, engl. *low density lipoproteins*) (151). Insulin ima značajnu ulogu u regulaciji intenziteta produkcije VLDL, stimulišući degradaciju ApoB 100 mehanizmom koji uključuje autofagiju (162). Osim toga, insulin negativno deluje na ekspresiju MTP, te se, stoga, sveukupni neto efekat insulina ispoljava smanjenjem postprandijalne sekrecije VLDL (162). Time se omogućava perifernim tkivima da u većoj meri koriste hilomikrone koji sadrže egzogene TG. U uslovima IR, PI-3K put je blokiran, pri čemu ushodna regulacija SREBP-1c smanjuje sintezu VLDL čestica (151). Poremećaji sinteze MTP i ApoB 100, i sekrecije VLDL su dodatni potencijalni mehanizmi koji smanjuju sposobnost hepatocita da sekretuju lipide, doprinoseći na taj način hepatičkoj akumulaciji TG (135).

U toku postprandijalnog perioda, hepatska β -oksidacija je suprimirana antilipolitičkim dejstvom insulina, što smanjuje dopremanje SMK u jetru. Osim toga, insulin dovodi do olakšane *de novo* lipogeneze posredstvom SREBP-1c aktivirane ACC (151). Malonil-CoA, koji nastaje dejstvom ACC, inhibira aktivnost karnitin palmitoiltransferaze 1 (CPT1), što zatim smanjuje ulazak SMK u mitohondrije i redukuje intenzitet β -oksidacije (151). Budući da je IR praćena neadekvatnom supresijom lipolize u masnom tkivu, količina SMK koje se dopremaju do jetre prevazilazi kapacitet njihove β -oksidacije u mitohondrijama. Prekomerna produkcija acetil-CoA dovodi do intenziviranja ciklusa trikarbonskih kiselina i povećanog dopremanja elektrona do respiratornog lanca, čime se povećava stvaranje slobodnih radikala (157).

1.5.3. Uloga masnih kiselina i lipotoksičnosti

U fiziološkim uslovima insulin inhibira oslobađanje SMK iz adipocita. Najveći depo energije u organizmu nalazi se u obliku TG u masnom tkivu. U endotelu kapilara LPL hidrolizuje TG iz cirkulišućih hilomikrona i VLDL do glicerola i SMK, koje zatim preuzimaju adipociti i reesterifikuju u TG. Međutim, u slučaju nedostatka energije, deponovani TG se hidrolizuju do SMK i glicerola, pod katalitičkim uplivom hormon senzitivne lipaze (HSL). Glukagon, adrenalin, noradrenalin, adrenokortikotropni hormon (ACTH), tireostimulišući hormon (TSH) i hormon rasta aktiviraju HSL, dok insulin suprotno deluje na ovaj enzim, tako da u uslovima IR izostaje insulinom posredovana lipoliza u masnom tkivu. Višak SMK, koji na ovaj način nastaje,

transportuje se cirkulacijom do skeletnih mišića i jetre. U jetri se, potom, vrši oksidacija jednog dela SMK, dok se preostali njihov sadržaj reesterifikuje u TG, koji se potom u sastavu VLDL čestica sekretuju u cirkulaciju. Međutim, sav višak TG, koji ne može ovim putem da se eliminiše, ostaje u hepatocitima, doprinoseći nastanku steatoze (153). Pokazano je da pogoršanje insulinske senzitivnosti doprinose depoi TG ektopično locirani u skeletnim mišićima i jetri, i adipocitokini (interleukin-6 /IL-6/, TNF- α , i dr.), koji smanjuju osetljivost jetre i skeletnih mišića na insulin (163).

SMK u cirkulaciji su vezane za albumine, dok su intracelularne SMK vezane za odgovarajuće proteine (FABPs, engl. *fatty acid binding proteins*), koji preuzimaju SMK u hepatocitima, adipocitima i enterocitima (164). FABPs služe kao intracelularni kanali za dopremanje SMK enzima, koji ih, potom, koriste kao supstrate (165). Poznato je, takođe, da je ćelijsko preuzimanje dugolančanih neesterifikovanih masnih kiselina olakšano i prisustvom proteina koji su udruženi sa ćelijskom membranom, kao što su translokaza masnih kiselina (FAT/CD36) i transportni proteini masnih kiselina (FATPs, engl. *fatty acid transport proteins*). U ljudi, FATPs predstavljaju homologu porodicu proteina (FATP1-6) sa specifičnim karakteristikama ekspresije. Smatra se da FATP1 i FATP4 imaju glavnu ulogu u masnom tkivu. Pokazano je da su u regulaciju transkripcije FATP uključeni molekuli koje u gojznosti i stanjima IR moduliraju potencijalni ligandi (insulin, PPAR, native i oksidacijski modifikovane lipoproteinske čestice, medijatori inflamacije i citokini). Utvrđeno je da je ekspresija pojedinih specifičnih proteina koji učestvuju u transportu SMK u masnom tkivu u korelaciji sa IR i gojznosti, i da, posebno FATP4, ima ulogu u stečenoj gojznosti. Shodno tome, FATP4 bi mogao biti veoma atraktivan cilj za medikamentoznu prevenciju i/ili terapiju gojznosti (166).

Dugo se smatralo da je akumulacija lipida u hepatocitima zapravo početak NAFLD. Međutim, novija saznanja ukazuju da je akumulacija TG u hepatocitima adaptivni, protektivni mehanizam koji štiti hepatocite od formiranja toksičnih lipidnih medijatora. Neželjeni efekti povećane akumulacije SMK u različitim organima i tkivima su označeni terminom lipotoksičnost (167). Ovaj termin obuhvata ćelijsko oštećenje i smrt ćelija, koji nastaju dejstvom SMK, njihovih metabolita i TG. Mehanizmi toksičnosti SMK su raznovrsni, imajući u vidu da SMK mogu da daju veliki broj

produkata koji se razlikuju po dužini lanca, mestu desaturacije, kao i *cis* i *trans* konfiguraciji dvostrukih veza (167). Novija istraživanja ukazuju da SMK i njihovi metaboliti (fosfatidčna i lizofosfatidčna kiselina, ceramid i diacilglicerol /DAG/) dovode do lipotoksičnog oštećenja hepatocita, razvojem stresa ER, pokretanjem mehanizama apoptoze, inflamacije i pogoršanjem stepena IR (168). Još je *Randle* sa svojim saradnicima 1963. godine utvrdio povezanost viška intracelularnih SMK, metabolizma glukoze i IR, pri čemu intracelularna akumulacija metabolita SMK smanjuje insulinom posredovano preuzimanje glukoze. Naime, povećano oslobađanje SMK prati porast njihove β -oksidacije, što inhibitorno deluje na glikolizu. Zbog intenzivnije β -oksidacije dolazi do porasta acil-CoA/CoA odnosa, kao i odnosa između nikotinamid adenin dinukleotida u redukovanom (NADH) i oksidovanom obliku (NAD⁺) u mitohondrijama, što posledično dovodi do inaktivacije piruvat dehidrogenaze. Na taj način sprečava se konvertovanje piruvata u acil-CoA, pa nakupljanje citrata inhibira fosfofruktokinazu, koja ima ključnu ulogu u procesu glikolize. Shodno tome, akumulira se glukozo-6-fosfat, koji zatim inaktivira heksokinazu 2, dovodeći do smanjenog preuzimanja glukoze u ćelije (169). Osim toga, porast koncentracije SMK u ćelijama dovodi do povećanja koncentracije njihovih metabolita (DAG, acil-CoA i ceramida), koji u sledećem koraku aktiviraju serin/treonin kinaze, čime se fosforilišu ostaci serina i tirozina na IRS-1 i IRS-2. Time se smanjuje sposobnost IRS da aktivira PI-3K, što dodatno redukuje transport glukoze u ćelije (170). Povećan influks SMK u hepatocite onemogućava insulin da smanji hepatsku produkciju glukoze. Ustanovljeno je da porast koncentracije DAG dovodi do aktivacije protein kinaze C (PKC), čime se smanjuje kinazna aktivnost insulinskog receptora. Shodno tome, smanjuje se fosforilacija tirozinskih rezidua IRS-2, što dalje redukuje PI-3K aktivnost, dovodeći do smanjenja aktivnosti glikogen sintaze, i samim tim, smanjenog preuzimanja glukoze u jetri. Štaviše, izostanak supresivnog efekta insulina na stvaranje glukoze u jetri povećava hepatsku produkciju glukoze, što sveukupno dovodi do porasta glikemije (170).

Hronično izlaganje dugolančanim SMK, u uslovima neefikasnog delovanja insulina, omogućava ovim lipidnim molekulima da uđu u toksične metaboličke puteve i dovedu do programirane ćelijske smrti (lipoapoptoze) (166). Poznato je da zasićene SMK kao ligandi za TLR-4 (engl. *toll-like receptor*) mogu da dovedu do aktivacije

kaskadnog mehanizma apoptoze (171). Apoptoza, to jest programirana ćelijska smrt, predstavlja jedno od značajnijih obeležja NASH, koja se uočava u uslovima prekomernog nakupljanja lipida u ćeliji (lipoapoptoza). Kod pacijenata sa NAFLD, intenzitet hepatocitne apoptoze korelira sa stepenom oštećenja jetre. Utvrđena je pozitivna korelacija lipoapoptoze i AST/ALT odnosa koji je veći od jedan, i intenziteta hepatske fibroze (172). Apoptozu reguliše Bcl-2 proteinska familija u mitohondrijama. Ova familija proteina obuhvata antiapoptotske proteine (Mcl-1 i Bcl-xL), proapoptotske proteine (Bax i Bak), kao i biosenzore ćelijske smrti u koje spadaju BH-3 proteini (Bim i Puma) (172). Apoptoza hepatocita može se aktivirati spoljašnjim i unutrašnjim putem. Spoljašnji put aktiviraju receptori smrti koji se nalaze na ćelijskoj membrani, u koje spadaju Fas, TNF-R1 (engl. *tumor necrosis factor receptor 1*) i TRAIL-Rs (engl. *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptors*). Vezivanjem liganada za ove receptore pokreće se kaskada intracelularnih puteva koji zatim aktiviraju kaspaze (172). Poznato je da SMK mogu da dovedu do ushodne regulacije receptora smrti, naročito Fas i TRAIL receptora 5, što je potvrđeno kod pacijenata sa NASH (172). S tim u vezi, povećanje ekspresije ovih receptora predstavlja potencijalno važan mehanizam kojim SMK pokreću mehanizam apoptoze hepatocita. Za razliku od spoljašnjeg apoptotskog puta, aktivaciju unutrašnjeg puta pokreće stres ćelijskih organela (ER, lizozoma i mitohondrija). Nedavno je potvrđeno da zasićene SMK indukuju JNK-zavisnu lipoapoptozu aktivacijom proapoptotskih proteina Bim i Bax, što zatim dovodi do pokretanja mitohondrijalnog puta apoptoze (172).

1.5.4. Uloga ceramida

Ceramidi su sfingolipidi koji učestvuju u izgradnji lipidnog dvosloja ćelijskih membrana. Osim toga, u slučaju njihove prekomerne akumulacije u hepatocitima, oni deluju kao signalni molekuli, doprinoseći razvoju IR (173). Imajući u vidu da ceramidi inhibiraju insulinsku signalizaciju i indukuju oksidativni stres i inflamaciju, danas se smatraju značajnim faktorom progresije ove bolesti (174).

Sinteza ceramida odvija se u ER, pri čemu su faktori koji mogu da povećaju intenzitet sinteze ovih molekula povećana koncentracija serina u citoplazmi, oksidativni stres i oksidovane LDL čestice (173). Ceramidi se sintetišu iz palmitoil-CoA i serina uz aktivnost serin palmitoil-CoA transferaze, 3-oksosfinganin reduktaze, ceramid sintaze i

dihidroceramid desaturaze (173). Imajući prethodno iznete činjenice u vidu, važno je napomenuti i da dijeta bogata zasićenim SMK stimuliše sintezu ceramida. Redoks status u ćeliji takođe utiče na sintezu ceramida, putem glutationom (GSH) posredovane inhibicije dihidroceramid desaturaze. Osim toga, ceramidi mogu uticati na ekspresiju gena za proinflamatorne citokine aktivacijom NF- κ B (173).

Ceramidi mogu nastati i hidrolizom sfingomijelina u ćelijskim membranama posredstvom neutralne sfingomijelinaze (173). Bitno je napomenuti da u toku inflamacije dolazi do porasta aktivnosti sfingomijelinaze. Nasuprot tome, GSH deluje kao negativan modulator aktivnosti ovog enzima, tako da smanjenje koncentracije GSH dovodi do porasta aktivnosti sfingomijelinaze (175). Ispitivanja sprovedena na ćelijskim kulturama pokazala su da IL-1 β dovodi do porasta produkcije sfingomijelina i ceramida u hepatocitima (173).

Gojazni miševi sa steatozom imaju povećanu koncentraciju ceramida u jetri. Inhibicija sinteze ceramida miriocinom dovodi do redukcije stepena makrovezikularne steatoze, kao i sadržaja TG u hepatocitima (173).

Ceramidi doprinose nastanku IR, prvenstveno narušavanjem insulinske signalizacije u jetri i skeletnim mišićima. Pokazano je da ovi sfingolipidi u skeletnim mišićima smanjuju insulinsku senzitivnost redukujući GLUT4 translokaciju i preuzimanje glukoze u ćelije. Sa druge strane, ceramidi u jetri deluju prevashodno povećavajući aktivnost serin kinaza (inhibitor κ B kinaze- β / $\text{I}\kappa\text{B}\kappa$ - β / i JNK), za koje je poznato da inhibiraju insulinski signalni put (173).

Nedavno je sugerisano da je jedan od potencijanih hepatoprotektivnih mehanizama adiponektina posredovan smanjenjem koncentracije hepatskih ceramida. Adiponektin je antiinflamatorni citokin, koji poboljšava insulinsku senzitivnost inhibicijom glukoneogeneze i lipogeneze, kao i porastom intenziteta oksidacije SMK u mitohondrijama hepatocita (176, 177). Uz to, adiponektin smanjuje nivo ceramida u hepatocitima, dovodeći do porasta aktivnosti ceramidaze, koja ceramid prevodi u sfingozin-1-fosfat (173). Na ovaj način poboljšava se insulinska senzitivnost jetre, što ukazuje na potencijalne terapijske efekte adiponektinom posredovane modulacije koncentracije ceramida (173).

1.5.5. Uloga oksidativnog / nitrozativnog stresa i mitohondrijalne disfunkcije

Savremena istraživanja ukazuju na značajnu ulogu oksidativnog i nitrozativnog stresa (OS, NS) u razvoju NAFLD (178, 179). Posebno je značajna njihova uloga u progresiji hepatocelularnog oštećenja, indukciji i progresiji inflamacije i fibroze (178). Slobodni radikali su izrazito nestabilni i reaktivni atomi ili molekuli koji sadrže nesparene elektrone u spoljašnjoj orbiti (179). Stvaranje slobodnih radikala je fiziološki proces povezan sa aerobnom prirodom ćelijskog metabolizma (179). Tokom normalnog metabolizma ćelije stvaraju se slobodne kiseoničke (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i reaktivne azotne vrste (RNS, engl. *reactive nitrogen species*). U niskim koncentracijama ROS i RNS imaju ulogu zaštite ćelije od različitih štetnih uticaja, učestvuju u procesima digestije fagocitovanih čestica, i posreduju u intracelularnoj signalizaciji (179). Kao signalni molekuli uključeni su u procese regulacije ćelijske transkripcije, proliferacije, maligne alteracije, kao i aktivacije programirane ćelijske smrti (180).

Kada se poveća produkcija slobodnih radikala i time naruši redoks potencijal, ispoljava se njihov negativan efekat, odnosno dolazi do OS. Usled povećanog stvaranja slobodnih radikala i smanjenog kapaciteta antioksidativne zaštite dolazi do poremećaja „redoks homeostaze,“ i posledičnog oštećenja ćelijskih lipida, proteina i nukleinskih kiselina (180). U toku NAFLD raste produkcija ROS, kao što su singlet kiseonik, superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksi radikal (OH^-). Hepatociti poseduju sisteme antioksidativne zaštite za sprečavanje prekomernog porasta koncentracije ROS i RNS, koji se u okviru normalnog ćelijskog metabolizma neprekidno stvaraju i razgrađuju. U ćelijsku antioksidativnu zaštitu su uključeni različiti enzimi (katalaza, superoksid dismutaza /SOD/, glutation peroksidaza, i dr.) i neenzimske biološki aktivne materije (GSH, vitamini /A, C, E, i dr./, i sl.) (180).

Kao što je već prethodno naglašeno, u toku NAFLD dolazi do porasta produkcije ROS i RNS, i poremećene funkcije antioksidativnih protektivnih mehanizama (133, 181). Glavni izvori slobodnih radikala su mikrozomalni enzimi oksidacije SMK (naročito citohrom P4502E1 /CYP2E1/), lipooksigenazni i ciklooksigenazni signalni putevi, mitohondrijalna disfunkcija, ksantin oksidaza, kao i porast intracelularne koncentracije gvožđa (Fe) (133). Osim toga, dodatni izvor ROS predstavljaju aktivirane

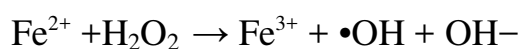
Kupferove (*Kupffer*) ćelije, kao i druge inflamatorne ćelije koje proizvode ROS usled pojačane aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze (133). U mitohondrijama se odvijaju oksido-redukциони procesi (oksidativna fosforilacija, β -oksidacija SMK, i dr.), koje odlikuje stvaranje veće količine ROS (180). S tim u vezi, u uslovima OS, mitohondrije postaju podložne oksidativnom oštećenju, što posledično dovodi do njihove disfunkcije. Tom prilikom iz ovih ćelijskih organela u citoplazmu se oslobađa veća količina ROS, pa nastaje specifičan začarani krug (*circulus vitiosus*) oksidativnog oštećenja hepatocita (182). Smatra se da su mitohondrijalna disfunkcija i inflamatorne ćelije glavni izvor ROS u toku progresije jednostavne steatoze u NASH (180). Osim toga, pokazano je da je kod miševa hranjenih dijetom bogatom mastima (HFD, engl. *high fat diet*) u jetri i masnom tkivu došlo do porasta ekspresije gena odgovornih za povećanu produkciju pre pojave IR. To ukazuje da slobodni radikali doprinose razvoju IR u toku primene HFD (183, 184). Budući da su mitohondrije glavni izvor ROS, u njima su razvijeni mehanizmi antioksidativne zaštite, kao što su GSH, SOD i glutation peroksidaza (179).

U mitohondrijama i citoplazmi se nalazi $O_2^{\bullet-}$, kojeg zatim SOD katalitičkim putem konvertuje u manje toksičnu ROS, H_2O_2 . U hepatocitima postoje dve izoforme ovog enzima, manganSOD (MnSOD, prvenstveno prisutna u mitohondrijama) i bakar/cinkSOD (Cu/ZnSOD, pretežno zastupljena u citoplazmi) (133). Disfunkcija mitohondrija u značajnoj meri doprinosi nastanku i razvoju OS, uglavnom usled smanjene ekspresije mitohondrijalne DNK. Tako, nastaje redukcija aktivnosti respiratornog kompleksa I, III, IV, i ATP-sintaznog kompleksa V, dovodeći do porasta mitohondrijalne produkcije $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 (179). Dodatni izvor $O_2^{\bullet-}$ je i ksantin oksidaza, koja je u citosolu uključena u metaboličke procese razgradnje purina. Ovaj enzim prevodi hipoksantin u ksantin, pa se ksantin dalje konvertuje u mokraćnu kiselinu. U oba ova koraka dolazi do redukcije kiseonika, pri čemu nastaje $O_2^{\bullet-}$.

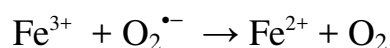
Aktivnost NADPH oksidaze predstavlja važan izvor ROS. Različite izoforme ovog enzima eksprimirane su u hepatocitima, stelatnim i Kupferovim ćelijama, kao i u mononuklearnim i polimorfonuklearnim ćelijama inflamatornog infiltrata (179, 180). Katalitičkim dejstvom ovog enzima dolazi do porasta produkcije $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 (179).

Mikrozomalni enzimi oksidacije SMK, koji su od značaja za normalno odvijanje metabolizma SMK, holesterola, žučnih kiselina, kao i katabolizam ksenobiotika (CYP2E1, i dr), takođe predstavljaju dodatni izvor ROS. U tom pogledu, CYP2E1 i CYP4A imaju istaknutu ulogu u lipooksigenaciji dugolančanih SMK, čime se sprečava ispoljavanje njihovih potencijalno toksičnih efekata, pri čemu kao sporedni produkt nastaju ROS (184). Aktivnost CYP2E1 se povećava posredstvom različitih faktora, kao što su SMK, ketoni, etanol, IR, i dr. (184). Najveća aktivnost ovog enzima u toku NAFLD uočena je u acinusnoj zoni 3, koja u suštini predstavlja primarno mesto oštećenja parenhima jetre u NASH (184). Istraživanja pokazuju da kod transgenih miševa sa prekomernom ekspresijom CYP2E1 dolazi do nishodne regulacije insulinskih signalnih puteva, doprinoseći na taj način nastanku IR u toku NAFLD (185, 186).

Produkcija ROS je najčešće potpomognuta učešćem redoks-aktivnih metala, koji umnogome utiču na redoks status ćelije. U fiziološkim uslovima mehanizmi regulacije intracelularne koncentracije Fe onemogućavaju nakupljanje prekomerne količine slobodnog Fe u ćeliji (187). U *in vivo* uslovima u stanju OS, višak $O_2^{\bullet-}$ povećava koncentraciju slobodnog Fe, oslobađajući ga iz molekula koji ga sadrže. Pokazano je da $O_2^{\bullet-}$ može da oslobodi Fe iz enzima koji sadrže 4Fe–4S grupu (familija dehidratazaliaza, i dr.) (119). Na taj način, u uslovima intracelularnog OS $O_2^{\bullet-}$ ispoljava oksidativno dejstvo na enzime koji sadrže 4Fe–4S grupu, olakšavajući, pri tom, nastanak OH^- iz H_2O_2 , što posledično dovodi do izdvajanja Fe^{2+} (187). Oslobođeno Fe^{2+} može da učestvuje u Fentonovoj reakciji, stvarajući tim putem veoma reaktivni OH^- :

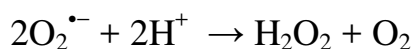


Takođe, $O_2^{\bullet-}$ učestvuje u Haber-Vajsovoj (*Heber-Weiss*) reakciji, koja kombinuje Fentonovu reakciju sa redukcijom Fe^{3+} uz pomoć $O_2^{\bullet-}$, dajući, pri tom, Fe^{2+} i molekularni kiseonik (O_2):



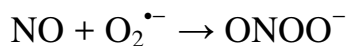
Imajući u vidu da $O_2^{\bullet-}$ ima sposobnost da daljim reakcijama stvara druge ROS, neophodno je da se ovaj citotoksičan oksidacijski agens što pre redukuje u

intracelularnom prostoru (187). Redukcija $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 vrši se pod katalitičkim uplivom SOD:



Azot monoksid (NO, engl. *nitric oxide*) je vrlo reaktivan slobodni radikal, koji u fiziološkim uslovima funkcioniše kao signalni molekul. On učestvuje u regulaciji različitih fizioloških procesa, uključujući neurotransmisiju, održavanje krvnog pritiska u fiziološkim okvirima, mehanizme nespecifične zaštite, relaksaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, i dr. (187). NO nastaje u tkivima posredstvom katalitičke aktivnosti NO sintaze (NOS, engl. *nitric oxide synthase*), koja metaboliše arginin do citrulina. Pokazano je da NO u jetri ispoljava dualističko dejstvo, u zavisnosti od količine u kojoj se sintetiše, kao i intenziteta hepatske produkcije ROS. U uslovima smanjene produkcije ROS, NO ispoljava citoprotektivno dejstvo, dok u stanju OS, NO može delovati kao agens nitrozativnog oštećenja hepatocita (187).

Fiziološki najveći deo NO se sintetiše u sinusoidnim endotelnim ćelijama jetre katalitičkim dejstvom konstitutivne NO sintaze (eNOS) i u tom vaskularnom odeljku ispoljava vazodilatatorno i antiagregaciono dejstvo. U NASH dolazi do povećanja produkcije NO, usled aktivacije Kupferovih, endotelnih i zvezdastih (stelatnih, *Ito*) ćelija. Povećana sinteza NO u ovim ćelijama je posledica aktivacije inducibilne NO sintaze (iNOS), do koje dovode endotoksini Gram negativnih bakterija crevne mikroflore i različiti medijatori zapaljenjske reakcije. U uslovima NS, u hepatocitima se povećava produkcija NO, koji u sledećem metaboličkom koraku ispoljava citotoksična dejstva usled povećanog stvaranja izrazito reaktivnih RNS, peroksinitrita ($ONOO^-$) i azot trioksida (N_2O_3) (187). $ONOO^-$ nastaje u reakciji NO sa $O_2^{\bullet-}$:



$ONOO^-$ spada u grupu vrlo snažnih oksidacionih sredstava koji mogu uzrokovati fragmentaciju DNK i lipidnu peroksidaciju. N_2O_3 nastaje u reakciji NO sa O_2 . U stanjima narušene ravnoteže između oksidanasa i antioksidanasa u korist rasplamsavanja i dodatnog održavanja OS i NS, oba ova reaktivna azotna jedinjenja mogu da uzrokuju poremećaje funkcije biomakromolekula. Štaviše, tom prilikom

najčešće dolazi do fragmentacije lanaca DNK, inaktivacije enzima i strukturnih proteina, i lipidne peroksidacije (187).

Oksidativno/nitrozativno oštećenje hepatocita može da nastane na tri načina, to jest u toku lipidne peroksidacije, stimulacije produkcije citokina i Fas-ligand indukcijom apoptoze.

U uslovima OS dolazi do oštećenja polinezasićenih rezidua masnih kiselina, koje se nalaze u sastavu membranskih fosfolipida. Proces lipidne peroksidacije, kojem su rezidue ovih lipidnih molekula naročito podložne, protiče kroz tri faze, odnosno fazu inicijacije, propagacije i terminacije (187). Naime, $O_2^{\bullet -}$ u reakciji sa polinezasićenim masnim kiselinama fosfolipida dovodi do stvaranja hidroperoksil radikala, čime otpočinje inicijalna faza lipidne peroksidacije. U sledećem koraku peroksidacije lipida, nastaje peroksi radikal (ROO^{\bullet}), koji, zatim, ulazi u proces ciklizacije i prevodi se u endoperokside. Nakon toga, od endoperoksida kao prekursora sintetiše se malondialdehid (MDA) (187). Drugi značajan produkt lipidne peroksidacije je 4-hidroksinonenal (4-HNE). Oba ova citotoksična lipidna produkta mogu da aktiviraju stelatne ćelije, dovodeći, pri tom, do porasta sinteze kolagena u jetri.

Mitohondrije su najviše oštećene delovanjem slobodnih radikala u poređenju sa ostalim ćelijskim organelama (180). U ovim organelama smanjuje se membranski potencijal i dolazi do narušavanja permeabilnosti njihovih membrana. Zatim se oslobađa kaspaza 3, koja pokreće mehanizam programirane ćelijske smrti, tako da je oksidativno oštećenje mitohondrija jedan od mehanizama inicijacije apoptoze hepatocita. Takođe, zbog poremećene funkcije mitohondrija, redukuje se intenzitet β -oksidacije SMK, što doprinosi nastanku i razvoju mikrovezikularne steatoze jetre (180).

Podaci iz literature ukazuju da ROS povećavaju ekspresiju Fas liganada, koji se potom vezuju za odgovarajuće membranske receptore, što posledično dovodi do aktivacije kaspaza i procesa apoptoze (180). Takođe, Fas aktivacija je povezana sa pokretanjem intracelularnih signalnih puteva stresa (MAP kinaznog puta i puta aktivacije NF κ B), povećavajući, pri tom, sintezu brojnih faktora hemotakse, kao što su TNF- α , transformišući faktor rasta- β (TGF- β , engl. *transforming growth factor- β*), IL-6 IL-8, i dr. (180). Ovi hemoatraktanti stimulišu infiltraciju jetre PMN, što predstavlja

ključnu patohistološku karakteristiku NASH. Lipidna peroksidacija, kao i povećano stvaranje i oslobađanje hemokina u uslovima oksidativno/nitrozativnog hepatičkog oštećenja u velikoj meri doprinose progresiji steatoze u NASH (180).

1.5.6. Mehanizmi progresije steatoze u steatohepatitis

NASH predstavlja razvijenu formu NAFLD, koja može dalje da progredira u fibrozu i cirozu jetre. Ključni faktori u progresiji NASH su OS, mitohondrijalna disfunkcija, lipotoksičnost, IR, crevni endotoksini, kao i proinflamatorni citokini i adipokini (136). Pokazano je da steatoza ne ispoljava striktno progresivni karakter, odnosno ne dovodi neminovno do nastanka i razvoja NASH. Razloge za različite varijante toka bolesti treba tražiti u delovanju ne samo sredinskih, već i genetskih i epigenetskih faktora (187).

U toku steatoze hepatociti su preopterećeni viškom TG i SMK. S tim u vezi, hepatociti su razvili protektivne mehanizme, kojima se redukuje količina akumuliranih TG i SMK i samim tim sprečava potiskivanje subcelularnih struktura. U tom smislu, antisteatozni efekat ispoljava porast sekrecije VLDL, koji se odvija u početnom stadijumu intracelularne akumulacije TG. Međutim, sa progresijom bolesti, ovaj mehanizam takođe progresivno slabi. Uz to, porast intenziteta β -oksidacije predstavlja dodatni citoprotektivni mehanizam SMK (188, 189). Mada još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi koji dovode do intenziviranja β -oksidacije u toku steatoze, smatra se da su SMK i PPAR- α glavni induktori ovoga metaboličkog procesa, s obzirom da stimulišu karnitin palmitoil transferazu-1 (CPT-1), koja zatim povećava dopremanje SMK u mitohondrije (136). Usled intenzivne *de novo* lipogeneze i prekomernog hepatičkog influksa SMK koje potiču iz masnog tkiva, prevazilazi se metabolički kapacitet mitohondrija, što potom dovodi do povećane produkcije ROS i indukcije inflamatornih puteva (136). Osim toga, ustanovljeno je da sinergističko dejstvo ROS i oksidovanih LDL čestica (oxLDL) može da indukuje aktivaciju Kupferovih i stelatnih ćelija, započinjući na taj način infamaciju i fibrozu u parenhimu jetre (136).

Indukcija inflamatornih puteva u NASH se delimično može objasniti smanjenom produkcijom adiponektina i drugih antiinflamatornih faktora (190). NF- κ B

je transkripcijski faktor koji predstavlja glavni regulator aktivacije inflamatorne kaskade u NASH. U tom procesu, IKK2 sastavna subjedinica ovog nuklearnog faktora ima glavnu ulogu u njegovoj aktivaciji. Dosadašnja eksperimentalna i klinička istraživanja ukazala su na značajnu ulogu aktivacije NF- κ B inflamatornog puta u NASH (136). Prekomerna ekspresija IKK2 i posledična aktivacija NF- κ B u hepatocitima dovodi do razvoja hronične inflamacije i IR, kao posledica povećanog stvaranja proinflamatornih i profibrogenih faktora (TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β , i dr.) (135, 136). Pokazano je da je porast koncentracije TNF- α u serumu i tkivu jetre u pozitivnoj korelaciji, kako sa patohistološkim pokazateljima progresije bolesti, tako i sa stepenom IR (135). Slično tome, publikovani podaci ukazuju da je povećana serumska i hepatska koncentracija IL-6 u pozitivnoj korelaciji sa stepenom inflamacije i fibroze u jetri eksperimentalnih životinja i pacijenata sa NASH (135). Takođe, podaci iz literature ukazuju da je povećana produkcija proinflamatornih i profibrogenih faktora (TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β , i dr.) od ključnog značaja u progresiji steatoze u steatohepatitis. Naime, eksperimentalnim istraživanjima je utvrđeno da primena ovih citokina dovodi do ispoljavanja patohistoloških karakteristika NASH, kao što su nekroza i apoptoza hepatocita, hemotaksa neutrofila i ostalih PMN, prisustvo Malorijevih telašaca, kao i aktivacija stelatnih ćelija (191). TNF- α , koji se nalazi u tkivu jetre, jednim delom potiče iz masnog tkiva, dok preostala količina ovog citokina nastaje u hepatocitima i aktiviranim Kupferovim ćelijama. U toku progresije steatoze u steatohepatitis, hepatski porast sadržaja TNF- α indukuje produkciju RNS, direktno utiče na enzime transportnog lanca elektorna i dovodi do smrti hepatocita aktivacijom kaspaze 8 (178).

TGF- β kao proinflamatorni i profibrogeni faktor indukuje tkivne transglutaminaze, koje zatim dovode do unakrsnog povezivanja citokeratina, što se nalazi u osnovi formiranja Malorijevih telašaca (178). Glavni izvor ovog citokina u NASH su Kupferove ćelije. Ove ćelije proizvode TGF- β , a on potom aktivira stelatne ćelije u miofibroblaste koji sintetišu kolagen, što posledično dovodi do progresije inflamacije u fibrozu (178).

1.5.7. Uloga masnog tkiva, proinflamatornih citokina i adipokina u progresiji

NAFLD

Masno tkivo i njegovi produkti imaju posebno važnu ulogu u razvoju steatoze i u njenoj progresiji u steatohepatitis. Porast količine masnog tkiva dovodi do hronične

niskostepene inflamacije. Ovo stanje hronične inflamacije predstavlja zajednički patogenetski faktor u procesima ateroskleroze, IR i NASH. Inflamaciju niskog stepena odlikuje dvostruko i/ili trostruko porastom nivoa citokina, kao što su TNF, IL-6, CRP (C-reaktivni protein) i dr. Povećan broj i kvalitativna izmenjenost ćelija masnog tkiva u gojznosti mogu dovesti do hronične aktivacije imunskog sistema sa posledničnim razvojem IR, MS i DM tip 2 (192). Pretpostavlja se da gojznost aktivira imunski sistem preko disfunkcije organela adipocita i posredstvom hipoksije masnog tkiva. Disfunkcija mitohondrija dovodi do razvoja OS zbog energetskog "prepunjavanja" SMK u hipertrofisanom masnom tkivu. OS usled povećanog stvaranja slobodnih radikala aktivira imunski sistem putem NF- κ B i drugih redoks-senzitivnih transkripcijskih faktora (193). Takođe, i disfunkcija ER u stanjima viška hranljivih materija dovodi do pojačane inflamacije preko tri transmembranska proteina koji posledično aktiviraju NF- κ B. Tokom hipoksije masnog tkiva, u gojznosti adipociti produkuju transkripcioni faktor indukovani hipoksijom (HIF-1 α , engl. *hypoxia-inducible factor-1 α*), koji aktivira gene zadužene za angiogenezu, metabolizam glukoze, ćelijski stres i inflamaciju (194, 195). Takođe, utvrđeno je da u hipoksičnim uslovima dolazi do smanjenog stvaranja adiponektina, dok je produkcija leptina i IL-6 povećana, što dodatno doprinosi održavanju inflamacije u masnom tkivu (196). Nasuprot tome, gubitak telesne težine značajno poboljšava oksigenaciju masnog tkiva i dovodi do povećanja ekspresije adiponektina (197). Podaci *in vitro* studija pokazuju da humani preadipociti u uslovima hipoksije pojačavaju ekspresiju leptinskih receptora, i istovremeno smanjuju ispoljavanje PPAR γ receptora (198).

Utvrđeno je da se fenotip i broj makrofaga značajno razlikuju kod gojznih i normalno uhranjenih osoba (199). Takođe je utvrđeno da je stepen inflamacije masnog tkiva makrofagima povezan sa progresijom IR i NAFLD. To znači da kako gojznost napreduje, tako sve više makrofaga menja svoj fenotip, tj. prelazi sa M₂ fenotipa (antiinflamacijski citokinski profil) na M₁ fenotip (inflamacijski citokinski profil) (199). M₁ makrofagi sekretuju TNF- α , IL-1 β , IL-6, i druge citokine, koji rasplamsavaju zapaljenjski proces, dok M₂ makrofagi oslobađaju IL-10, antagonist IL-1 receptora, i sl. (200). Infiltracija masnog tkiva M₁ makrofagima dodatno podstiče migraciju imunskih ćelija i doprinosi razvoju hroničnog zapaljenjskog procesa (201). Danas se smatra da nekroza adipocita u toku razvoja gojznosti predstavlja primarni fagocitni stimulus koji

omogućava makrofagnu infiltraciju masnog tkiva (202). Uz to, različite studije ukazuju na vezu između faktora koji inhibira migraciju makrofaga (MIF, engl. *migratory inhibiting factor*) i IR (202, 203). S tim u vezi, MIF stimuliše sekreciju TNF- α , IL-6 i IL-1 β , a inhibira oslobađanje IL-10, što dovodi do ispoljavanja inflamacijskog fenotipa makrofaga. Takođe, pokazano je da sa porastom stepena IR adipocita raste sekrecija MIF, čime se razbuktava postojeći zapaljenjski proces u masnom tkivu (203). U MIF -/- miševa (miševi bez funkcionalnog MIF) je uočena značajna redukcija lokalnog zapaljenjskog procesa u masnom tkivu, smanjenje makrofagne infiltracije i porast insulinske senzitivnosti ne samo u masnom tkivu, već i na sistemskom nivou (204).

Masno tkivo usled hronične inflamacije oslobađa brojne biološki aktivne supstance (IL-1 β , IL-6, TNF- α , monocitni protein-hemotakse-1 /MCP-1/, adipokine, i dr.). Povećana ekspresija MCP-1 podstiče monocitnu infiltraciju belog masnog tkiva, a zatim se monociti transformišu u rezidentne makrofage masnog tkiva (200). Adipociti utiču i na povećanje ekspresije adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama (ICAM-1, engl. *intracellular adhesion molecule-1* i PECAM-1, engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), što dalje stimuliše migraciju monocita prema masnom tkivu (200). Pored adipocita, sekretornu aktivnost u masnom tkivu obavljaju i aktivirani makrofagi, koji lučenjem hemokina i drugih proinflamatornih citokina omogućavaju održavanje i progresiju zapaljenjskog procesa (200). Osim proinflamatornih citokina u masnom tkivu nastaju i adipokini (leptin, adiponektin, rezistin, hemerin, omentin i apelin) koji ispoljavaju autokrino, parakrino i endokrino dejstvo, utičući na unos hrane, utrošak energije, metabolizam, te samim tim i na progresiju NAFLD (205). Pokazano je da poremećaji sekrecije i odnosa između pojedinih adipokina u velikoj meri doprinose progresiji NASH, kao i razvoju ciroze jetre nastale progresijom NASH (205). Adipokine, prema potencijalnoj ulozi u patogenezi NAFLD, možemo podeliti na one koji imaju pozitivan, odnosno negativan uticaj. Adiponektin je adipokin sa pozitivnom, to jest suprimirajućom ulogom u razvoju NAFLD, dok rezistin ima sasvim suprotno dejstvo (206). Adiponektin smanjuje stepen IR, ima antisteatotično i antiinflamatorno dejstvo, dok neki drugi produkti masnog tkiva, kao što je TNF- α , povećavaju stepen IR i deluju proinflamatorno. Adiponektin inhibira ekspresiju i sekreciju TNF- α , i na taj način smanjuje IR (206). Sa druge strane, TNF- α suprimira transkripciju gena za adiponektin, povećavajući IR. U normalnim uslovima, postoji balans između adiponektina i TNF- α ,

koji sa porastom količine masnog tkiva dovodi do hronične, niskostepene inflamacije, IR i NAFLD (206). Osim toga, značajnu ulogu ima i odnos između visfatina, IL-6 i TNF- α . Visfatin ima imunomodulatorno i proinflamatorno dejstvo, s obzirom da indukuje sintezu IL-6 i TNF- α (205).

Leptin je prvi opisan adipokin (207). U hipotalamusu leptin stimuliše stvaranje anoreksigenih peptida (α -MSH / α -melanostimulišući hormon/ i CART /engl. *cocain and amphetamine regulated transcript*/), čime se smanjuje unos hrane (208, 209). Osim uloge u regulaciji apetita, leptin utiče i na gustinu koštane mase, imunski sistem i reproduktivnu funkciju. Tako, hipoleptinemija dovodi do smanjene sekrecije gonadotropina, pa nastaje inhibicija ovulacije (210). Koncentracija leptina u serumu je visoka kod gojaznih osoba, tj. proporcionalna je BMI. Nasuprot tome, sadržaj leptina opada sa smanjenjem unosa kalorija i u stanjima gladovanja, pa se niski nivoi leptina smatraju znakom negativnog energetskog bilansa (208). Eksperimenti *in vivo* su pokazali da osim gojaznosti, glukokortikoidi, glukoza i insulin povećavaju nivo leptina u krvi (211), dok redukovan unos hrane, prekomerna fizička aktivnost i gubitak telesne težine snižavaju nivo ovog adipokina (212). Pored toga, pokazano je da leptin snižava sadržaj masti u miocitima, hepatocitima i β ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa (213). Leptin direktno stimuliše adenzin monofosfat kinazu (AMPK), koja aktivira β -oksidaciju i glikolizu (214). Životinje sa nedostatkom leptina (*ob/ob* miševi, *db/db* miševi i *fa/fa* pacovi) su gojazne, sa razvijenom IR i masnom jetrom, dok primenom injekcija leptina dolazi do ublažavanja steatoze i metaboličkih poremećaja. Kod ljudi terapija leptinom snižava aktivnost hepatičkih enzima i masti, smanjuje BMI i poboljšava histopatološki nalaz jetre. Ustanovljeno je da leptin spada u glavne faktore koji su uključeni u fibrogenezu, imajući u vidu da stimuliše oslobađanje TGF- β i direktno aktivira zvezdaste (stelatne) ćelije (215). Pokazano je da leptin deluje proinflamatorno i profibrogeno posredstvom povećanja aktivnosti NADPH oksidaze, dovodeći, na taj način, do ushodne regulacije miR21, koji predstavlja ključni regulator TGF- β signalnog puta (216).

Adiponektin, mada u najvećoj meri nastaje u masnom tkivu, mogu sintetisati hepatociti i druge ćelije, obično kao odgovor na oštećenje parenhima jetre (205). Za razliku od ostalih adipokina, nivo adiponektina je obrnuto proporcionalan količini

masnog tkiva, a direktno je proporcionalan stepenu insulinske senzitivnosti (205). Tako, na primer, nivo adiponektina u serumu je snižen od 20% do 40% kod gojaznih osoba sa razvijenom NAFLD u odnosu na zdrave osobe (217). Adiponektin svoje efekte ostvaruje preko transmembranskih receptora (AdipoR1 i AdipoR2) (205). Oba ova receptora prisutna su u skeletnim mišićima i jetri, pri čemu je ekspresija AdipoR2 izraženija u jetri (205). Adiponektin posredstvom svojih receptora u jetri (pretežno AdipoR2) potencira inhibitorno dejstvo insulina na glukoneogenezu, popravljajući insulinsku senzitivnost, a time i periferno preuzimanje glukoze (217). Štaviše, ustanovljeno je da nedostatak adiponektina predstavlja važan faktor rizika za nastanak masne jetre, steatohepatitisa i ostalih vidova oštećenja jetre (218). Kod pacijenata sa DM tip 2, koncentracija adiponektina je obrnuto proporcionalna sadržaju masti u jetri (219). Studije na animalnim modelima su pokazale da adiponektin ispoljava snažne zaštitne efekte na različita oštećenja jetre (218, 220). U skeletnim mišićima adiponektin stimuliše β -oksidaciju SMK, čime se smanjuje količina TG u skeletnim mišićnim ćelijama, i na taj način smanjuje IR (218). Osim toga, smatra se da adiponektin sprečava apoptozu adipocita, kao jedno od obeležja NAFLD (221). Pored hepatocita, ovaj adipokin ispoljava i antiinflamatorne i antifibrogene efekte, delujući na stelatne ćelije, Kupferove ćelije, kao i na ćelije sinusoida (205). Ovo antiinflamatorno dejstvo ostvaruje se supresijom gena za proinflamatorne citokine (TNF- α i IL-6) i indukcijom antiinflamatornih citokina (IL-10, IL-13, i dr.) (222), dok se antifibrogeni efekat postiže sprečavanjem aktivacije i proliferacije stelatnih ćelija, kao i indukcijom njihove apoptoze (222).

Rezistin je adipokin koga sekretuju makrofagi i adipociti (205). Brojne studije na životinjama su pokazale da jetra, skeletni mišići i masno tkivo predstavljaju ciljne organe dejstva rezistina, pri čemu njegova koncentracija u tkivu jetre raste sa stepenom njenog oštećenja (205, 220). U skeletnim mišićima rezistin smanjuje preuzimanje i metabolisanje SMK, dovodeći na taj način do IR. Pored toga, postoje dokazi da egzogeni tretman rezistinom značajno stimuliše ekspresiju gena za SOCS3, koji je poznat kao inhibitor insulinskih signalnih puteva. Ustanovljeno je, takođe, da rezistin ispoljava proinflamatorno dejstvo, jer stimuliše oslobađanje TNF- α i interleukina 12 (IL-12) iz makrofaga preko NF- κ B signalnog puta (223). Skorašnje studije su pokazale da rezistin indukuje steatozu, smanjujući aktivnost mitohondrija preko signalnog puta

koji uključuje PKC, PKG, p65, kao i putem inhibicije koaktivatora 1 α (PGC-1 α) neophodnog za aktivaciju PPAR- γ (215).

Visfatin proizvode uglavnom makrofagi koji infiltriraju masno tkivo. On je uključen u procese regulacije ćelijskog rasta, apoptoze, replikacije DNK, mehanizme reparacije i angiogeneze, kao i ćelijskog energetskog metabolizma (205). U patogenezi NAFLD visfatin deluje proinflamatorno putem stimulacije produkcije TNF- α , IL-6 i IL-1 β (205). Nasuprot tome, povećanje koncentracije visfatina može da stimuliše produkciju antiinflamatornih citokina, kao što su IL-10, IL-13, i dr. Takođe, pokazani su i pozitivni efekti visfatina na razvoj steatoze, i to uglavnom, kako posredstvom regulacije metabolizma β -ćelija pankreasa, tako i smanjenjem stepena IR (205).

Hemerin je nedavno otkriven adipokin, sa najvećom ekspresijom u jetri i visceralnom masnom tkivu. Ovaj hemokin ispoljava snažan antiinflamatorni efekat na aktivirane makrofage. Pored toga, hemerin ima ključnu ulogu u diferencijaciji adipocita i ekspresiji gena za regulaciju metabolizma glukoze i lipida u ovim ćelijama (224). Na kulturi adipocita je pokazano da hemerin pojačava insulinom stimulisanu preuzimanje glukoze, kao i fosforilaciju insulinskog receptora, što ukazuje na potencijalnu sposobnost hemerina da poveća osetljivost masnog tkiva na insulin (225). Utvrđeno je da primena rekombinantnog TNF- α povećava produkciju hemerina u adipocitima (226). Takođe, uočeno je da ovaj hemokin povećava adhezivnost makrofaga za VCAM-1, (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) i fibronektin, utičući na taj način na inflamatorni proces u jetri (227).

Omentin je adipokin čija je ekspresija prvenstveno registrovana u visceralnom masnom tkivu. Fiziološka uloga ovog adipokina u metabolizmu glukoze, kao i uloga njegovih receptora još uvek nisu u potpunosti istraženi (205). U masnom tkivu omentuma, to jest u ćelijama strome, registrovana je izraženija ekspresija omentina u poređenju sa adipocitima. Smatra se da omentin poboljšava osetljivost na insulin, s obzirom da ovaj adipokin podstiče insulinom stimulisan transport glukoze i fosforilaciju u supkutanim i visceralnim adipocitima (228). Koncentracija omentina u plazmi je u obrnutoj korelaciji sa gojaznošću i IR. Nasuprot tome, zapažena je pozitivna korelacija između sadržaja omentina, adiponektina i HDL (229). U ljudi administracija glukoze i insulina u omentalno masno tkivo dovodi do dozno-zavisnog smanjenja ekspresije

omentina. Omentin postoji u dve izoforme, omentin 1 i omentin 2. Omentin 1 je glavna cirkulišuća forma, koja pozitivno utiče na insulinsku senzitivnost. Koncentracija omentina 1 u cirkulaciji značajno je redukovana kod gojaznih osoba i dijabetičara (DM tip 2) u poređenju sa normalno uhranjenim osobama (230). Kod pacijenata sa histološki potvrđenom NAFLD cirkulišući nivoi omentina bili su značajno povećani u poređenju sa zdravim kontrolama (205).

Apelin je peptidni hormon koji se dovodi u vezu sa IR i gojaznošću. Njegova sekrecija iz brojnih tkiva je regulisana insulinom. U skeletnim mišićima i masnom tkivu apelin ispoljava pozitivne efekte na insulinsku senzitivnost, preuzimanje glukoze i lipolizu. Uz to, ovaj adipokin doprinosi i nastanku inflamacije i angiogeneze (205). Međutim, kliničke studije su ukazale na porast koncentracije apelina u plazmi u toku gojaznosti, smanjene tolerancije glukoze i DM tip 2 (231). Takođe, pokazano je da apelin ima i proinflamatorno dejstvo, budući da je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracije ovog adipokina i proinflamatornih citokina (232, 233).

1.5.8. Mehanizmi progresije NASH u fibrozu i cirozu jetre

Kao posledica hroničnog inflamatornog procesa u jetri može doći do razvoja fibroze i ciroze (234). Fibroza jetre se karakteriše prekomernom akumulacijom proteina ekstracelularnog matriksa, uglavnom kolagena i elastina, kao i glikoproteina, proteoglikana i hijaluronske kiseline (235). Fibrogeneza počinje u perisinusoidnim, Disovim prostorima, u metabolički najvulnerabilnijoj zoni 3 hepatičnih acinusa (perivenozno), ispoljavajući se, inicijalno, pericentralnom fibrozom (235). Iz perisinusoidnih prostora fibrozni proces se širi, okružuje hepatocite i dovodi do zadebljanja Disovih prostora. Sa razvojem ciroze jetre, ovaj pericentralni fibrozni proces se manifestuje formiranjem septi koje izoluju regenerativne nodulose (235). Porast subendotelnog nakupljanja komponenti ekstracelularnog matriksa u Disovim prostorima dovodi do poremećaja razmene materija između hepatocita i krvi, pa hepatociti otežano preuzimaju toksične supstance, uz narušen prelazak biosintetskih produkata iz hepatocita u cirkulaciju (235).

Medijatori hroničnog inflamatornog procesa dovode do aktivacije, fenotipske transformacije i proliferacije hepatičnih stelatnih (*Ito*) ćelija, koje imaju ključnu ulogu u

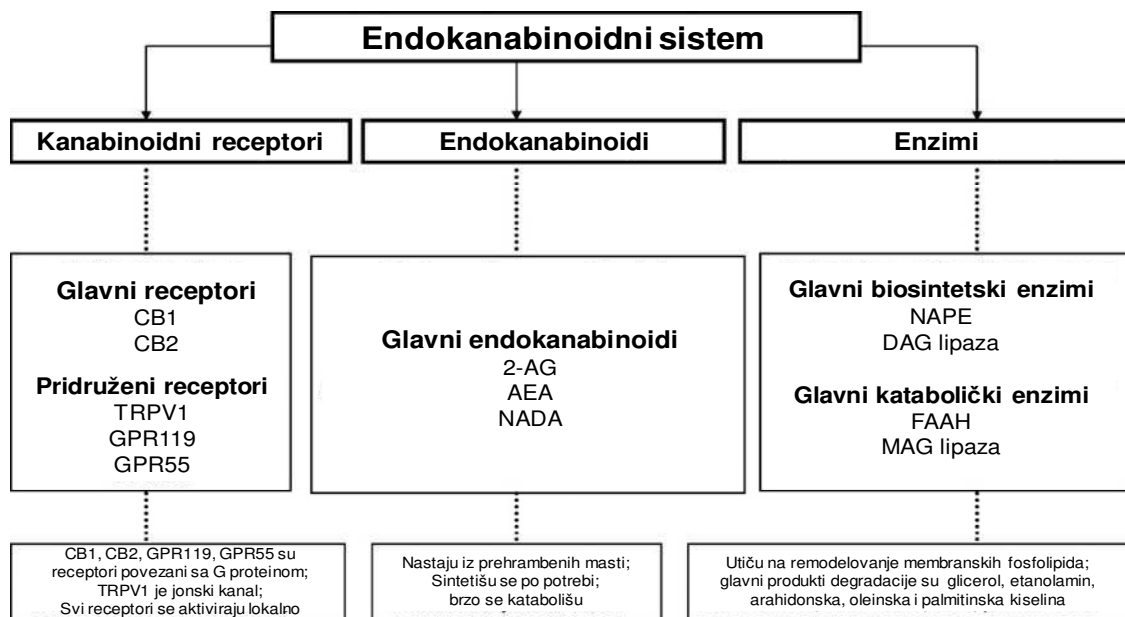
patogenezi fibroze i ciroze jetre (235). U fiziološkim uslovima ove ćelije ispoljavaju slabu proliferativnu aktivnost i imaju ulogu u deponovanju vitamina A. Međutim, u toku hroničnih zapaljenjskih procesa dolazi do njihove fenotipske transformacije u miofibroblaste koji gube depoe vitamina A, pri čemu je povećana ekspresija glatkomišićnog α -aktina. Osim toga, povećava se i njihova proliferativna aktivnost, kao i biosinteza kolagena tipa I i III. Aktivirane stelatne ćelije, odnosno miofibroblasti, imaju sposobnost kontrakcije, doprinoseći na taj način porastu intrahepatične vaskularne rezistencije i razvoju portne hipertenzije u toku fibroze jetre (234). Ovakva fenotipska transformacija stelatnih ćelija posredovana je parakrinim dejstvom medijatora koje stvaraju Kupferove ćelije, hepatociti, endotelne ćelije sinusoida, kao i nehepatične ćelije (trombociti i limfociti). Od profibrogenih medijatora najznačajniji i najefektivniji su TGF- β 1 i trombocitni faktor rasta (PDGF, engl. *platelet derived growth factor*) (235). Osim navedenih faktora, na fibrogenezu utiču i adipokini. Na primer, adiponektin ispoljava antifibrogeno dejstvo i suprimira proliferaciju i migraciju stelatnih ćelija (234). Leptin, iako primarno stvaraju adipociti, može biti sintetisan i u stelatnim ćelijama (234). Tom prilikom nastaju reaktivni aldehidi, koji imaju ulogu, ne samo u progresiji steatoze u NASH, već i u razvoju fibroze jetre. Kako fibroza progredira, tako vremenom dolazi do razvoja ciroze jetre, u toku koje Disovi prostori bivaju ispunjeni fibroznim tkivom, pri čemu se gube fenestre endotelnih ćelija, što posledično dovodi do tzv. sinusoidne kapilarizacije. U histološkom smislu, cirozu jetre karakteriše prisustvo vaskularizovanih fibroznih septi koje razdvajaju ostrvca hepatocita (236).

1.6. OPŠTE KARAKTERISTIKE I ULOGA ENDOKANABINOIDNOG SISTEMA U RAZVOJU NAFLD

Čovek je pokretni kanabis

David Albahari

Dosadašnja eksperimentalna i klinička istraživanja ukazala su na značajnu ulogu endokanabinoidnog sistema (ES) u razvoju NAFLD. ES je kompleksan fiziološki sistem koji se sastoji iz kanabinoidnih receptora (CB1 i CB2), endokanabinoida i enzima uključenih u sintezu i razgradnju endokanabinoida (Shema 1).



Shema 1. Prikaz molekularnog sastava komponenti endokanabinoidnog sistema

Kanabinoidi su hemijski vrlo različite supstance koje aktiviraju kanabinoidne receptore, uključujući fitokanabinoide (nalaze se u biljkama poput marihuane /*cannabis sativa*/), endokanabinoide (koji nastaju u organizmu), kao i sintetske kanabinoide (237). *Cannabis sativa* predstavlja izvor 66 fitokanabinoida, koji se koriste kao rekreaciona droga. Poznata su, takođe, i neka terapijska svojstva ovih fitokanabinoida (238). Dominantni fitokanabinoid u ovoj biljci je tetra-hidro-kanabinol (THC), koji je izolovan i sintetisan 1964. godine (237). Njegovo otkriće posledično je dovelo do identifikacije kanabinoidnih receptora i njihovih endogenih liganada (endokanabinoida). Najviše istraživani endokanabinoidi su anandamid (N-arahidonoiletanolamid, AEA) i 2-arahidonoil-glicerol, to jest 2-AG. Osim toga, otkriveni su i drugi ligandi kanabinoidnih receptora, kao što su noladin etar, virodamin i N-arahidonoildopamin (NADA) (239).

Endokanabinoidi su lipofilni endogeni ligandi kanabinoidnih receptora, čiji su prekursori estri, etri i amidi arahidonske kiseline i drugih dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina (237). ES predstavlja retrogradni signalni sistem, koji u nervnom sistemu i perifernim tkivima inhibira oslobađanje neurotransmitera iz presinaptičkih

neurona (237). Endokanabinoidi se sintetišu u postsinaptičkom završetku, odakle se potom oslobađaju i deluju na presinaptičku membranu posredstvom CB1 i CB2 receptora (238). Do sada najbolje proučeni endokanabinoidi su AEA i 2-AG.

CB1 kanabinoidni receptori identifikovani su u tkivima koja su od posebnog značaja za regulaciju energetske homeostaze (strukture centralnog nervnog sistema /CNS/, jetra, masno tkivo, skeletni mišići, gastrointestinalni trakt i endokrini pankreas). Ekspresija CB1 receptora u ovim tkivima u velikoj meri zavisi od nutritivnog statusa. Tako, u gojaznih osoba i osoba obolelih od NAFLD i MS uočena je povećana aktivnost ES (240). Takođe je poznato da se metabolizam masnih kiselina i modulacija inflamatornog procesa u jetri odvija pod uplivom ES. Međutim, precizni molekularni mehanizmi koji do toga dovode još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (240, 241).

Intracelularna signalna kaskada preko CB1 receptora podrazumeva inhibiciju adenilat ciklaze, smanjenje aktivnosti protein A signalne kaskade i stimulaciju MAP kinaznog puta. Stimulacija CB1 receptora dovodi do aktivacije Gi/o proteina, što deluje inhibitorno na adenilat ciklazom posredovanu konverziju ATP u cAMP. S tim u vezi, cAMP se vezuje za regulatornu subjedinicu protein kinaze A (PKA), dovodeći do oslobađanja katalitičke subjedinice. Ovako aktivirana PKA, fosforiliše A tip kalijumskih kanala, što posledično izaziva smanjenje protoka jona kalijuma (241). Gi/o protein, aktiviran preko CB1 receptora, može direktno da inhibira N ili P/Q tip kalcijumskih kanala. Pored toga, aktivacija CB1 receptora može da aktivira i različite intracelularne kinaze, kao što su fokalna adhezivna kinaza (FAK), fosfatidilinozitol-3-kinaza i MAP kinaza, što dalje aktivira transkripcione faktore i gensku ekspresiju (241). Najznačajniji enzimi koji inhibiraju dejstvo endokanabinoida su FAAH (engl. *fatty acid amide hidrolase*), koja razgrađuje anandamid i u izvesnoj meri 2-AG, kao i monoacilglicerol lipaza (MAG lipaza), koja prvenstveno hidrolizuje 2-AG (176) (Shema 1).

Za razliku od peptidnih i aminergičnih neurotransmitera, endokanabinoidi su derivati arahidonske kiseline, i kao takvi ne mogu biti deponovani u sinaptičkim vezikulama. Pošto je onemogućeno njihovo deponovanje, oni se stvaraju i oslobađaju na zahtev, ostvarujući parakrino i autokrino dejstvo (242). Endokanabinoidi deluju retrogradno, a to znači da se proizvode i oslobađaju na nivou postsinaptičkog završetka

i ostvaruju dejstvo na presinaptičkoj membrani posredstvom CB1 i CB2 receptora (242). Dva najbolje ispitana endokanabinoida, anandamid i 2-AG, su derivati arahidonske kiseline (239).

Savremeni vodiči za ishranu preporučuju da se smanji unos zasićenih SMK i poveća unos polinezasićenih SMK, naročito linoleinske kiseline, imajući u vidu da ova kiselina predstavlja prekursor arahidonske kiseline i endokanabinoida. Linoleinska kiselina se u organizmu najpre prevodi u γ -linoleinsku, potom u eikozatetraenoičnu kiselinu, koja zatim prelazi u arahidonsku kiselinu. U ovom procesu učestvuju dve desaturaze i jedna elongaza (243). Arahidonska kiselina se može različitim putevima prevesti u anandamid. U tom smislu, najčešće se odvija metabolička reakcija između arahidonske kiseline i etanolamida, uz katalitičku aktivnost FAAH, koji predstavlja ključni enzim za razgradnju anandamida (244).

Drugi metabolički put uključen u sintezu N-arahidonoil-etanolamida podrazumeva reakciju arahidonske kiseline sa fosfatidil-etanolamidom u prisustvu kalcijum zavisne N-aciltransferaze, pri čemu nastaje N-arahidonoil-fosfatidil-etanolamid (NAPE). NAPE se u prisustvu enzima N-acilfosfatidiletanolamin specifične fosfolipaze D prevodi u anandamid i fosfatidičnu kiselinu. Smatra se da je NAPE najvažniji izvor anandamida (244). Sinteza 2-AG, takođe, podrazumeva nekoliko metaboličkih puteva. Jedan od tih puteva se odnosi na prevođenje DAG u 2-AG, uz pomoć diacilglicerol lipaze (DAG lipaze), pri čemu DAG nastaje iz fosfatidilinozitola, fosfatidilholina i fosfatidične kiseline posredstvom fosfolipaze C, a iz fosfatidilholina i fosfatidične kiseline i dodatnim posredstvom fosfataze (244).

Endokanabinoidna signalizacija se završava dvostepenim procesom, koji podrazumeva transport endokanabinoida u ćeliju i hidrolizu specifičnim enzimima (240). Oba ova koraka su veoma bitna u kontroli nivoa endokanabinoida u tkivima, omogućavajući njihovu brzu eliminaciju i prestanak dejstva. Endokanabinoidi se u ćeliju preuzimaju pomoću transportera koji je široko rasprostranjen u CNS, omogućavajući preuzimanje i anandamida i 2-AG bez utroška energije (240). Kao što je već istaknuto, hidrolizu endokanabinoida vrše dva enzima, FAAH i monoacilglicerol lipaza (MAG lipaza) (Shema 1). FAAH je membranski enzim i pripada familiji serin

hidrolaza. Mada FAAH može da hidrolizuje i 2-AG, važno je napomenuti da je ključni enzim za njegovu hidrolizu MAG lipaza, koji je takođe serin hidrolaza (240).

Danas se smatra da ES ima važnu ulogu u centralnoj i perifernoj regulaciji opštih anaboličkih procesa. Porast njegovog tonusa u CNS podstiče unos hrane i deponovanje energije. Sistemska i/ili lokalna primena antagonista CB1 receptora smanjuje unos hrane i dovodi do gubitka telesne težine (237).

Zanimljivo je istaći i to da hronična primena CB1 blokatora dovodi samo do prolaznog smanjenja unosa hrane u toku jedne do maksimalno dve nedelje, dok se smanjenje telesne težine, normalizacija glikemije i lipidnog statusa održava sve vreme primene ovih kanabinoidnih blokatora (237, 245). Stoga, može se zaključiti da endokanabinoidi imaju i neka periferna dejstva, koja su, kao i njihova centralna dejstva, usmerena na održavanje anaboličkog tonusa (237, 245). U prilog tome govori činjenica da su CB1 receptori identifikovani u različitim tkivima u kojima se vrši regulacija energetske homeostaze (masno tkivo, jetra, skeletni mišići, gastrointestinalni trakt i endokrini pankreas). Ekspresija CB1 receptora u ovim tkivima zavisi od nutritivnog statusa, tako da je aktivnost ES povećana kod gojaznih osoba. Pored toga, rezultati eksperimentalnih istraživanja su pokazali da su CB1 *nock out* miševi (CB1^{-/-}) otporni na razvoj djetom indukovane gojaznosti (237, 245).

ES utiče na količinu masnog tkiva u organizmu, ne samo posredstvom centralnog mehanizma regulacije apetita, već i preko perifernih metaboličkih efekata na nivou masnog tkiva. Naime, CB1 receptori su prisutni u belom masnom tkivu, i njihova aktivacija povećava aktivnost lipoproteinske lipaze (237). Ovo saznanje ukazuje na to da ES deluje direktno na masno tkivo, doprinosi na taj način akumulaciji masti nezavisno od količine unete hrane. Istraživanja sprovedena na T3T adipocitnoj ćelijskoj liniji miševa pokazala su da blokada CB1 receptora zaustavlja proliferaciju adipocita, odnosno da endokanabinoidi stimulišu proliferaciju ovih ćelija (246). Osim toga, endokanabinoidi imaju značajnu ulogu u diferencijaciji preadipocita u zrele adipocite (246). Endokanabinoidi podstiču lipogenezu u adipocitima prvenstveno stimulacijom adipocita da preuzimaju glukozu, to jest povećanjem insulinom indukovane translokacije GLUT4 transportera (246). Povećano preuzimanje glukoze i posledični

porast glikolize obezbeđuje adipocitima biosintetske prekursore za *de novo* sintezu SMK, što predstavlja osnovu prolifogenog dejstva endokanabinoida (246).

ES u značajnoj meri utiče i na metabolizam SMK u jetri. CB1 receptore ekspimiraju hepatociti, naročito oko centrolobularne vene. Aktivacija CB1 receptora u jetri povećava ekspresiju SREBP-1c, koji zatim reguliše ekspresiju gena uključenih u sintezu SMK, kao i gena za acetil-CoA karboksilazu-1 i sintazu masnih kiselina (156). Ovaj metabolički kaskadni mehanizam se nalazi u osnovi stimulatornog efekta CB1 agonista na sintezu SMK i lipogenezu u hepatocitima.

Skorašnja saznanja ukazuju da je hepatični ES uključen u patogenezu NAFLD. Na eksperimentalnim modelima je utvrđeno da je hepatički sadržaj anandamida povišen i praćen ushodnom regulacijm broja CB1 receptora (242). Uz to, studije na animalnim modelima ukazuju da CB1 receptori u značajnoj meri doprinose razvoju steatoze i IR (242). Tako, CB1^{-/-} miševi ne razvijaju gojaznost i steatozu indukovanu primenom HFD. Osim toga, ovi miševi pokazuju značajno niži stepen IR. S druge strane, kada se fa/fa gojazni pacovi tretiraju rimonabantom (CB1 antagonist), dolazi do poboljšanja steatoze i insulinske senzitivnosti (242).

Podaci iz literature ukazuju i na ulogu ES u razvoju inflamacije udružene sa NASH. Tako je pokazano da stimulacija CB1 receptora redukuje sekreciju adiponektina, koji ispoljava antiinflamatorno dejstvo u jetri (247, 248). CB1 receptori su značajni i za progresiju bolesti, s obzirom da primena rimonabanta ili genetska inaktivacija CB1 receptora u značajnom opsegu redukuje progresiju fibroze jetre (242).

1.7. EKSPERIMENTALNI MODELI NAFLD

U dosadašnjim istraživanjima NAFLD korišćeni su različiti eksperimentalni animalni modeli (ob/ob, db/db, protein koji vezuje sterol regulatorni element 1-c /SREBP-1c/ transgeni miševi i nutritivni modeli) (249). U sklopu nutritivnih modela NAFLD, najčešće se primenjuje HFD i metionin-holin deficijentna dijeta (MCD, engl. *methionine-choline deficient diet*). Uprkos primeni različitih animalnih modela, nijedan od njih ne reflektuje u celini funkcionalne i patohistološke promene humane NAFLD (250).

Da bi eksperimentalni model NAFLD bio reproducibilan, neophodno je da se u jetri verifikuju steatoza, intralobularna infiltracija, balonirano izmenjeni hepatociti, kao i perisinusoidalna fibroza u zoni 3. Pored navedenog, životinja bi trebalo i da ispoljava različite metaboličke abnormalnosti, kao što su gojaznost, IR, hiperglikemija u periodu gladovanja, dislipidemija i izmenjen profil adipokina (249).

Kod SREBP-1c transgenih miševa postoji prekomerna ekspresija SREBP-1c gena, koji predstavlja značajan lipogeni transkripcioni faktor (249). Na taj način nastaje kongenitalna lipodistrofija sa izraženom IR, pri čemu se dijabetes razvija sekundarno, kao posledica poremećene diferencijacije adipocita. U ovom modelu dolazi do smanjenja količine masnog tkiva, uz akumulaciju lipida u jetri. Ovi miševi bi mogli biti od koristi za istraživanje steatohepatitisa udruženog sa lipodistrofijom. Međutim, i dalje ostaje bez odgovora pitanje da li su ovi miševi pogodni za proučavanje humane NAFLD, budući da kod ljudi sa NAFLD dolazi do porasta količine visceralnog masnog tkiva (249).

Kod ob/ob miševa postoji mutacija gena za leptin, koji u fiziološkim uslovima produkuje masno tkivo i ima anoreksigeno dejstvo na nivou ventromedijalnog jedra hipotalamusa (249). Ovi miševi ispoljavaju hiperfagiju, ekstremnu gojaznost, hiperglikemiju, IR, kao i hiperinsulinemiju. Međutim, kod ovih miševa se registruje steatoza, koja spontano ne progredira u steatohepatitis (249).

Kod db/db miševa postoji mutacija gena za leptinski receptor. Prisutna je, takođe, centralna rezistencija na leptin, koja dodatno onemogućava njegovo dejstvo, iako je ovaj adipokin prisutan u cirkulaciji u povišenoj koncentraciji. U db/db miševa se uočava gojaznost, IR, dijabetes i mikrovezikularna steatoza (249).

MCD dijeta ima povišen sadržaj sukroze i masti (40 % sukroze i 10% masti), a manjak metionina i holina (249). Usled deficita metionina, dolazi do nedostatka cisteina, glavnog prekursora GSH, dok zbog nedostatka holina postoji manjak fosfatidilholina, koji je neophodan za formiranje VLDL čestica. Stoga, posledično se akumulira TG u hepatocitima. U uslovima OS dolazi do aktivacije hepatičnih stelatnih i Kupferovih ćelija, koja, zatim, pokreće procese inflamacije i fibroze jetre (251). Steatohepatitis se razvija već desetog dana, a perisinusoidalna fibroza između osme i desete nedelje od početka primene MCD (249). Glavni nedostatak ovog modela je odsustvo ispoljavanja metaboličkih poremećaja, koji se javljaju kod ljudi sa NASH

(249, 251). Naime, dolazi do značajnog gubitka telesne težine (20% telesne težine se gubi nakon treće nedelje), hipoglikemije u periodu gladovanja, hipoinsulinemije i hipoleptinemije, pri čemu je koncentracija adiponektina u serumu normalna ili povećana (249).

Miševi na HFD, koji su najveći deo kalorija dobijali iz masti (71% kalorija iz masti, 11% iz ugljenih hidrata i 18 % iz proteina), razvijaju MS sa NAFLD (250). Osim toga, pokazano je da dolazi do razvoja gojaznosti, porasta aktivnosti AST, IR, hiperinsulinemije, oksidativnog oštećenja hepatocita, kao i disfunkcije mitohondrija (250, 251).

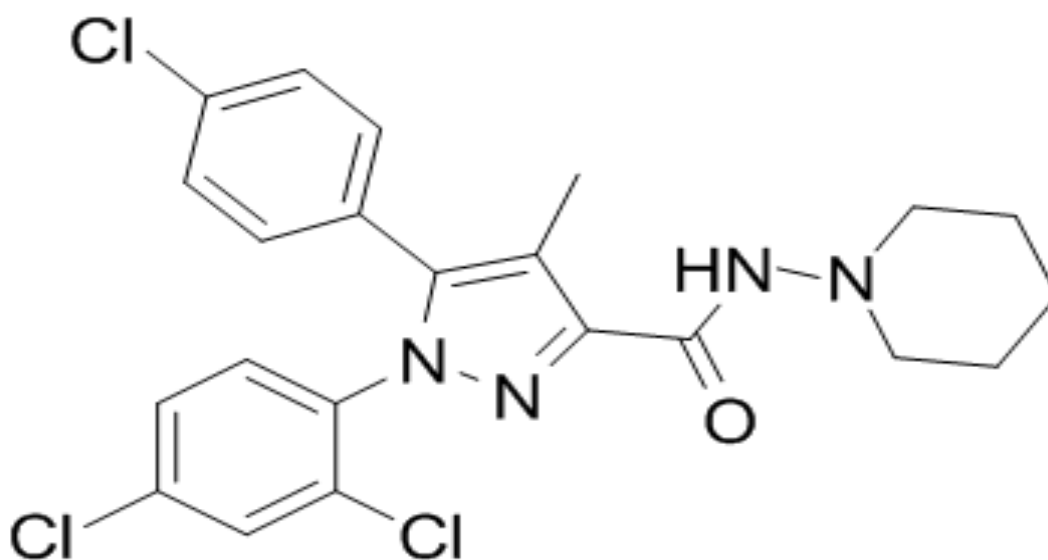
1.8. UTICAJ RIMONABANTA NA PATOGENEZU I PROGRESIJU NAFLD

Imajući u vidu da je aktivnost ES povećana u toku gojaznosti, MS i pridruženim metaboličkim poremećajima, pošlo se od pretpostavke da bi supresija ES mogla da dovede do poboljšanja zdravstvenog stanja (252). Rimonabant (SR141716) je prvi sintetisani blokator CB1 receptora, kako u CNS, tako i na periferiji (251) (Shema 2). Pokazalo se da rimonabant inhibicijom CB1 receptora dovodi do anoreksigenih i termogenih efekata koji su posredovani njegovim dejstvom na kanabinoidne receptore u CNS (253). Osim toga, pokazano je da ovaj CB1 blokator potencira signale sitosti iz gastrointestinalnog trakta, inhibira lipogenezu u jetri i smanjuje depoe masti u masnom tkivu (253).

Efekat rimonabanta na redukciju telesne težine, kao i poboljšanje metaboličkog profila, bio je prilično ohrabrujući. S tim u vezi, sprovedene su velike kliničke studije u cilju ispitivanja dugotrajnih efekata rimonabanta, kao i efikasnosti i bezbednosti ovoga leka (254, 255). Tako su RIO (engl. *rimonabant in obesity*), kliničke studije u Evropi i Severnoj Americi, ispitivale dejstva rimonabanta kod gojaznih pacijenata sa pridruženim metaboličkim poremećajima, dok su RIO-Lipids i RIO-Diabetes studije obuhvatale pacijente sa hiperlipidemijom i dijabetesom. Sve četiri kliničke studije su pokazale veoma slične efekte rimonabanta. Naime, rimonabant je doveo do smanjenja telesne težine u proseku za 4.7 kg, nakon godinu dana od početka njegove primene (256). Uz to, primena rimonabanta je dovela do normalizacije glikemije i poboljšanja

lipidnog statusa (HDL se povećao za 23%, dok se koncentracija TG snizila za 15%) (257).

Kliničke studije dugotrajnih efekata rimonabanta pokazale su da ovaj blokator CB1 receptora uprkos svojoj efikasnosti nije bezbedan za upotrebu, s obzirom da ispoljava brojna neželjena dejstva (mučnina, altralgije, dijareja, anksioznost i teži oblici depresije sa suicidalnim ishodom), što je bio glavni razlog njegovog povlačenja iz upotrebe 2008. godine (258, 259).



Shema 2. Struktura molekula rimonabanta (SR141716)

II CILJEVI

HFD izaziva funkcionalne, metaboličke i strukturne promene u jetri miševa, koje su slične ispoljavanjima NAFLD i MS u ljudi (porast nivoa oksidativnog i nitrozativnog stresa u hepatocitima, smanjenje kapaciteta hepatičke antioksidativne zaštite, izmenjena koncentracija oligoelemenata i masnih kiselina u tkivu jetre, razvoj dislipidemije i disglukemije, kao i hepatičke steatoze, inflamacije i fibroze). Blokada CB1 kanabinoidnih receptora ublažava navedene funkcionalne i strukturne promene, poboljšava metabolički profil u NAFLD izazvanoj HFD i može se koristiti kao potencijalno hepatoprotektivno i terapijsko sredstvo u NAFLD. Stoga su ciljevi ove disertacije bili:

- Ispitati ulogu kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi NAFLD sa posebnim osvrtom na ulogu u razvoju oksidativnog/nitrozativnog stresa, uticaj na kapacitet antioksidativne zaštite, kao i koncentraciju oligoelemenata (Zn, Cu, Mn i Fe) u tkivu jetre
- Ispitati uticaj CB1 receptora na lipidni status, profil masnih kiselina u jetri (palmitinska, stearinska, oleinska, linoleinska i arahidonska kiselina), kao i adipokine (leptin, apelin, rezistin i visfatin) i proinflamatorne citokine (IL-6 i IFN- γ) u masnom tkivu i jetri
- Ispitati uticaj blokade CB1 receptora na glikemiju, koncentraciju insulina i HOMA-IR indeks (HOMA, engl. *homeostatic model assessment*)

III MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su sprovedeni na mužjacima miševa C57BL/6 soja, uzrasta 8 nedelja, težine 21-25 g, odgajenih na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu. Mužjaci miševa ovog soja su korišćeni radi ujednačavanja razlike unutar grupe, jer nema cikličnih promena u reproduktivnom traktu. Životinje su čuvane u pojedinačnim kavezima od pleksiglasa u standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relativna vlažnost vazduha $50 \pm 10\%$, dvanaestočasovni ciklusi svetlost-tama sa uključivanjem svetla u 9 h), pri čemu su im hrana i voda bile dostupne *ad libitum*. Sve eksperimentalne procedure su bile u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (2010/63/EU) i odobrene 22.04.2016. godine od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta u Beogradu (MFUB) (dozvola broj 476/1). Eksperimentalna animalna studija je sprovedena na Institutu za patološku fiziologiju MFUB.

3.2. Eksperimentalni dizajn

NAFLD je izazvana miševima primenom HFD (MP Biochemical, CA, USA), čiji je sastav prikazan u Tabeli 4. Pre samog eksperimenta sve životinje (n=40) bile su hranjene kontrolnom dijetom (standardnom peletiranom hranom za miševe).

Tabela 4. Sastav dijetete sa povećanim sadržajem masti (HFD)

Nutrijenti	%
Prečišćeni kazein	20.00
DL-Metionin	0.30
Sukroza	30.58
Kukuruzni skrob	20.00
Kokosovo ulje	20.00
Alphacel, nenutritivna masa	5.00
DL – α -tokoferol u prahu (250 IU/g)	0.12
AIN – 76 mineralna mešavina	4.00
Ukupno	100

Nakon 8 nedelja životinje su nasumično podeljene na sledeće grupe: 1. kontrolna grupa hranjena kontrolnom dijetom u toku 20 nedelja (C; n=10); 2. grupa hranjena HFD u periodu od devete do dvadesete nedelje (HF; n=10); 3. grupa hranjena kontrolnom dijetom u toku 20 nedelja i tretirana rimonabantom (SR141716) svakodnevno u toku poslednje dve nedelje (R; n=10); 4. grupa hranjena HFD od devete do dvadesete nedelje i tretirana rimonabantom (SR141716) svakodnevno u toku poslednje dve nedelje (HFR; n=10).

Dnevne doze rimonabanta (10 mg/kg) bile su administrirane HFR i R grupi orogastričnom sondom svakodnevno u toku poslednje dve nedelje. Pre primene rimonabant je rastvoren u 0.1% Tween 80 u destilovanoj vodi u koncentraciji od 2mg/mL i 20 sekundi sonifikovan na ledu uz pomoć digitalnog Bransovog sonifikatora. Istovremeno C i HF grupe dobijale su fiziološki rastvor na isti način. Nakon dvadesete nedelje sve životinje su bile žrtvovane iskrvarenjem u ketaminskoj anesteziji (100 mg/kg intraperitonealno).

Uzorci krvi uzeti su punkcijom desne komore u cilju određivanja parametara oštećenja hepatocita (alanin aminotransferaza /ALT/ i aspartat aminotransferaza /AST/), lipidnog statusa, glikemije, kao i koncentracije insulina.

Uzorci jetre korišćeni su za patohistološku verifikaciju stepena steatoze, inflamacije i fibroze, za određivanje profila masnih kiselina, kao i koncentracije oligoelemenata (Zn, Cu, Mn i Fe). Osim toga, uzorci jetre su korišćeni i za biohemijsko određivanje parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa (MDA i NOx) i antioksidativne zaštite (GSH, MnSOD i Cu/ZnSOD).

Uzorci jetre za patohistologiju su fiksirani u 4% pufersanom formalinu i ukalupljeni u parafinu. Isečci tkiva debljine 5µm bojeni su hematoksilinom i eozinom (HE bojenje). Histološki preparati su analizirani i fotografisani uz pomoć kombinovanog fotobinokularnog svetlosnog mikroskopa Olympus BX5, opremljenog sa kamerom (Artcore 500MI Co.Ltd.Japan).

Epididimalno i ingvinalno masno tkivo je hirurški uklonjeno i potom korišćeno za određivanje adipokina (apelin, leptin, visfatin i rezistin), proinflamatornih citokina (IL-6 i IFN-γ).

3.3. Biohemijske analize

Ispitivanje oštećenja hepatocita.- Oštećenje hepatocita potvrđeno je biohemijski, određivanjem aktivnosti ALT i AST u serumu. Aktivnost ovih enzima merena je spektrofotometrijski na spektrofotometru BTS-330 prema instrukcijama proizvođača, korišćenjem specijalnih kitova koji sadrže 2-oksoglutarat (Sigma Aldrich, St.Louis, MO).

Određivanje oksidativnog/nitrozativnog stresa.- Uzorci jetre su homogenizovani na ledu, u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0.25 M/L saharoze, 10 mmol/L K/NaPO₄ pufera pH 7 i 1 mmol/L etilendiaminotetrasirćetne kiseline /EDTA/). Homogenati su zatim centrifugirani na 2000xg 15 minuta na 4°C. Supernatanti su bili preneti u epruvete i dodatno centrifugirani na 3200xg u toku 30 minuta na 4°C. Izdvojeni sediment je rastvoren u dejonizovanoj vodi. Nakon sat vremena inkubacije, uzorci su centrifugirani na 3000xg 15 minuta na 4°C, a izdvojeni supernatant je čuvan na -70°C. Proteini su određeni po Lorijevoj (*Lowry*) metodi korišćenjem govedeg seruma kao standarda (260).

Stepen lipidne peroksidacije je određen merenjem koncentracije MDA u tkivu jetre. MDA je određen spektrofotometrijski u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom, kao što su opisali Giroti (*Girotti*) i saradnici (261), pri čemu nastaje obojeni kompleks. Količina stvorenog MDA određena je spektrofotometrijski na 533 nm. Rezultati su izraženi kao nmol MDA po miligramu proteina (nmol/mg proteina).

Koncentracija NO_x, kao mera produkcije NO određena je uz pomoć Grisovog (*Griess*) reagensa na sledeći način: nakon redukcije nitrata, ukupni nitriti reaguju sa sulfanilamidom i N-(1-naftil) etilendiaminom i kao produkt nastaje azo boja, koja je određena spektrofotometrijski na 492 nm (262). Rezultati su izraženi kao nmol NO po miligramu proteina (nmol/mg proteina).

Određivanje parametara antioksidativne zaštite.- Sadržaj GSH određen je spektrofotometrijski primenom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline (DTNB). DTNB reaguje sa alifatičnim tiol jedinjenjima pri pH 8 stvarajući p-nitrofenol anjon žute boje. Intenzitet boje je očitao na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 412 nm (263). Rezultati su izraženi kao nmol GSH po miligramu proteina (nmol/mg proteina).

Aktivnost ukupne SOD (EC1.15.1.1.; SOD) je određena spektrofotometrijski kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini na 480 nm (264). Nakon dodatka 10 mM adrenalina (Sigma, St. Louis, USA), analiza je izvedena u natrijum bikarbonatnom puferu (50 mM, pH 10.2; Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, New York) koji sadrži 0.1 mM EDTA (Sigma, St. Louis, USA). Uzorci za određivanje MnSOD su najpre tretirani 0.8 mM rastvorom kalijum cijanida (KCN) (Sigma, St. Louis, USA), a zatim analizirani kao što je prethodno opisano (264). Aktivnost Cu/ZnSOD određena je kao razlika ukupne SOD i MnSOD. Ove enzimske aktivnosti su izražene jedinicama po miligramu proteina (U/mg prot.).

Određivanje koncentracije oligoelemenata.- Za određivanje koncentracije oligoelemenata uzorci jetre su najpre bili razgrađeni uz pomoć MDS-2000 sistema mikrotalasne digestije u 10 mL razblažene azotne kiseline (1:1), nakon čega je dodato 10 mL koncentrovane azotne kiseline (265). Uzorci su tretirani prema programu u tri koraka u toku 20 minuta, pri snazi od 630 ± 30 W i temperaturnom opsegu od 140-160°C. Nakon kompletne digestije uzorci su preneti u volumetrijske bočice od 50mL (265). Sadržaj Zn i Cu je određen plamenom atomskom apsorpcionom spektrometrijom (FAAS, engl. *flame atomic absorption spectrometry*), dok je za određivanje Mn i Fe korišćena grafitna pečna atomska apsorpciona spektrometrija (GF AAS, engl. *graphite furnace atomic absorption spectrometry*) (265). Sadržaj oligoelemenata je izražen kao miligram na kilogram tkiva jetre (mg/kg).

Određivanje lipidnog statusa.- Koncentracija TG je određena enzimskom kolorimetrijskom metodom. Prema ovoj metodi, za određivanje koncentracije TG u plazmi korišćen je modifikovani reagens holesterol oksidaza, dodavanjem 2,4,6-tribromo-3-hidroksi benzoične kiseline (TBHBA) (Triglyceride Quantification Kit, ab65336) (266).

Koncentracija ukupnog holesterola (UH) je određena merenjem količine stvorenog H_2O_2 , nastalog pod dejstvom holesterol oksidaze u reakciji sa 4-aminoantipirinom i fenolom na 500 nm (Cambridge, UK, Cholesterol Assay Kit, ab65390) (266).

Koncentracija LDL u plazmi je dobijena kombinacijom ultracentrifugiranja i precipitacione procedure, koju su opisali Fridvald (*Friedewald*) i saradnici (267).

Koncentracija HDL je određena enzimskom kolorimetrijskom metodom (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). U prisustvu dvostruko pozitivno naelektrisanih anjona, HDL frakcija je merena posle selektivne LDL precipitacije polianjon sulfatom. U našem eksperimentalnom protokolu dekstran sulfat i magnezijum sulfat su korišćeni u saglasnosti sa Centrom za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center of Disease Control and Prevention*) (Atlanta, GA: Lipid Reference Section). Nakon centrifugiranja HDL frakcija je određena direktno u supernatantu korišćenjem PAP metode (268).

Određivanje profila masnih kiselina u jetri.- Masti za dalju analizu masnih kiselina u tkivu jetre su ekstrahovane prema metodi koju su opisali Blaj i Dajer (*Bligh i Dyer*) (269). Metil estri masnih kiselina iz lipidne komponente su transesterifikovani uz pomoć hlorovodonične kiseline (HCl) u metanolu prema metodi koju su opisali Išihara i Fukubajaši (*Ichihara i Fukubayashi*) (270), a potom i kvantifikovani uz pomoć aparata Agilent Technologies (7890A Gas Chromatograph, Santa Clara, CA) sa detektorom plamene jonizacije. Odvajanje metil estara masnih kiselina je izvedeno na 112-88A7, HP-88 kapilarnim kolumnama (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm), uz pomoć helijuma (He) kao nosećeg gasa, sa brzinom protoka od 105 mL/min. Uzorci su ubrizgani na početnoj temperaturi peći od 175°C, temperaturi injektora od 250°C i temperaturi detektora od 280°C. Temperatura peći je programirana da se poveća sa 175°C na 220°C brzinom od 5°C/min. Masne kiseline su identifikovane na osnovu njihovog vremena zadržavanja sa referentnim standardima za masne kiseline (Supelco, FAME Mix, Sigma Aldrich) i izražene su kao procenat u odnosu na ukupni sadržaj masnih kiselina u jetri.

Određivanje adipokina i proinflammatoryh citokina u masnom tkivu i jetri.- Za određivanje koncentracije leptina, apelina, visfatina i rezistina u uzorcima supkutanog i visceralnog masnog tkiva korišćeni su ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kitovi nabavljeni od Sigma-Aldrich (Louis, USA), a za određivanje koncentracije IL-6 i IFN-γ u ovim tkivima i jetri, korišćeni su ELISA kitovi nabavljeni od BD Bioscience (San Diego, USA). Uzorci masnog tkiva najpre su homogenizovani u 10 puta većoj zapremini PBS. Nakon centrifugiranja (10 minuta na 12000 g i temperaturi od 4°C), supernatanti su pažljivo prikupljeni kroz masni kolač i rastvoreni u PBS u zapreminskom odnosu 1/40000 i korišćeni za određivanje ELISA metodom prema uputstvima proizvođača (271).

Određivanje koncentracije glukoze u plazmi.- Koncentracija glukoze u plazmi je određena enzimskom kolorimetrijskom glukoza-oksidaza metodom, prema uputstvu proizvođača (Roche, Boehringer Mannheim, Germany). Princip ove metode je da glukoza-oksidaza oksiduje glukozu do glukonata, pri čemu se izdvaja H₂O₂. H₂O₂ reaguje sa aminofenazonom i fenolom, pri čemu dolazi do promene boje. Uzorak plazme od 10 µL pomešan je sa 2 mL reagensa i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi (20–25°C). Nakon ovog vremena došlo je do promene boje i apsorbancija uzorka je očitana na talasnoj dužini od 500 nm na kolorimetru PC800 (Brinkmann, Westbury, USA) (272).

Određivanje koncentracije insulina u plazmi.- Za određivanje koncentracije insulina u plazmi korišćeni su ELISA kitovi (Abcam, Cambridge, UK) prema uputstvima proizvođača.

Određivanje HOMA-IR indeksa.- Koncentracije glukoze i insulina korišćene su za određivanje HOMA-IR indeksa. HOMA-IR indeks se dobija kada se koncentracija glukoze u plazmi (mmol/L) pomnoži sa koncentracijom insulina u plazmi (mU/L) i podeli sa 22.5 (273).

3.4. Statistička analiza

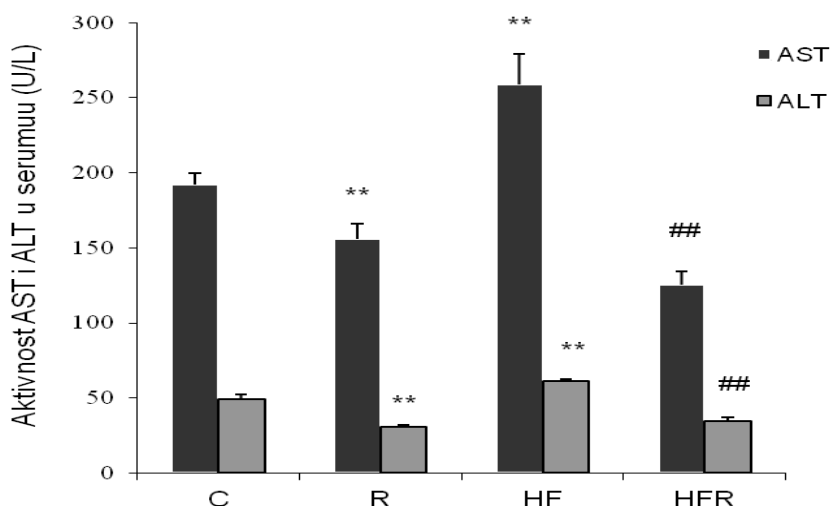
Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška. Normalna distribucija parametara je potvrđena Kolmogorov-Smirnovljevim testom, dok je za procenu statističke značajnosti razlike između grupa korišćena analiza varijanse (ANOVA) sa Takijevim (*Tuckey*) post hoc testom. Statistička analiza vršena je kompjuterskim programom SPSS 15.0, pri čemu je razlika smatrana statistički značajnom ako je $p < 0.05$.

IV REZULTATI

4.1. Uticaj rimonabanta na parametre hepatocelularnog oštećenja

Rezultati naše studije su pokazali da je aktivnost AST u serumu bila značajno viša u HF grupi (258.95 ± 19.99 U/L) u poređenju sa kontrolnom grupom (191.91 ± 7.65 U/L) ($p < 0.01$). S druge strane, tretman rimonabantom doveo je do značajnog sniženja aktivnosti AST u R grupi (155.60 ± 10.27 U/L), kao i HFR grupi (125.46 ± 8.70 U/L) u poređenju sa C and HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 1).

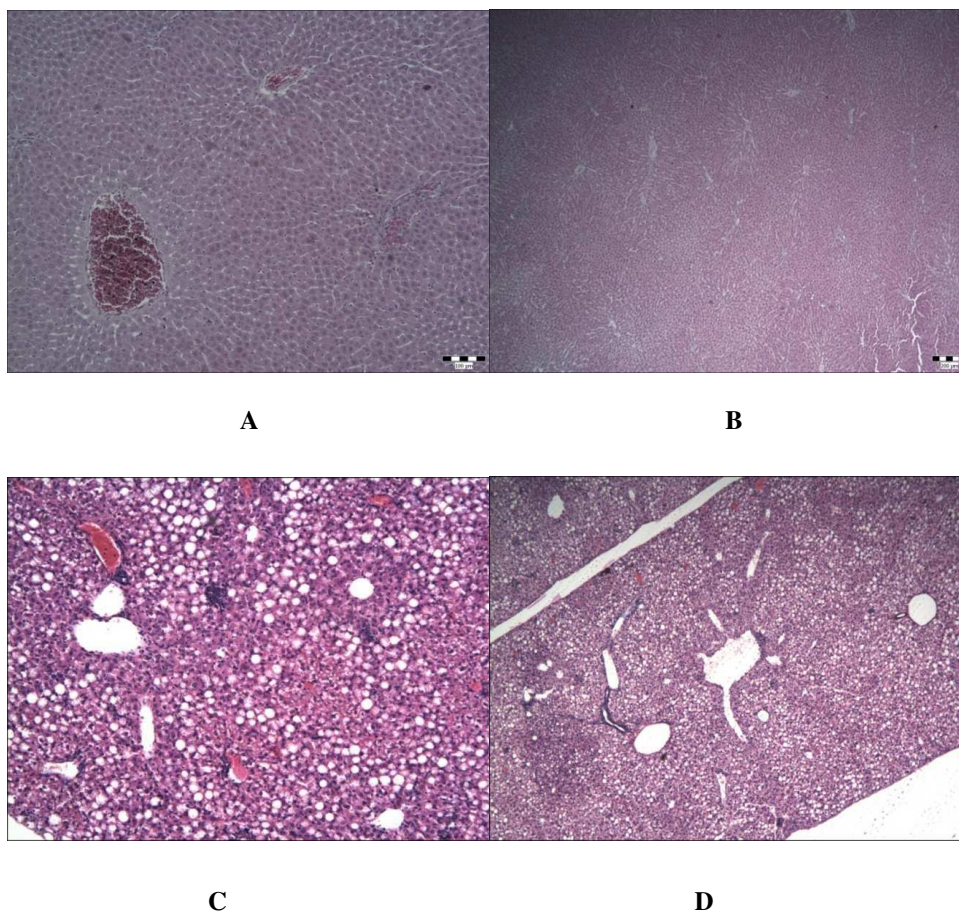
Primena HF dijeta dovela je do porasta aktivnosti ALT u serumu u HF grupi (60.98 ± 1.96 U/L) u poređenju sa kontrolom (49.25 ± 3.38 U/L) ($p < 0.01$). Međutim, u obe grupe tretirane rimonabantom uočeno je značajno sniženje aktivnosti ALT (R: 30.77 ± 1.07 U/L, HFR: 34.29 ± 2.89 U/L) u poređenju sa C i HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 1).



Grafikon 1. Uticaj rimonabanta na aktivnost AST i ALT u serumu nakon 20 nedelja primene HFD. C-kontrolna grupa na kontrolnoj dijeti u toku 20 nedelja; R-grupa na kontrolnoj dijeti u toku 20 nedelja, koja je tretirana rimonabantom u 19. i 20. nedelji; HF-grupa na HFD u toku 20 nedelja; HFR-grupa na HFD u toku 20 nedelja, koja je tretirana rimonabantom u 19. i 20. nedelji. Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu, ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

4.2. Uticaj rimonabanta na patohistološke promene u jetri

U C i R grupi nisu uočene patohistološke promene u jetri (Slika 1A i 1B). Međutim, HFD je dovela do umerene steatoze sa portalnim inflamatornim infiltratom i fokalnim nekrotičnim promenama u parenhimu (Slika 1C). Nasuprot tome, primena rimonabanta kod životinja na HFD (HFR grupa) nije dovela do razvoja inflamatornog infiltrata i fokalnih nekrotičnih promena, već samo do umerene steatoze (Slika 1D).



Slika 1. Uticaj rimonabanta na patohistološke promene u jetri. HE obojeni preparati su sečeni do debljine od 5 μ m, analizirani i fotografisani uz pomoć kombinovanog fotobinokularnog svetlosnog mikroskopa Olympus BX51. (A) Normalna jetra kontrolne grupe /10x/; (B) Tkivo jetre R grupe bez patohistoloških promena /10x/; (C) Umerena steatoza sa portalnim inflamatornim infiltratom i fokalnim nekrotičnim promenama u parenhimu jetre HF grupe /20x/; (D) Umerena steatoza u parenhimu jetre HFR grupe /10x/.

4.3. Uticaj rimonabanta na odnos težine jetre i telesne težine

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajnu razliku u odnosu težine jetre i telesne težine između R grupe ($4.75 \pm 0.20\%$) i kontrole ($4.58 \pm 0.22\%$) ($p > 0.05$). S druge strane, primena HFD dovela je do značajnog porasta odnosa jetre i telesne težine u HF grupi ($4.86 \pm 0.17\%$) u poređenju sa C grupom ($p < 0.05$), dok se u HFR grupi ($4.67 \pm 0.14\%$) uočava sniženje ovog odnosa u poređenju sa HF grupom ($p < 0.05$) (Tabela 5).

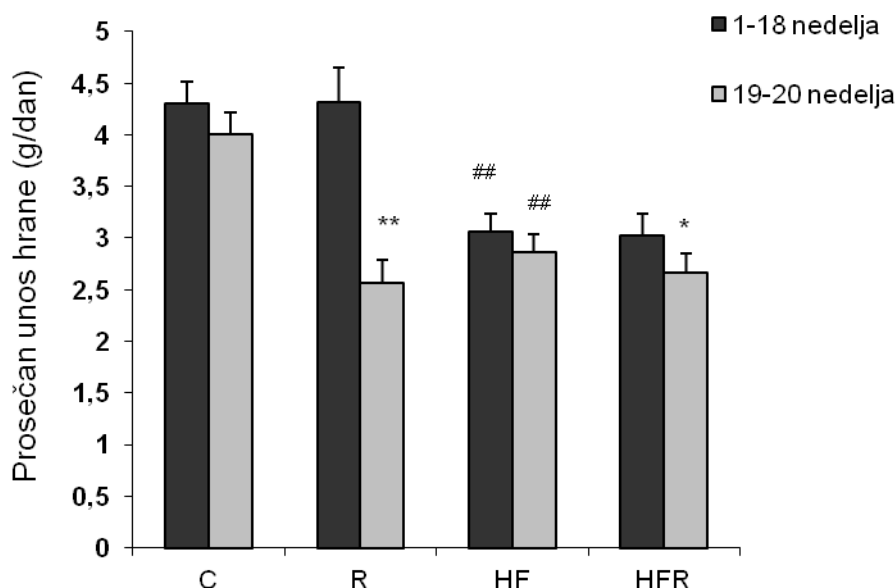
Tabela 5. Uticaj rimonabanta na odnos težine jetre i telesne težine

Grupe	%
C	4.58 ± 0.22
R	4.75 ± 0.20
HF	$4.86 \pm 0.17^*$
HFR	$4.67 \pm 0.14^{\#}$

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom ($*p < 0.05$ u odnosu na C grupu; $^{\#}p < 0.05$ u odnosu na HF grupu).

4.4. Uticaj rimonabanta na dnevni unos hrane

Rezultati ove studije ukazuju da je dnevni unos hrane bio značajno niži u grupi koja je bila na HF dijeti (HF; 3.06 ± 0.18 g/dan) u poređenju sa grupom koja je bila na standardnoj kontrolnoj ishrani (C; 4.30 ± 0.33 g/dan) ($p < 0.01$). Tretman rimonabantom doveo je do značajnog smanjenja dnevnog unosa hrane u HFR grupi u toku 19. i 20. nedelje (2.66 ± 0.19 g/dan) u poređenju sa prvih 18 nedelja (3.03 ± 0.21 g/dan) ($p < 0.05$). Slično smanjenje unosa hrane uočeno je u R grupi u toku 19. i 20. nedelje (2.56 ± 0.23 g/dan) u poređenju sa prvih 18 nedelja (4.31 ± 0.34 g/dan) ($p < 0.01$) (Grafikon 2).



Grafikon 2. Uticaj rimonabanta na dnevni unos hrane u toku 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (* $p < 0.05$ u odnosu na prvih 18 nedelja; ** $p < 0.01$ u odnosu na prvih 18 nedelja; ## $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu).

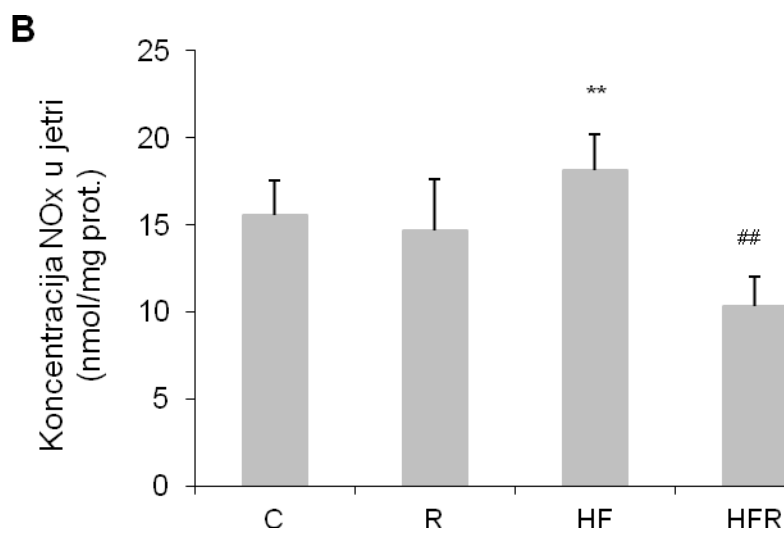
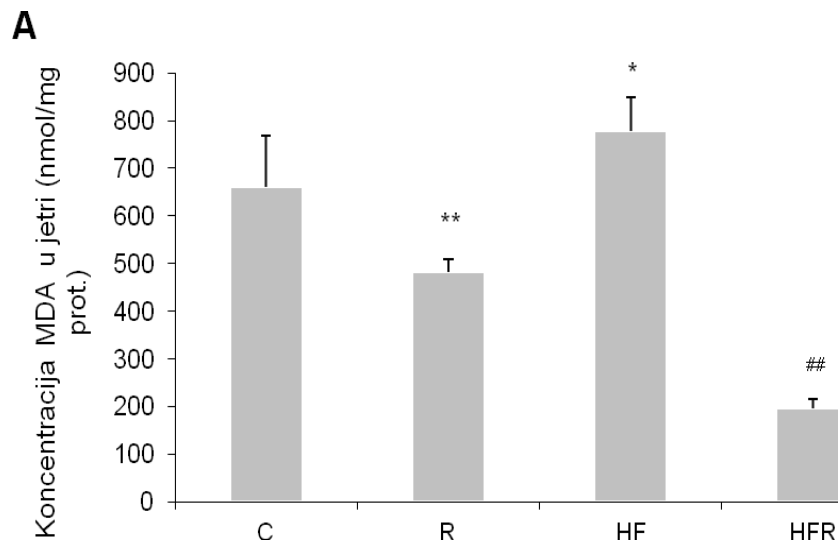
4.5. Uticaj rimonabanta na parametre oksidativnog/nitrozativnog stresa u jetri

Koncentracija MDA u jetri bila je značajno povećana u HF grupi (777.99 ± 70.87 nmol/ mg prot.) u poređenju sa kontrolom (661.09 ± 106.72 nmol/mg prot.) ($p < 0.05$). S druge strane, rimonabant je indukovao značajno smanjenje koncentracije MDA u HFR grupi (197.04 ± 17.99 nmol/mg prot.) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Značajno smanjenje koncentracije MDA uočeno je i u grupi miševa koji su bili na kontrolnoj ishrani i tretirani rimonabantom (483.18 ± 26.59 nmol/mg prot.) u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$) (Grafikon 3A).

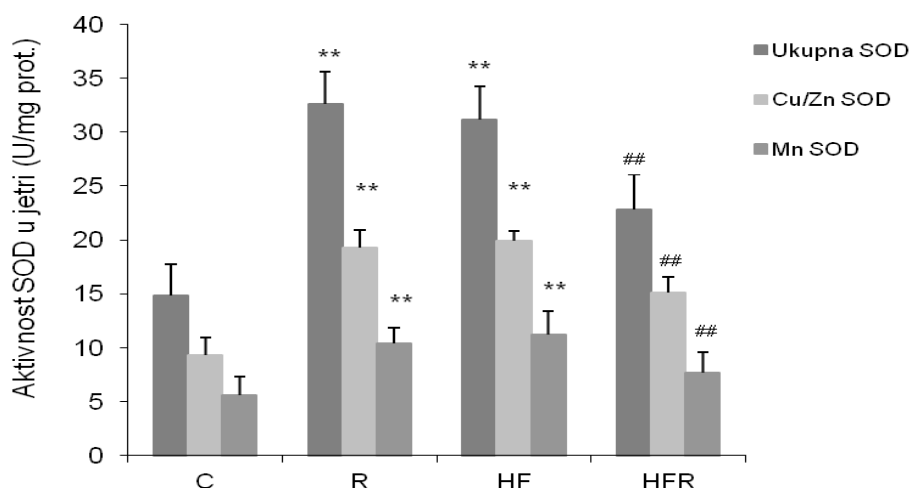
Primena HFD dovela je do porasta koncentracije NOx u HF grupi (18.10 ± 2.94 nmol/mg prot.) u poređenju sa kontrolom (15.51 ± 2.02 nmol/mg prot.) ($p < 0.01$). Primena rimonabanta dovela je do smanjenja sadržaja NOx u HFR grupi (10.31 ± 1.66 nmol/mg prot.) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 3B).

Aktivnost ukupne SOD bila je značajno povećana u HF grupi (31.17 ± 3.05 U/mg prot.) u poređenju sa kontrolom (14.88 ± 2.86 U/mg prot.) ($p < 0.01$). Takođe, povećana aktivnost ovog enzima bila je uočena i u R grupi (32.57 ± 3.06 U/mg prot.) u poređenju sa C grupom ($p < 0.01$). S druge strane, aktivnost ukupne SOD bila je snižena u HFR grupi (22.84 ± 3.27 U/mg prot.) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Aktivnosti MnSOD i Cu/ZnSOD izoenzima pratile su promene ukupne SOD (Grafikon 4).

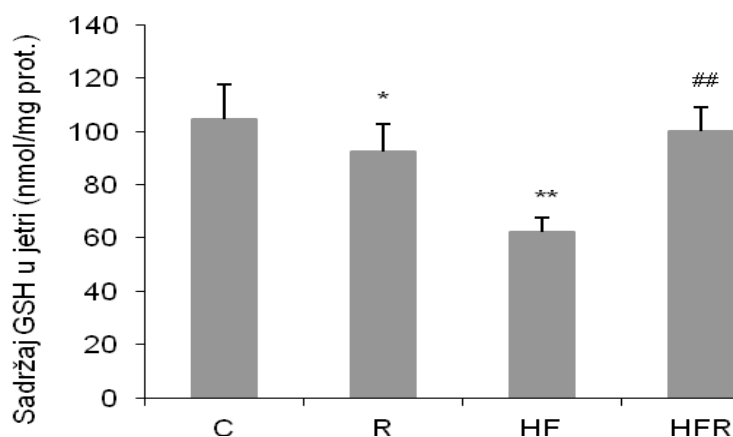
Koncentracija GSH bila je značajno snižena u HF grupi (62.43 ± 8.86 nmol/mg prot.) u poređenju sa kontrolom (104.59 ± 13.16 nmol/mg prot.) ($p < 0.01$). Međutim, značajno povećanje koncentracije GSH uočeno je u HFR grupi (100.09 ± 5.39 nmol/mg prot.) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Nasuprot tome, pad koncentracije GSH uočen je u R grupi (92.46 ± 10.19 nmol/mg prot.) u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) (Grafikon 5).



Grafikon 3. Uticaj rimonabanta na koncentraciju malondialdehida (MDA) (A) i NOx (B) u jetri nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (* $p < 0.05$ u odnosu na C grupu; ** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).



Grafikon 4. Uticaj rimonabanta na aktivnost ukupne superoksid dizmutaze, kao i njenih izoformi Cu/Zn SOD i MnSOD u jetri nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).



Grafikon 5. Uticaj rimonabanta na sadržaj glutaciona u jetri nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (* $p < 0.05$ u odnosu na C grupu; ** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

4.6. Uticaj rimonabanta na koncentraciju oligoelemenata u jetri

Koncentracija Zn bila je značajno snižena u HF grupi (29.10 ± 2.38 mg/kg) u poređenju sa kontrolnom grupom (36.69 ± 5.02 mg/kg) ($p < 0.05$). Međutim, primena rimonabanta dovela je do porasta njegove koncentracije u HFR grupi (50.1 ± 8.65 mg/kg) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$), kao i u R grupi (45.79 ± 6.16 mg/kg) u poređenju sa C grupom ($p < 0.01$) (Tabela 6).

Primena HFD dovela je do porasta koncentracije Fe u jetri (110.59 ± 10.07 mg/kg) u poređenju sa kontrolom (82.9 ± 4.83 mg/kg) ($p < 0.01$), dok je primena rimonabanta dovela do smanjenja njegove koncentracije u HFR grupi (70.46 ± 10.07 mg/kg) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Nasuprot tome, porast njegove koncentracije uočen u R grupi (88.09 ± 6.22 mg/kg) u poređenju sa kontrolom ($p < 0.01$) (Tabela 6).

Koncentracija Cu u HF grupi (4.33 ± 0.24 mg/kg) bila je značajno povećana u poređenju sa kontrolom (2.66 ± 0.15 mg/kg) ($p < 0.01$). Takođe, značajan porast koncentracije Cu uočen je u HFR grupi (5.53 ± 1.38 mg/kg) u poređenju sa HF grupom, kao i u R grupi (4.04 ± 0.48 mg/kg) u poređenju sa C grupom ($p < 0.01$) (Tabela 6).

Slično promeni koncentracije Cu, primena dijeta sa visokim sadržajem masti dovela je do porasta koncentracije Mn u jetri (2.41 ± 0.23 mg/kg) u poređenju sa kontrolom (1.27 ± 0.01 mg/kg) ($p < 0.01$). Primena rimonabanta dovela je do porasta koncentracije Mn u HFR grupi (10.01 ± 1.99 mg/kg) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$). Nasuprot Cu, koncentracija Mn u jetri bila je značajno niža u R grupi (0.06 ± 0.01 mg/kg) u poređenju sa C grupom ($p < 0.01$) (Tabela 6).

Tabela 6. Uticaj rimonabanta na koncentraciju oligoelemenata u jetri

Grupe	Koncentracije oligoelemenata (mg/kg)			
	Zn	Fe	Cu	Mn
C	36.69 ± 5.00	82.9 ± 4.83	2.66 ± 0.15	1.27 ± 0.01
R	45.79 ± 6.16 ^{**}	88.09 ± 6.22 ^{**}	4.04 ± 0.48 ^{**}	0.06 ± 0.01 ^{**}
HF	29.10 ± 2.38 [*]	110.59 ± 10.07 ^{**}	4.33 ± 0.24 ^{**}	2.41 ± 0.23 ^{**}
HFR	50.1 ± 8.65 ^{##}	70.46 ± 10.07 ^{##}	5.53 ± 1.38 ^{##}	10.01 ± 1.99 ^{##}

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (*p<0.05 u odnosu na C grupu; **p<0.01 u odnosu na C grupu; ^{##}p<0.01 u odnosu na HF grupu).

4.7. Uticaj rimonabanta na koncentraciju triglicerida u plazmi

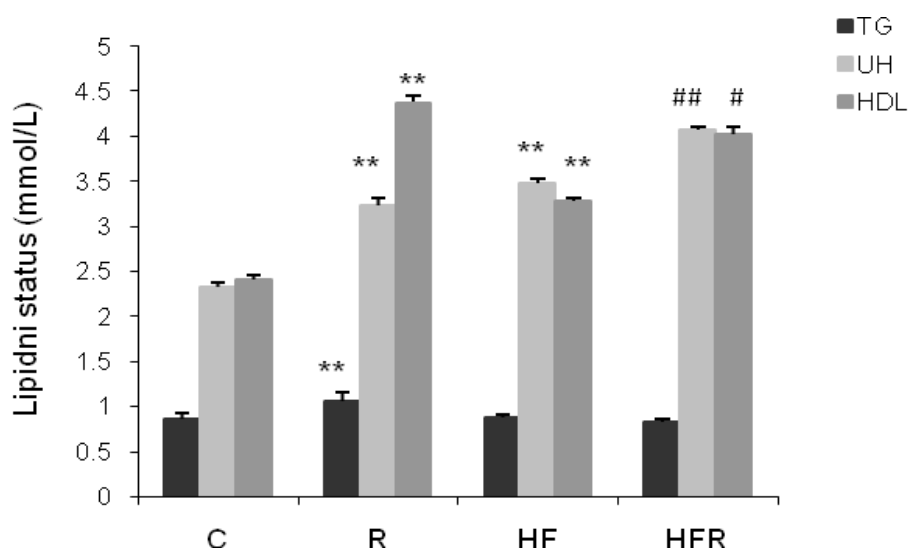
Koncentracija TG u plazmi bila je povišena u R grupi (1.06 ± 0.09 mmol/L) u odnosu na kontrolu (0.85 ± 0.04 mmol/L) ($p < 0.01$). Međutim, nisu uočene promene koncentracije TG u serumu između C i HF grupe (0.87 ± 0.03 mmol/L) ($p > 0.05$). Osim toga, nije uočena statistički značajna razlika između HF i HFR grupe (0.82 ± 0.04 mmol/L) ($p < 0.05$) (Grafikon 6).

4.8. Uticaj rimonabanta na koncentraciju holesterola u plazmi

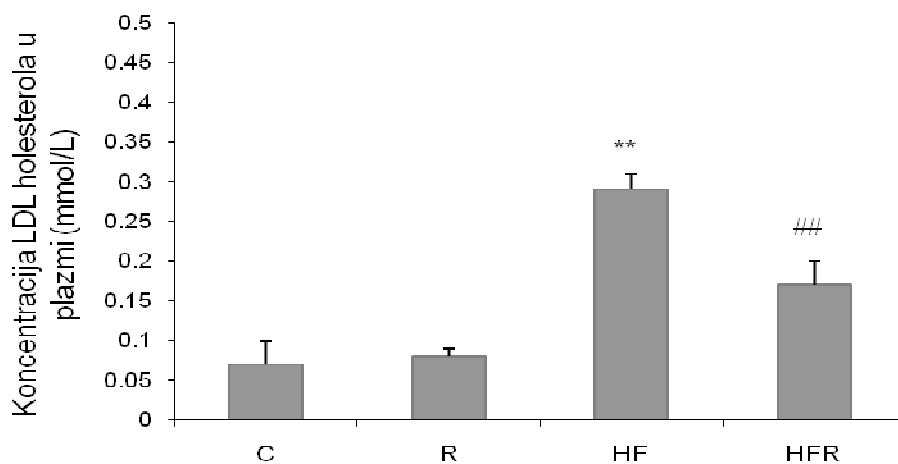
Koncentracija UH u plazmi bila je povećana u HF grupi (3.29 ± 0.03 mmol/L) u poređenju sa kontrolom (2.41 ± 0.05 mmol/L) ($p < 0.01$). S druge strane, rimonabant je doveo do porasta koncentracije UH u obe rimonabantom tretirane grupe – R (4.38 ± 0.07 mmol/L) i HFR (4.02 ± 0.08 mmol/L) u poređenju sa C i HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 6).

Analiza holesterolskih frakcija u plazmi pokazala je da je HFD dovela do porasta koncentracije HDL u HF grupi (3.48 ± 0.05 mmol/L) u poređenju sa kontrolom (2.33 ± 0.04 mmol/L) ($p < 0.01$). S druge strane, rimonabant je izazvao porast koncentracije HDL u serumu u obe rimonabantom tretirane grupe R (4.34 ± 0.08 mmol/L) i HFR (4.17 ± 0.04 mmol/L) u poređenju sa C (C:R, $p < 0.01$) i HF grupom (HF:HFR, $p < 0.01$). (Grafikon 6).

Nivo LDL holesterola bio je značajno povišen u HF grupi (0.29 ± 0.02 mmol/L) u poređenju sa kontrolom (0.07 ± 0.03 mmol/L) ($p < 0.01$). Tretman rimonabantom doveo je do nesignifikantnog porasta koncentracije LDL u R grupi (0.08 ± 0.01 mmol/L) u poređenju sa C grupom ($p > 0.05$). Sa druge strane, koncentracija LDL holesterola bila je značajno niža u HFR grupi (0.17 ± 0.03 mmol/L) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 7).



Grafikon 6. Uticaj rimonabanta na koncentraciju TG, UH i HDL u plazmi nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

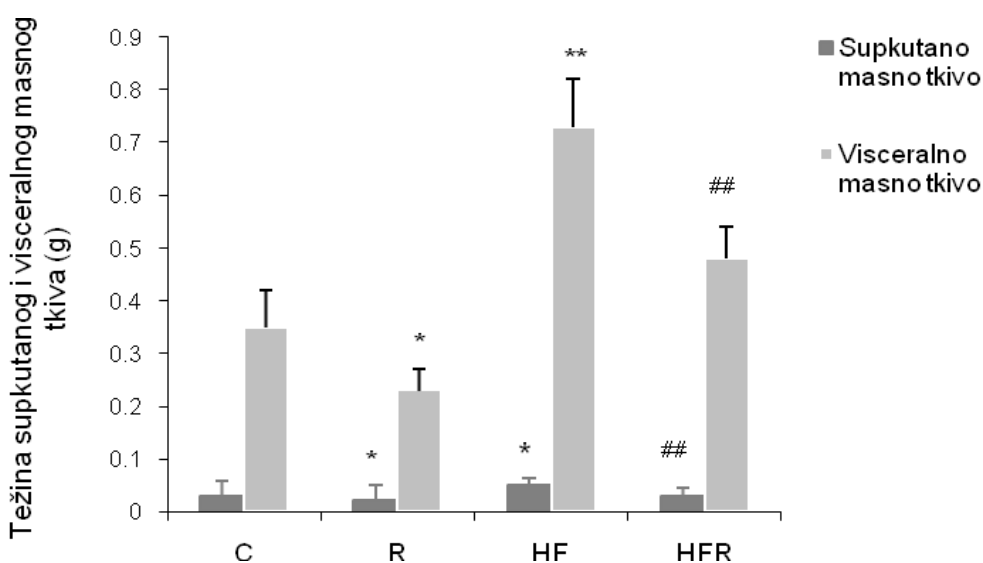


Grafikon 7. Uticaj rimonabanta na koncentraciju LDL holesterola u plazmi nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ### $p < 0.001$ u odnosu na HF grupu).

4.9. Uticaj rimonabanta na težinu supkutanog i visceralnog masnog tkiva

Težina supkutanog masnog tkiva bila je značajno viša u HF grupi (0.05 ± 0.03 g) u odnosu na kontrolu (0.03 ± 0.015 g) ($p < 0.05$). Primena rimonabanta dovela je do smanjenja težine supkutanog masnog tkiva u R grupi (0.02 ± 0.01 g) u poređenju sa C grupom ($p < 0.05$). Međutim, najveće smanjenje težine supkutanog masnog tkiva je uočeno u HFR grupi (0.02 ± 0.015 g) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 8).

Porast težine visceralnog masnog tkiva uočen je u HF grupi (0.73 ± 0.09 g) u poređenju sa kontrolom (0.35 ± 0.07 g) ($p < 0.01$). Nasuprot tome, u HFR grupi (0.48 ± 0.06 g) težina visceralnog masnog tkiva bila niža u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$). S druge strane, rimonabant je doveo do smanjenja težine visceralnog masnog tkiva u R grupi (0.23 ± 0.04 g) u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$) (Grafikon 8).



Grafikon 8. Uticaj rimonabanta na težinu supkutanog i visceralnog masnog tkiva nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (* $p < 0.05$ u odnosu na C grupu; ** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

4.10. Uticaj rimonabanta na proporciju masnih kiselina u jetri

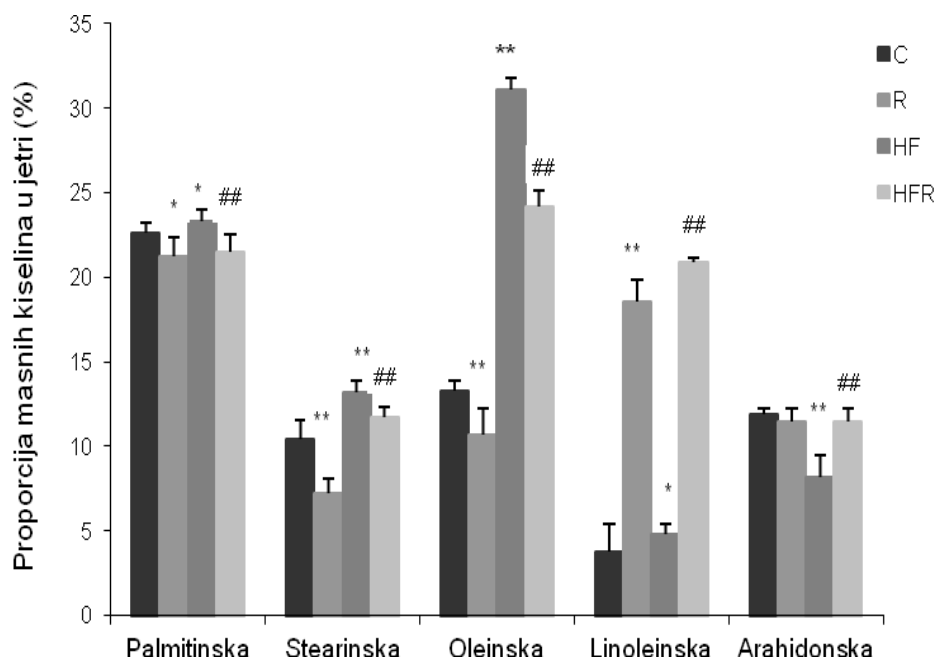
Primena rimonabanta izazvala je smanjenje proporcije palmitinske kiseline (C16:0) u R grupi (21.22 ± 1.2 %) u poređenju sa kontrolom (22.66 ± 0.58 %) ($p < 0.05$). Osim toga, rimonabant je doveo do sniženja proporcije palmitinske kiseline i u HFR grupi (22.53 ± 1.00 %) u odnosu na HF grupu (23.32 ± 0.69 %) ($p < 0.01$). Takođe, uočen je porast proporcije palmitinske kiseline u HF grupi u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$) (Grafikon 9).

Proporcija stearinske kiseline (C18:0) bila je viša u HF grupi (13.22 ± 1.13 %) u odnosu na kontrolu (10.44 ± 0.63 %) ($p < 0.01$). Primena rimonabanta izazvala je značajno smanjenje proporcije stearinske kiseline u obe rimonabantom tretirane grupe - R (7.22 ± 1.2 %) i HFR (11.68 ± 0.62 %) u poređenju sa C i HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 9).

Proporcija oleinske kiseline (C18:1) bila je povećana u HF grupi (31.14 ± 0.62 %) u poređenju sa kontrolom (13.26 ± 0.67 %) ($p < 0.01$). Primena rimonabanta dovela je do smanjenja proporcije oleinske kiseline u R grupi (10.24 ± 1.1 %) u poređenju sa C grupom ($p < 0.05$), kao i u HFR grupi (24.33 ± 1.3 %) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 9).

Proporcija linoleinske kiseline (C18:2 n6) bila je značajno povišena u HF grupi (4.78 ± 0.64 %) u poređenju sa kontrolom (3.78 ± 0.64 %) ($p < 0.05$). Značajno povećanje proporcije linoleinske kiseline uočeno je u R grupi (18.6 ± 1.27 %) u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$), kao i u HFR grupi (20.98 ± 1.59 %) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 9).

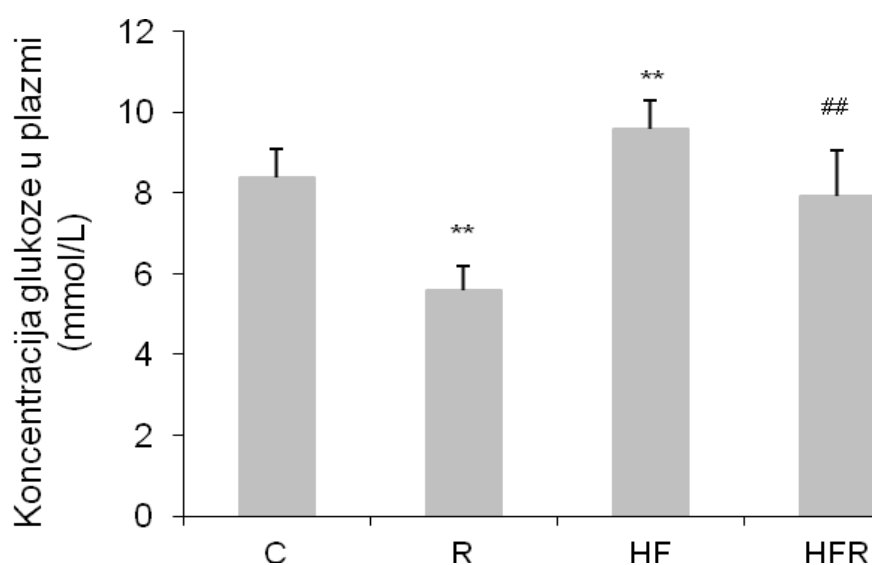
Proporcija arahidonske kiseline (C20:4 n6) bila je značajno niža u HF grupi (8.16 ± 1.34 %) u poređenju sa kontrolom (11.88 ± 0.39 %) ($p < 0.01$). S druge strane, primena rimonabanta nije dovela do promena u proporciji arahidonske kiseline u R grupi (11.02 ± 0.1 %) u poređenju sa kontrolom ($p > 0.05$). Nasuprot tome, rimonabant je doveo do porasta proporcije arahidonske kiseline u HFR grupi (11.67 ± 0.9 %) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 9).



Grafikon 9. Proporcija masnih kiselina u jetri nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (* $p < 0.05$ u odnosu na C grupu; ** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

4.11. Uticaj rimonabanta na koncentraciju glukoze u plazmi

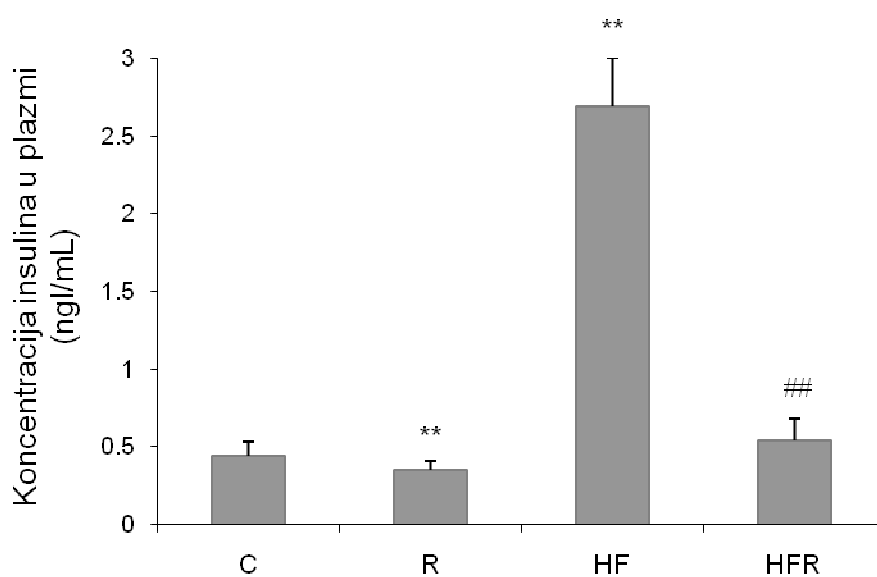
Koncentracija glukoze u plazmi bila je veća u HF grupi ($9.60 \pm 0.81 \text{ mmol/L}$) u poređenju sa kontrolom ($8.37 \pm 0.22 \text{ mmol/L}$) ($p < 0.01$). S druge strane, primena rimonabanta dovela je do sniženja koncentracije glukoze u obe grupe tretirane rimonabantom (R: $5.60 \pm 0.43 \text{ mmol/L}$, HFR: $7.94 \pm 1.42 \text{ mmol/L}$) u poređenju sa C i HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 10).



Grafikon 10. Uticaj rimonabanta na koncentraciju glukoze u plazmi nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

4.12. Uticaj rimonabanta na koncentraciju insulina u plazmi

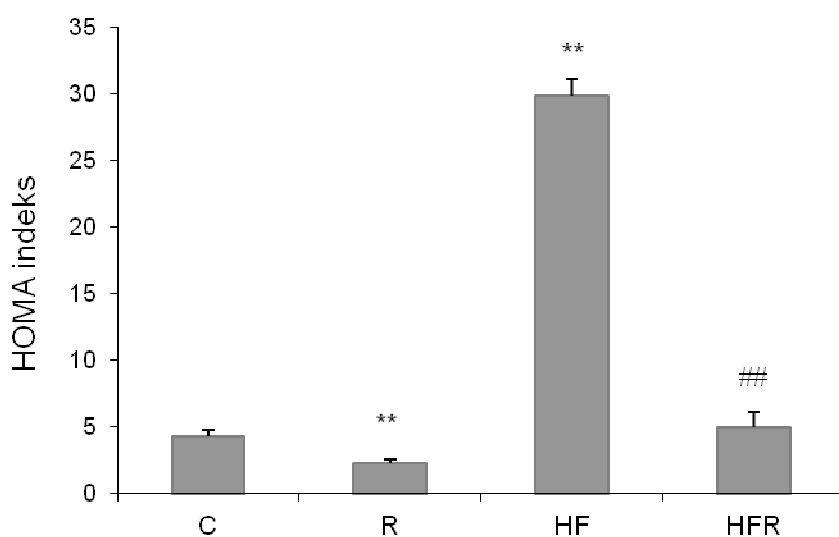
Koncentracija insulina u plazmi bila je značajno veća u HF grupi ($2.69 \pm 0.31 \text{ ng/mL}$) u poređenju sa kontrolom ($0.44 \pm 0.09 \text{ ng/mL}$) ($p < 0.01$). Međutim, primena rimonabanta dovela je do sniženja koncentracije insulina u obe grupe tretirane rimonabantom (R: $0.35 \pm 0.06 \text{ ng/mL}$, HFR: $0.54 \pm 0.14 \text{ ng/mL}$) u poređenju sa C i HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 11).



Grafikon 11. Uticaj rimonabanta na koncentraciju insulina u plazmi nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ### $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

4.13. Uticaj rimonabanta na HOMA-IR indeks

HOMA-IR indeks je bio povišen u HF grupi (29.84 ± 1.21) u poređenju sa kontrolom (4.25 ± 0.52) ($p < 0.01$). S druge strane, primena rimonabanta dovela je do sniženja HOMA-IR indeksa u obe grupe tretirane rimonabantom (R: 2.26 ± 0.33 , HFR: 4.95 ± 1.12) u poređenju sa C i HF grupom ($p < 0.01$) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Uticaj rimonabanta na HOMA indeks nakon 20 nedelja (C, R, HF i HFR). Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** $p < 0.01$ u odnosu na C grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na HF grupu).

4.14. Uticaj rimonabanta na koncentraciju leptina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu

Koncentracija leptina u supkutanom masnom tkivu bila je veća u HF grupi (4.34 ± 0.32 ng/mL) u poređenju sa kontrolom (2.10 ± 0.27 ng/mL) ($p < 0.01$). S druge strane, primena rimonabanta dovela je do sniženja koncentracije leptina u potkožnom masnom tkivu u HFR grupi (2.24 ± 0.29 ng/mL) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Tabela 7).

HFD je dovela do porasta koncentracije leptina u visceralnom masnom tkivu (7.25 ± 0.96 ng/mL) u poređenju sa kontrolom (3.61 ± 0.44 ng/mL) ($p < 0.01$). S druge strane, koncentracija leptina u epididimalnom masnom tkivu bila je značajno niža u HFR grupi (3.52 ± 0.29 ng/mL) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Tabela 8).

4.15. Uticaj rimonabanta na koncentraciju rezistina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu

Naša studija je pokazala da je koncentracija rezistina u supkutanom masnom tkivu bila značajno viša u HF grupi (0.78 ± 0.03 ng/mL) u poređenju sa kontrolnom grupom (0.27 ± 0.02 ng/mL) ($p < 0.01$). Nasuprot tome, značajno smanjenje koncentracije rezistina u ingvinalnom masnom tkivu uočeno je u R grupi (0.12 ± 0.01 ng/mL) u poređenju sa kontrolom, kao i u HFR grupi (0.32 ± 0.03 ng/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 7).

HFD je dovela do porasta koncentracije rezistina u visceralnom masnom tkivu u HF grupi (1.07 ± 0.06 ng/mL) u poređenju sa grupom životinja koja je bila na kontrolnoj ishrani (0.33 ± 0.01 ng/mL) ($p < 0.01$). Slično tome, koncentracija rezistina u epididimalnom masnom tkivu bila je značajno niža u R grupi (0.28 ± 0.01 ng/mL) u poređenju sa kontrolom, kao i u HFR grupi (0.61 ± 0.06 ng/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 8).

4.16. Uticaj rimonabanta na koncentraciju apelina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu

Analiza koncentracije adipokina u supkutanom masnom tkivu pokazala je da je HFD dovela do porasta koncentracije apelina u HF grupi (345.51 ± 24.67 ng/mL) u poređenju sa kontrolom (207.9 ± 19.22 ng/mL) ($p < 0.01$). Sa druge strane, rimonabant je izazvao značajno smanjenje koncentracije apelina u potkožnom masnom tkivu R grupe (119.26 ± 6.21 ng/mL) u poređenju sa kontrolom, kao i u HFR grupi (263.88 ± 17.14 ng/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 7).

Koncentracija apelina u visceralnom masnom tkivu bila je značajno viša u grupi životinja na HFD (393.22 ± 27.25 ng/mL) u poređenju sa grupom koja je bila na kontrolnoj ishrani (212.86 ± 12.16 ng/mL) ($p < 0.01$). Nasuprot tome, primena rimonabanta dovela je do smanjenja koncentracije apelina u epididimalnom masnom tkivu u R grupi (149.13 ± 6.77 ng/mL) u poređenju sa kontrolom, kao i u HFR grupi (254.39 ± 18.33 ng/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 8).

4.17. Uticaj rimonabanta na koncentraciju visfatina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu

Koncentracija visfatina u supkutanom masnom tkivu bila je veća u HF grupi (73.44 ± 1.67 ng/mL) u poređenju sa kontrolom (7.58 ± 0.12 ng/mL) ($p < 0.01$). Međutim, primena rimonabanta nije dovela do statistički značajnih promena njegove koncentracije u potkožnom masnom tkivu u R grupi (7.47 ± 0.16 ng/mL) u poređenju sa C grupom ($p > 0.05$). Nasuprot tome, tretman rimonabantom doveo je do značajnog smanjenja koncentracije visfatina u supkutanom masnom tkivu u HFR grupi (6.92 ± 0.44 ng/mL) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Tabela 7).

Koncentracija visfatina u visceralnom masnom tkivu bila je značajno veća u HF grupi (620.51 ± 27.25 ng/mL) u odnosu na kontrolu (49.29 ± 3.56 ng/mL) ($p < 0.01$). Međutim, primena rimonabanta redukovala je koncentraciju visfatina u visceralnom masnom tkivu u R grupi (44.19 ± 2.44 ng/mL) u poređenju sa C grupom ($p < 0.05$). Slično tome, nivo visfatina u epididimalnom masnom tkivu bio je značajno niži i u HFR grupi (54.18 ± 4.72 ng/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 8).

4.18. Uticaj rimonabanta na koncentraciju IL-6 u supkutanom i visceralnom masnom tkivu

Naša studija je pokazala da je koncentracija IL-6 u supkutanom masnom tkivu bila značajno viša u HF grupi (17.49 ± 1.12 pg/mL) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (3.29 ± 0.54 pg/mL) ($p < 0.01$). Sa druge strane, tretman rimonabantom izazvao je značajno smanjenje koncentracije IL-6 u potkožnom masnom tkivu u HFR grupi (3.55 ± 0.55 pg/mL) u poređenju sa grupom miševa koji su bili samo na HFD ($p < 0.01$) (Tabela 7).

HFD je dovela do porasta koncentracije IL-6 u visceralnom masnom tkivu u HF grupi (24.72 ± 1.91 pg/mL) u poređenju sa grupom životinja koja je bila na kontrolnoj ishrani (6.44 ± 0.77 pg/mL) ($p < 0.01$). Osim toga, tretman rimonabantom doveo je do smanjenja koncentracije IL-6 u epididimalnom masnom tkivu u HFR grupi (6.64 ± 0.86 pg/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 8).

4.19. Uticaj rimonabanta na koncentraciju IFN- γ u supkutanom i visceralnom masnom tkivu

Koncentracija IFN- γ u supkutanom masnom tkivu bila je značajno viša u grupi životinja na HFD (1.65 ± 0.10 pg/mL) u poređenju sa grupom koja je bila na kontrolnoj ishrani (0.67 ± 0.03 pg/mL) ($p < 0.01$). Nasuprot tome, primena rimonabanta dovela je do smanjenja koncentracije IFN- γ u potkožnom masnom tkivu u R grupi (0.58 ± 0.01 pg/mL) u poređenju sa kontrolom, kao i u HFR grupi (0.72 ± 0.06 pg/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 7).

Primena HFD je dovela do porasta koncentracije IFN- γ u visceralnom masnom tkivu u HF grupi (131.16 ± 11.95 pg/mL) u poređenju sa grupom životinja koja je bila na kontrolnoj ishrani (65.83 ± 4.72 pg/mL) ($p < 0.01$). Slično tome, koncentracija IFN- γ u epididimalnom masnom tkivu bila je značajno niža u HFR grupi (68.61 ± 7.62 pg/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 8).

Tabela 7. Efekat rimonabanta na koncentraciju adipokina (leptin, rezistin, apelin i visfatin) i proinflammatoryh citokina (IL-6 i IFN- γ) u supkutanom masnom tkivu nakon 20 nedelja (C, R, HF, HFR)

Parametar	Grupa			
	C	R	HF	HFR
Leptin (ng/mL)	2.10 \pm 0.27	2.10 \pm 0.22	4.34 \pm 0.32**	2.24 \pm 0.29 ^{##}
Rezistin (ng/mL)	0.27 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01**	0.78 \pm 0.03**	0.32 \pm 0.03 ^{##}
Apelin (ng/mL)	207.9 \pm 19.22	119.26 \pm 6.21**	345.51 \pm 24.67**	263.88 \pm 17.14 ^{##}
Visfatin (ng/mL)	7.58 \pm 0.12	7.47 \pm 0.16	73.44 \pm 1.67**	6.92 \pm 0.44 ^{##}
IL-6 (pg/mL)	3.29 \pm 0.54	3.22 \pm 0.39	17.49 \pm 1.12**	3.55 \pm 0.55 ^{##}
IFN- γ (pg/mL)	0.67 \pm 0.03	0.58 \pm 0.01**	1.65 \pm 0.10**	0.72 \pm 0.06 ^{##}

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (** p<0.01 vs. C, ^{##} p<0.01 vs. HF)

Tabela 8. Efekat rimonabanta na koncentraciju adipokina (leptin, rezistin, apelin i visfatin) i proinflammatoryh citokina (IL-6 i IFN- γ) u visceralnom masnom tkivu nakon 20 nedelja (C, R, HF, HFR)

Parametar	Grupa			
	C	R	HF	HFR
Leptin (ng/mL)	3.61 \pm 0.44	3.42 \pm 0.35	7.25 \pm 0.96**	3.52 \pm 0.29 ^{##}
Rezistin (ng/mL)	0.33 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01**	1.07 \pm 0.06**	0.61 \pm 0.06 ^{##}
Apelin (ng/mL)	212.86 \pm 12.16	149.13 \pm 6.77**	393.22 \pm 27.25**	254.39 \pm 18.33 ^{##}
Visfatin (ng/mL)	49.29 \pm 3.56	44.19 \pm 2.44*	620.51 \pm 27.25**	54.18 \pm 4.72 ^{##}
IL-6 (pg/mL)	6.44 \pm 0.77	6.21 \pm 0.42	24.72 \pm 1.91**	6.64 \pm 0.86 ^{##}
IFN- γ (pg/mL)	65.83 \pm 4.72	67.42 \pm 7.33	131.16 \pm 11.95**	68.61 \pm 7.62 ^{##}

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (* p<0.05 vs. C, ** p<0.01 vs. C, ^{##}p<0.01 vs. HF).

4.20. Uticaj rimonabanta na koncentraciju IL-6 i IFN- γ u tkivu jetre

Analiza koncentracije citokina u tkivu jetre pokazala je da je primena HFD dovela do značajnog porasta koncentracije IL-6 (189.25 ± 14.66 pg/mL) u poređenju sa kontrolnom grupom (34.48 ± 0.98 pg/mL) ($p < 0.01$). Nasuprot tome, tretman rimonabantom doveo je do smanjenja koncentracije IL-6 u tkivu jetre R grupe (31.22 ± 0.75 pg/mL) u poređenju sa kontrolom ($p < 0.05$). Slično tome, nivo IL-6 u jetri bio je značajno niži u HFR grupi (35.72 ± 2.12 pg/mL) u odnosu na HF grupu ($p < 0.01$) (Tabela 9).

Koncentracija IFN- γ u tkivu jetre bila je značajno veća u HF grupi (207.45 ± 23.78 pg/mL) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (136.94 ± 18.44 pg/mL) ($p < 0.01$). Međutim, primena rimonabanta dovela je do porasta koncentracije IL-6 u jetri u R grupi (139.51 ± 16.27 pg/mL) u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Nasuprot tome, nivo IL-6 u tkivu jetre bio je značajno redukovano u HFR grupi (131.45 ± 15.85 pg/mL) u poređenju sa HF grupom ($p < 0.01$) (Tabela 9).

Tabela 9. Efekat rimonabanta na koncentraciju proinflammatoryh citokina (IL-6 i IFN- γ) u tkivu jetre nakon 20 nedelja (C, R, HF, HFR)

Parametar	Grupa			
	C	R	HF	HFR
IL-6 (pg/mL)	34.48 \pm 0.98	31.22 \pm 0.75*	189.25 \pm 14.66**	35.72 \pm 2.12 ^{##}
IFN- γ (pg/mL)	136.94 \pm 18.44	139.51 \pm 16.27*	207.45 \pm 23.78**	131.45 \pm 15.85 ^{##}

Statistička značajnost razlike između grupa je procenjena korišćenjem dvostruke analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim post hoc testom (* p<0.05 vs. C, ** p<0.01 vs. C, ^{##}p<0.01 vs. HF).

V DISKUSIJA

NAFLD predstavlja rastući globalni zdravstveni problem, koji je usko povezan sa pandemijom gojaznosti i nastankom MS. Prevalencija ove bolesti danas iznosi između 20 i 30% u razvijenom delu sveta. Međutim, taj procenat je značajno veći u populaciji dijabetičara (50%) i gojaznih osoba (57-74%) (275). U izučavanju NAFLD esencijalnu ulogu imaju animalni modeli. Do sada je opisan veliki broj animalnih modela, od kojih ni jedan ne odražava u potpunosti sve morfološke i patofiziološke karakteristike humane NAFLD. U ovoj studiji korišćena je HFD, koja je kod miševa C57BL/6 soja dovela do izražene masne promene jetre nakon 20. nedelje (Slika 1C). S obzirom da je blaga steatoza sa portalnim inflamatornim infiltratom i nekrotičnim promenama nađena u parenhimu jetre miševa na HFD (Slika 1C), može se pretpostaviti da su SMK i OS uključeni u nastanak ovih hepatičkih lezija. Ovom studijom je pokazano da se animalni model NAFLD koja je izazvana HFD može koristiti kao pogodan za ispitivanje uloge OS, NS, i SMK u razvoju NAFLD. Osim toga, uočen je i značajan porast odnosa jetra/telesna težina u grupi životinja na HFD u poređenju sa onima koje su bile na kontrolnoj ishrani (Tabela 5). Ovakav nalaz je u skladu sa velikim brojem studija koje pokazuju vezu između primene HFD i hepatocelularnog oštećenja (133, 134, 156). Poznato je da ishrana bogata mastima može dovesti do razvoja steatoze usled povećanog preuzimanja lipida u hepatocite (Slika 1C). Osim povećanog hepatičkog preuzimanja lipida, i HFD izazvan porast ekspresije gena koji promovišu *de novo* lipogenezu igra značajnu ulogu u patogenezi NAFLD (133, 134, 276).

U našoj studiji primena HFD indukovala je signifikantan porast aktivnosti transaminaza u serumu (AST i ALT) u poređenju sa kontrolom (Grafikon 1). Porast aktivnosti ovih enzima jasno pokazuje da ishrana bogata mastima dovodi do hepatocelularnog oštećenja, što ujedno predstavlja i biohemijsku potvrdu patohistološkog nalaza NAFLD (Slika 1C).

Naša studija ukazuje da ES u značajnoj meri, i sa različitih aspekata, doprinosi nastanku NASH posredstvom CB1 receptora. S druge strane, ovom studijom je pokazano da blokada CB1 receptora protektivno deluje na razvoj patohistoloških promena u jetri, do kojih dovodi primena HFD (Slika 1D). Kao što je već ranije naglašeno, rimonabant je prvi lek primenjen kod ljudi sa ciljem da blokira CB1

receptore u mozgu i na periferiji. Efekti CB1 antagonizma na smanjenje telesne težine i poboljšanje metaboličkog profila bili su veoma ohrabrujući, tako da su pokrenute četiri velike kliničke studije u cilju ispitivanja njegovih dugotrajnih efekata, kao i njegove efikasnosti i bezbednosti (253, 255, 257, 277, 278). Međutim, rimonabant je naknadno povučen zbog neželjenih efekata, kao što su mučnina, bolovi u zglobovima, dijareja, vrtoglavice, anksioznost, depresija i pokušaji samoubistva (254). Iako ne postoji mogućnost za dalju primenu rimonabanta kod ljudi, naša studija pokazuje da antagonizam CB1 receptora može biti od velike koristi u lečenju NAFLD. S tim u vezi, još uvek nije razjašnjeno koji specifični signalni put CB1 receptora treba aktivirati, da bi se ispoljili terapijski korisni efekti. Takođe, nije rasvetljeno koji signalni put ovih receptora je neophodno isključiti kako bi se izbegla pojava neželjenih efekata (279).

Poznato je da je efekat rimonabanta udružen sa redukcijom intenziteta zapaljenjskih procesa. Prethodna pretklinička i klinička istraživanja nefropatije i kardiomiopatije ustanovila su antiinflamatorne i citoprotektivne efekte CB1 antagonista, koji nastaju usled smanjenja produkcije TNF- α i NF-kB (280, 281). Rezultati naših istraživanja jasno sugerišu da je antiinflamatorni efekat rimonabanta dodatno posredovan smanjenjem intenziteta lipidne peroksidacije (Grafikon 3A). Naša studija takođe jasno pokazuje da su HFD indukovana lipidna peroksidacija i NS u jetri povezani sa razvojem steatoze i portne inflamacije (Slika 1C). Uloga OS u patogenezi NAFLD je poznata, kao i njegoa međusobna povezanost sa inflamacijom (178, 282). Tako, aktivirane Kupferove i druge inflamatorne ćelije proizvode ROS, i time pogoršavaju stepen lipidne peroksidacije (282). Dodatni izvor ROS u NAFLD predstavlja masnim kiselinama indukovani porast aktivnosti CYP2E1 (252, 283), mitohondrijalna disfunkcija, povećana aktivnost NADPH oksidaze (252, 284), kao i porast koncentracije ceramida u hepatocitima (173). U cilju isključenja HFD kao mogućeg razloga hiperprodukcije ROS u hepatocitima, u našoj studiji smo merili dnevni unos hrane. S tim u vezi, naši rezultati pokazuju da unos hrane ne predstavlja doprinoseći faktor, to jest faktor koji bi uticao na intenzitet oksidativno/nitrozativnog oštećenja hepatocita (Grafikon 2 i 3A).

Naši rezultati pokazuju da endokanabinoidi pogoršavaju OS u NAFLD i doprinose razvoju NASH posredstvom CB1 receptora. Zapravo, ovo je prva studija koja

je pažnju usmerila na efekte endokanabinoida i selektivnog CB1 antagoniste, rimonabanta, na OS/NS u jetri. Naime, prooksidativni efekti endokanabinoida su potvrđeni smanjenjem lipidne peroksidacije u grupama životinja koje se bile na kontrolnoj ishrani i HFD nakon tretmana rimonabantom (Grafikon 3A). Međutim, efekat rimonabanta, koji je bio mnogo izraženiji u HFR grupi, je povezan sa značajnim smanjenjem inflamacije (Slika 1D). Ovaj nalaz je u skladu sa povišenim nivoom anandamida i ushodnom regulacijom CB1 receptora, koji su registrovani u HFD indukovanoj NAFLD (285).

U ovoj studiji HFD je dovela do porasta koncentracije NOx u HF grupi u poređenju sa kontrolom (Grafikon 3B). Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima drugih istraživača, koji su pokazali povezanost primene HFD i nitrozativnog oštećenja hepatocita (284, 286, 287). Poznato je da usled povećanog korišćenja masti u ishrani dolazi do steatoze, kao posledica povećanog preuzimanja SMK u hepatocite. S tim u vezi, oksidativni/nitrozativni stres, koji pri tom nastaje, ima ključnu ulogu u razvoju NASH (287). Uz to, NOx može da potencira citotoksičnost posredstvom reakcije sa $O_2^{\bullet-}$ (stvaranje nitrotirozina) (288). Osim toga, postoji povezanost akumulacije nitrotirozina i intenziteta patohistoloških promena (289). Takođe, utvrđena je povećana ekspresija gena za inducibilnu NO sintazu (iNOS) u jetri miševa na HFD (287). Rezultati naše studije pokazuju da sam zapaljenjski proces može doprineti NS u HF grupi. Naime, aktivacija inflamatornih ćelija u jetri povećava produkciju ROS i RNS, pa peroksinitriti, kao vrlo snažni citotoksični RNS, mogu da direktno reaguju sa membranskim fosfolipidima, DNK i proteinima. Takođe, ovi reaktivni metaboliti azota mogu da dovedu do indirektnog oštećenja ćelije, koje je posredovano slobodnim radikalima (290).

OS/NS i zapaljenjski proces u jetri su, kao što je prethodno pomenuto, međusobno povezani i u velikom obimu uključeni u razvoj NAFLD. Poznato je da hiperprodukcija ROS i RNS može dovesti do oštećenja i smrti hepatocita. Pored toga, ustanovljeno je da ROS i RNS stimulišu oslobađanje citokina, koji zatim podstiču inflamatorni proces i razvoj NASH (181). Takođe, utvrđeno je da je NF- κ B od esencijalne važnosti za regrutovanje inflamatornih ćelija u NASH (290), kao i indukciju

gena za iNOS u makrofagima i drugim ćelijama koje učestvuju u nastanku i razvoju ove bolesti jetre (287, 290).

Naša studija ukazuje da tretman rimonabantom dovodi do značajnog smanjenja koncentracije NO_x u HFR grupi u poređenju sa HF grupom (Grafikon 3B). Moguće objašnjenje za ovakav rezultat koji je u skladu sa podacima iz literature, odnosi se na antiinflamatorne i citoprotektivne efekte nastale usled inhibicije ili genetske delecije CB1 receptora (280, 281, 291-293). Poznato je da porast OS i NS, kao i rasplamsavanje zapaljenja, dovode do porasta produkcije endokanabinoida, odnosno do smanjenja njihove inaktivacije (290, 294, 295). Moguće je da u našem modelu endokanabinoidi doprinose nastanku oštećenja funkcije jetre stimulacijom ekspresije iNOS u parenhimskim ćelijama jetre, kao i aktivacijom CB1 receptora u perifernim mononuklearnim ćelijama (296). Osim toga, naš rezultat je u vezi sa objavljenim podacima koji ističu protektivni značaj blokade CB1 receptora na oštećenje jetre nastalo primenom HFD (297).

GSH, kao multifunkcionalni, neenzimski antioksidans, je glavna komponenta intracelularnog održavanja redoks stanja. On ujedno predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnog/nitrozativnog oštećenja (298). Ovom studijom smo pokazali da HFD dovodi do značajnog smanjenja sadržaja GSH u jetri (Grafikon 5). U skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja (183, 284, 287, 299), naš nalaz ukazuje da primena HFD pomera redoks stanje prema prooksidativnom statusu. Osim toga, smanjenje sadržaja GSH u jetri, koje je dobijeno u našoj studiji, je praćeno porastom intenziteta lipidne peroksidacije (Grafikon 3A), potvrđujući na taj način oksidativno/nitrozativno oštećenje hepatocita.

Kao što je prethodno pomenuto, značajna uloga u nastanku NS u HFD indukovanom oštećenju hepatocita pripisuje se visokim koncentracijama NO_x, koje su pronađene u tkivu jetre (287). Do sada objavljeni podaci ukazuju da se u uslovima hiperprodukcije NO_x smanjuje aktivnost katalaze i GSH, čime se redukuje antioksidativni kapacitet hepatocita (298). Pored toga, moguće je da supresija iNOS može dodatno da smanji nivo GSH u jetri, imajući u vidu da se GSH može konjugovati sa NO i na taj način poslužiti kao supstrat za stvaranje S-nitrozo-glutationa (300). Rezultati naše studije ukazuju da je sadržaj GSH u jetri bio značajno viši kod miševa

koji su dobijali HFD i zatim tretirani rimonabantom, u poređenju sa miševima na HFD (Grafikon 5). Ovaj porast koncentracije GSH može da predstavlja adaptivni odgovor hepatocita na povećanu produkciju ROS. Osim toga, porast GSH nam ukazuje da blokada CB1 receptora može imati blagotvorno dejstvo na redoks status hepatocita.

SOD, kao glavni enzim antioksidativne zaštite ćelija, uključen je u konverziju $O_2^{\bullet-}$ u manje toksični H_2O_2 . Prisutan je u hepatocitima u dve izoforme, kao Cu/ZnSOD (citoplazmatska SOD) i MnSOD (mitohondrijalna SOD) (178). U našoj studiji se aktivnost obe izoforme SOD povećava usled primene HFD (Grafikon 4). Ovaj rast aktivnosti SOD se može tumačiti kao adaptivni odgovor hepatocita na porast produkcije ROS, koji nastaje u toku administracije HFD. Naši nalazi su u korelaciji sa rezultatima drugih studija koje ukazuju da je jetra organ sa najizrazitijim porastom aktivnosti SOD nakon primene HFD (283, 284). Dobijeni porast aktivnosti MnSOD nije iznenađujući, jer su mitohondrije najvažnije organele u procesu produkcije ROS (284). Osim toga, poznato je da MnSOD ima mogućnost da ograniči produkciju peroksinitrita (301).

Porast aktivnosti ukupne SOD, kao i njenih izoenzima utvrđen je u jetri miševa tretiranih rimonabantom (Grafikon 4). S obzirom na ulogu SOD, kao glavnog sistema odbrane od $O_2^{\bullet-}$, čini se da je porast njegove aktivnosti nakon dejstva rimonabanta, poboljšao antioksidativni sistem hepatocita. Ovaj rezultat je sličan objavljenim podacima koji ukazuju da blokada CB1 kanabinoidnih receptora može ispoljiti blagotvorne efekte na OS/NS oštećenje bubrežnog i srčanog tkiva (280, 293).

U našoj studiji, HFD je dovela do porasta koncentracije Fe u jetri u odnosu na kontrolu (Tabela 6). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja drugih autora, koji podržavaju hipotezu da Fe u hepatocitima i izmenjeni metabolizma lipida imaju sinergističku ulogu u razvoju NAFLD/NASH (302, 303). U skladu s tim, poznato je da je Fe sastavni deo enzima i transportnih proteina uključenih u metabolizam lipida, tako da može uticati na lipidno opterećenje hepatocita, intrahepatocitne metaboličke puteve i sekreciju lipida iz hepatocita. S druge strane, Fe u svom fero obliku može i indirektno da utiče na metabolizam lipida. Naime, ćelijsko opterećenje gvožđem dovodi do razvoja OS i lipidne peroksidacije, što zatim može modifikovati profil SMK u ćelijskim membranama, dovodeći na taj način do njihovog oštećenja, kao i oštećenja ćelijskih organela (poremećaj mitohondrijalnog oksidativnog metabolizma, i sl.) (302).

Osim toga, akumulacija Fe ima proinflamatornu i profibrogenu ulogu, koju ostvaruje aktiviranjem Kupferovih ćelija i sledstvenim oslobađanjem proinflamatornih citokina, kao i aktivacijom stelatnih ćelija, što za posledicu ima zamenu parenhima vezivnim tkivom (304). Naši rezultati pokazuju da je rimonabant izazvao smanjenje hepatičnog sadržaja Fe u HFR grupi u poređenju sa miševima na HFD (Tabela 6). S obzirom na primenu dijeta bogate mastima, porast hepatične koncentracije Fe i CB1 receptora može biti uključen u nastanak hepatocelularnog oštećenja. Naši rezultati ukazuju da blokada CB1 receptora ispoljava supresivne efekte na razvoj OS povezanog sa porastom koncentracije Fe u ćelijama. Takođe, pozitivni efekti blokade CB1 receptora, koji su dobijeni u našoj studiji, mogu biti posledica poboljšanja poremećenog metabolizma Fe u hepatocitima.

Rezultati naše studije pokazuju značajan pad koncentracije Zn u jetri miševa na HFD u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Tabela 6). Ovo smanjenje koncentracije Zn je u saglasnosti sa objavljenim rezultatima koji ukazuju na mogući upliv Zn kao modulatora ekspresije gena u hepatocitima, koji su od značaja za homeostazu lipida (305). S tim u vezi, Zn-zavisni transkripcioni faktori (PPAR- α , i dr.), kao i hepatocitni nuklearni faktor-4 α (HNF-4 α), imaju značajnu ulogu u regulaciji metabolizma lipida u hepatocitima (304, 305). Intrahepatocitna akumulacija lipida može da poremeti ekspresiju Zn-zavisnih transkripcionih faktora (306). Osim toga, disfunkcija proteinskih transportera Zn, koja je posredovana proinflamatornim citokinima i OS, smanjuje koncentraciju ovog oligoelementa u plazmi, što je zatim praćeno porastom hepatične akumulacije lipida i facilitacijom inflamatornog odgovora (305, 307). Takođe, utvrđeno je da nedostatak Zn u ishrani može indukovati lipidnu peroksidaciju hepatocita (308).

Sve je više potvrda u naučnom svetu da Zn ima zaštitnu ulogu u akutnim i hroničnim oštećenjima jetre. Međutim, osnova ovih hepatoprotektivnih efekata nije u potpunosti objašnjena (305, 309). U našoj studiji je koncentracija Zn bila značajno povećana u obe grupe tretirane rimonabantom u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Tabela 6). Ovakav nalaz ukazuje da farmakološka blokada CB1 receptora u hepatocitima doprinosi na neki način protektivnim efektima Zn, imajući u vidu da ovaj element u tragu ima ključnu ulogu u održanju integriteta ćelije i njenih funkcija (307).

Naši rezultati pokazuju da je koncentracija Cu i Mn bila značajno viša u grupi miševa na HFD u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 6). Ovi nalazi su u korelaciji sa objavljenim podacima, koji ukazuju da je poremećaj homeostaze Cu, Zn i selena doprinoseći faktor u razvoju NAFLD (310).

Značajan porast koncentracije Cu i Mn uočen je u grupi miševa na HFD tretiranih rimonabantom u poređenju sa miševima na HFD, kao i u grupi životinja koje su bile na kontrolnoj ishrani i dobijale rimonabant u poređenju sa kontrolnom grupom. S druge strane, nasuprot koncentraciji Cu, koncentracija Mn u grupi tretiranoj rimonabantom bila je snižena u poređenju sa kontrolom (Tabela 6). Ovaj nalaz ukazuje da se preko blokade CB1 receptora može uticati na sadržaj Cu i Mn u jetri.

NAFLD, kao hepatska manifestacija MS, postaje veliki zdravstveni problem savremenog sveta, s obzirom na galopirajući porast prevalencije gojaznosti, komponenti MS i njima pridruženih bolesti (311). Većina pacijenata sa NAFLD razvija jednostavnu steatozu, koja se ispoljava enormnom akumulacijom lipida unutar hepatocita (310). U ovoj studiji primena HFD dovela je do akumulacije lipida, ne samo unutar hepatocita, već i u supkutanom i visceralnom masnom tkivu, pri čemu je porast težine visceralnog masnog tkiva veći u odnosu na porast supkutanog masnog tkiva (Grafikon 8). Ovakav nalaz naše studije je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji jasno ukazuju na povezanost HFD i distribucije masnog tkiva (311, 312, 272). Prema savremenim saznanjima uloga visceralnog masnog tkiva u patogenezi NAFLD je značajnija od one koju ima supkutano masno tkivo (313, 314). Štaviše, visceralni tip gojaznosti je prepoznat kao jedan od faktora rizika za nastanak steatoze (272, 311, 313, 314). *Eguchi i sar.* su utvrdili postojanje pozitivne korelacije između stepena steatoze i količine visceralnog masnog tkiva (315). Do sličnih rezultata došli su i *Van der Poorten i sar.* koji su utvrdili pozitivnu korelaciju između količine visceralnog masnog tkiva, stepena inflamacije i fibroze u NAFLD (314). Zašto većina pacijenata ima jednostavnu steatozu, dok drugi razvijaju progresivni NASH, ostaje i dalje pitanje bez definitivnog odgovora u humanoj hepatologiji.

Rezultati naše studije pokazuju da je tretman rimonabantom doveo do značajnog smanjenja količine i supkutanog i visceralnog masnog tkiva (Grafikon 8). Ovakav nalaz u skladu je sa objavljenim eksperimentalnim podacima koji ukazuju na značaj blokade

CB1 receptora kao mogućeg mehanizma zaštite masnog tkiva od štetnih posledica HFD (156, 292, 316). U ovoj studiji životinje na HFD su imale značajno veću količinu visceralnog masnog tkiva u poređenju sa kontrolom (Grafikon 8). Međutim, mehanizam koji povezuje visceralni tip gojaznosti, ES i NAFLD nije još uvek u potpunosti razjašnjen. Eksperimentalna i klinička istraživanja jasno pokazuju da je gojaznost povezana sa prekomernom aktivacijom ES u visceralnom masnom tkivu (317, 318). Aktivacija CB1 kanabinoidnih receptora dovodi do porasta aktivnosti lipoproteinske lipaze u primarnim mišjim adipocitima, što povećava fluks masnih kiselina u adipocite, koji ih potom koriste za sintezu TG. Uloga ES u akumulaciji neutralnih lipida u adipocitima je potvrđena studijom *Matiasa i sar.*, koja je pokazala da tretman 3T3-F442A ćelija HU210 endokanabinoidnim agonistom dovodi do akumulacije lipidnih kapi unutar adipocita (319). Iz naših rezultata se jasno vidi da HFD uslovljen porast sinteze TG u adipocitima dovodi do porasta količine masnog tkiva. S druge strane, usled hipertrofije adipocita i defektne adipogeneze, postoji ograničenje deponovanja lipida, što za posledicu ima njihovu ektopičnu akumulaciju, pretežno u jetri i skeletnim mišićima, čime se smanjuje insulinska senzitivnost u ovim tkivima (320). Pored toga, visceralno masno tkivo je lipolitički aktivnije od supkutanog masnog tkiva, pa se SMK otpuštaju direktno u portnu cirkulaciju. Najznačajniji izvori TG koji doprinose razvoju NAFLD su SMK oslobođene iz visceralnog masnog tkiva, *de novo* sintetisane SMK, kao i SMK koje potiču iz ishrane (321).

Eksperimentalne studije potvrđuju da je povećanje količine masnog tkiva ograničeno, tako da usled hipertrofije dolazi do stvaranja hipoksičnih uslova unutar ovog tkiva. U ovakvim uslovima može doći i do nekroze adipocita, što predstavlja okidač za aktivaciju makrofaga (322, 323). Disfunkcionalni adipociti oslobađaju faktore hemotakse (MCP-1 i druge hemokine), koji stimulišu usmereno kretanje monocita u masno tkivo (324). MCP-1 smanjuje insulinom stimulisanu preuzimanje glukoze u adipocite, što doprinosi razvoju IR u visceralnom masnom tkivu u značajno većem opsegu u poredjenju sa masnim tkivom u drugim delovima tela (325). Dobro je poznato da je gojaznost stanje hronične niskostepene inflamacije, jer se u masnom tkivu gojaznih osoba prekomerno produkuju proinflamatorni citokini, kao što su TNF- α , IL-6, i dr. Ovi citokini potom stimulišu makrofagnu infiltraciju i održavanje inflamacije. Svi

gore objašnjeni faktori sinergistički umnogome doprinose razvoju IR, kao krucijalne karakteristike NAFLD (326).

U skladu sa drugim studijama (156, 272, 285, 327-329), naši rezultati pokazuju da selektivni CB1 antagonizam u značajnoj meri redukuje telesnu težinu gojaznih miševa, ukazujući na taj način da blokada CB1 receptora stimuliše energetske metabolizam i smanjuje količini masnog tkiva (Grafikon 8). Razmatrajući ove promene na nivou celog organizma, uočljivo je da one nastaju usled povećanja energetske potrošnje i porasta kapaciteta oksidativnog metabolizma u različitim tkivima, naročito u smeđem masnom tkivu, skeletnim mišićima i jetri (272, 285, 327). Uzimajući u obzir samo belo masno tkivo, nastale promene bi mogle biti objašnjene porastom intenziteta lipolize, redukcijom lipogeneze i porastom oksidacije SMK u adipocitima (156, 285). Pored toga, rezultati drugih istraživača ukazuju na povišen tonus ES kod gojaznih ljudi. Tako je utvrđeno da je koncentracija ANA i 2-AG u cirkulaciji povišena kod gojaznih žena (330, 331), kao i da je koncentracija 2-AG povišena u visceralnom masnom tkivu gojaznih osoba (319). Ovi rezultati, kao i rezultati drugih studija koje su pokazale da je aktivnost enzima uključenih u proces biosinteze endokanabinoida povišena u visceralnom masnom tkivu gojaznih osoba (285), kao i pozitivna korelacija između koncentracije 2-AG u plazmi i količine visceralnog masnog tkiva, govore u prilog ključne uloge aktivacije ES u visceralnom masnom tkivu u gojaznosti i njenim komplikacijama (319, 272, 285, 317). Pored toga, i dalje se malo zna o preciznim biohemijskim mehanizmima koji dovode do prekomerne aktivacije ES u toku gojaznosti. Međutim, ova i prethodno pomenute studije ukazuju da bi CB1 receptori u masnom tkivu mogli predstavljati selektivnu metu u tretmanu gojaznosti i njenih komplikacija.

Jetra ima ključnu ulogu u stvaranju i metaboličkoj obradi cirkulišućih lipoproteina (311). Rezultati novijih istraživanja ukazuju da u NAFLD dolazi do značajne disregulacije homeostaze lipoproteina (311, 332, 333). Osim toga, epidemiološke studije pokazuju da postoji povezanost povećanog unosa holesterola i stepena progresije NAFLD (334-336). Unos prekomerne količine holesterola putem hrane, takođe se pokazao kao jedan od načina indukcije eksperimentalne NASH na različitim animalnim modelima (332, 337-340). Takođe, poznato je da hepatociti i adipociti mogu da

akumuliraju velike lipidne kapi, kao odgovor na prekomerni unos hrane bogate mastima ili kao posledica metaboličkih poremećaja (311). Nedavno je pokazano da u takvim uslovima dolazi do formiranja kristala holesterola u lipidnim kapima steatotičnih hepatocita, kako kod pacijenata sa NASH, tako i u mišjem modelu HFD indukovane NASH (311, 341, 342). Slično ovim promenama, u našoj studiji uočeno je da u NAFLD dolazi do poremećaja homeostaze holesterola. Naime, značajan porast koncentracije TG, UH i njegove LDL frakcije u plazmi uočen je kod miševa na HFD u poređenju sa miševima koji su bili na kontrolnoj ishrani (Grafikon 6 i 7). Pored toga, uočeno je da je HFD dovela do značajnog smanjenja koncentracije HDL u HF grupi u poređenju sa kontrolom (Grafikon 6). Ovi rezultati su u saglasnosti sa brojnim studijama koje ukazuju na povezanost dislipidemije i NAFLD (168, 311, 341, 343-346). Takođe, lipotoksični lipidi imaju značajnu ulogu u progresiji NAFLD (311, 328, 347). Prema hipotezi dva udara, NASH nastaje uled nakupljanja različitih toksičnih lipidnih metabolita, dok se steatoza razvija kao odgovor na prekomernu akumulaciju lipida koji ne ispoljavaju lipotoksične efekte (311, 332, 337). S tim u vezi, danas se smatra da je slobodan holesterol ključni lipotoksični molekul u razvoju NASH, jer ima sposobnost aktivacije Kupferovih i hepatičnih stelatnih ćelija, što doprinosi nastanku nekroinflamatornih promena i fibroze u parenhimu jetre (311).

Rezultati ove studije ukazuju da je NAFLD udružena sa aterogenim lipidnim profilom. Holesterol može da indukuje aktivaciju makrofaga, kao stožernih ćelija inflamacijskog odgovora u procesu ateroskleroze, što je potvrđeno rezultatima različitih istraživanja (348-350). Osim toga, pokazano je da akumulacija holesterola u lizozomima može da pokrene inflamatorni odgovor aktivacijom Kupferovih ćelija, kao i da pojača već postojeći zapaljenjski proces u eksperimentalno indukovanom NASH (349, 350). Takođe, nedavno sprovedene studije pokazale su da prekomerno i neregulisano preuzimanje oxLDL posredstvom receptora čistača (engl. *scavenger receptors*) eksprimiranih na Kupferovim ćelijama dovodi do lizozomalne akumulacije holesterola, što pokreće inflamatorni odgovor u eksperimentalnom NASH (351, 352). U kojoj meri su ovakvi procesi značajni u patogenezi humane NASH još uvek nije u potpunosti rasvetljeno, s obzirom da je NASH kod ljudi vrlo često udružena sa hiperlipidemijom i dislipidemijom (353, 354).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da rimonabant dovodi do sniženja koncentracije UH i TG u plazmi u poređenju sa kontrolom (Grafikon 6). Osim toga, uočeno je da primena rimonabanta kod životinja na HFD indukuje značajno smanjenje koncentracije UH i TG u plazmi u poređenju sa miševima na HFD (Grafikon 6). Takođe, uočeno je značajno smanjenje koncentracije LDL holesterola u plazmi miševa na HFD tretiranih rimonabantom u odnosu na miševe na HFD (Grafikon 7). Sa druge strane, koncentracija HDL holesterola u plazmi bila je značajno povišena kod miševa koji su tretirani rimonabantom u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Grafikon 6), kao i kod miševa na HFD tretiranih rimonabantom u odnosu na miševe na HFD (Grafikon 6). Dobijeni rezultati sugerišu da blokada CB1 receptora može uticati na poboljšanje aterogenog lipidnog statusa koji je udružen sa NAFLD, koja je izazvana primenom dijete bogate mastima. Štaviše, ovi rezultati ukazuju da antagonizam CB1 receptora, može biti delotvoran, ne samo u lečenju gojaznosti, već i kao protektivno sredstvo u NAFLD (Slika 1D).

Rezultati našeg istraživanja su u saglasnosti sa brojnim eksperimentalnim studijama koje ukazuju na delotvornu primenu antagonista CB1 receptora u NAFLD, kako kod miševa (133, 156, 278, 285, 316, 317, 327, 328), tako i kod ljudi (258, 276, 292, 330). Pored toga, rezultati ove studije ukazuju da prekomerna aktivnost ES ima glavnu ulogu u regulaciji metabolizma lipida na centralnom i perifernom nivou (285, 292). Hiperaktivacija ES je naročito ispoljena na nivou hipotalamusa i u perifernim tkivima (u jetri, pankreasu i epididimalnom masnom tkivu) kod životinja na HFD, kao i u visceralnom masnom tkivu i krvi gojaznih ljudi (156, 312, 316, 317, 331). Međutim, i dalje se malo zna o preciznim biohemijskim mehanizmima koji su u osnovi povećane aktivnosti ES u toku gojaznosti. S tim u vezi, sve je više eksperimentalnih potvrda da je porast sinteze SMK u hepatocitima u toku razvoja steatoze indukovane primenom HFD posredovan aktivacijom CB1 receptora (povećan sadržaj ANA) (133, 292, 327, 328).

Takođe, pokazano je da aktivacija CB1 receptora može da poveća ekspresiju gena u hepatocitima za lipogeni transkripcioni faktor SREBP-1, kao i njegove ciljne enzime, ACC1 i FAS. Ovi efekti se mogu blokirati primenom CB1 antagonista (156, 285, 312, 328). Noviji podaci ukazuju da aktivacija CB1 receptora, takođe, učestvuje i u regulaciji

oksidacije SMK modulacijom aktivnosti hepatične CPT-1, koji predstavlja ključni enzim u procesu β -oksidacije SMK (328).

Slično našim rezultatima, rezultati drugih *in vivo* studija u kojima je korišćen rimonabant kod gojaznih osoba, osoba sa prekomernom telesnom masom i dijabetičara, ukazuju da blokada CB1 receptora modifikuje lipidni profil (256, 258, 285, 355, 356). Ovi efekti mogu biti delom objašnjeni direktnim uticajem rimonabanta na metabolizam lipida u jetri. Imajući u vidu da ovaj CB1 antagonist poboljšava lipidni status i redukuje sadržaj masti u hepatocitima, nedavno je pretpostavljeno da periferni CB1 receptori mogu predstavljati i selektivnu metu u tretmanu steatoze i dislipidemije u cilju smanjenja rizika od pojave neuropsihijatrijskih neželjenih efekta, koji nastaju kao posledica neselektivne blokade CB1 receptora (254). Takođe, podaci iz literature ukazuju da blokada CB1 receptora usporava progresiju ateroskleroze (357, 358). Međutim, dodatne studije su neophodne kako bi se razjasnila uloga ES u metabolizmu lipoproteina, sa posebnim akcentom na modulacijsku ulogu rimonabanta u produkciji lipoproteina u jetri.

Usled ispoljavanja etiopatogenetske sličnosti između HFD indukovane NAFLD i humane NAFLD, ovaj animalni model je izrazito pogodan za proučavanje metaboličkih zbivanja u ljudskom organizmu, koja su od značaja za nastanak i razvoj NAFLD u uslovima prekomernog unosa hrane, odnosno gojaznosti. U tom smislu, analizom uzoraka tkiva jetre miševa i ljudi sa NAFLD utvrđeno je analogija kako između lipidnih poremećaja, tako i histoloških promena (134). Imajući u vidu da povišen nivo SMK u plazmi dovodi do porasta intracelularne sinteze TG i nastanka lipidnih kapi u hepatocitima (134, 168, 334, 346), naša studija je prva u kojoj je određivan profil SMK u NAFLD izazvanom hranom bogatom mastima.

Rezultati naše studije su pokazali značajan porast proporcije zasićenih SMK (palmitinska i stearinska kiselina) u HF grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (Grafikon 9). Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa dobro poznatim hepatotoksičnim efektima zasićenih SMK, koji dodatno pogoršavaju stepen oštećenja hepatocita u NAFLD indukovanoj HFD (Slika 1C) (134, 168, 334, 346, 359). Kliničke studije NAFLD ukazuju da porast koncentracije SMK u cirkulaciji predstavlja glavni izvor za sintezu TG u hepatocitima (334, 359). *In vitro* studije, sprovedene na različitim

tipovima ćelija, pokazale su da njihovo eksponiranje zasićenim SMK stimuliše ekspresiju gena za proinflamatorne citokine i profibrogene faktore. Do sličnog nalaza su došli i istraživači humane NAFLD (134).

Nedavno objavljeni rezultati ukazuju da palmitinska kiselina umnogome doprinosi porastu genske ekspresije za fetuin-A (α_2 -HS-glikoprotein) aktivacijom NF κ B-zavisnog puta. U tom smislu, palmitatima indukovana ekspresija ovog modulacijskog proteina za zasićene SMK deluje stimulatивно na akumulaciju TG u hepatocitima (360). Noviji podaci, takođe ukazuju da signalni mehanizmi pokrenuti akumulacijom ROS, ER stresom i porastom sinteze ceramida, imaju značajnu ulogu u nastanku hepatocelularnog oštećenja koje je indukovano zasićenim SMK (134). Uz to, nedavno je utvrđeno da porast koncentracije palmitinske kiseline u cirkulaciji kod pacijenata sa NASH, može doprineti lipotoksičnom oštećenju preko ekstracelularnih vezikula. Naime, utvrđeno je da usled lipotoksičnosti hepatociti oslobađaju velike količine ovih vezikula, koje zatim deluju na različite ćelije u parenhimu jetre, doprinoseći na taj način patogenezi NAFLD pokretanjem mehanizama hepatične inflamacije i fibroze (361). Međutim, način na koji zasićene SMK pokreću progresiju početne steatoze NAFLD u NASH nije do kraja rasvetljen.

Rezultati naše studije pokazuju značajno sniženje proporcije palmitinske i stearinske kiseline u jetri u obe grupe tretirane rimonabantom (Grafikon 9). Takav efekat rimonabanta bio je udružen sa smanjenjem intenziteta inflamacije (Slika 1D). Prema publikovanim podacima, slične promene u parenhimu jetre su bile praćene povećanjem koncentracije ANA u cirkulaciji i porastom hepatičke ekspresije CB1 kanabinoidnih receptora u NAFLD koja je izazvana primenom HFD (285).

Ova studija je, takođe, pokazala da primena HFD dovodi do porasta proporcije oleinske kiseline u jetri u poređenju sa kontrolom (Grafikon 9). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja drugih autora koji ukazuju na korelaciju između izrazitog povećanja koncentracije oleinske kiseline u plazmi i težine patohistoloških promena u jetri u NASH (346, 359, 361). Međutim, mehanizam kojim povišeni nivoi oleinske kiseline u jetri utiču na razvoj steatohepatitisa i povećanje količine deponovanih lipida u hepatocitima ostaje i dalje predmet bazičnih i kliničkih istraživanja. Naša studija ukazuje da rimonabant dovodi do značajnog pada proporcije

oleinske kiseline u jetri u R grupi u poređenju sa kontrolom, kao i u HFR grupi u poređenju sa HF grupom (Grafikon 9). Moguće objašnjenje ovakvih promena odnosi se na ispoljavanje antiinflamatornih i citoprotektivnih efekata, koji nastaju usled farmakološke inhibicije ili genetske delecije CB1 receptora. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa brojnim, eksperimentalnim i kliničkim studijama (156, 372, 285, 316, 328, 362).

Nedavno sprovedene studije su ukazale da polinezasićene SMK suprimiraju produkciju proinflamatornih citokina (IL i TNF), koji funkcionišu kao endogeni antiinflamatorni molekuli (332, 346, 361). Osim toga, publikovani podaci ukazuju da pad proporcije dugolančanih polinezastćenih SMK u jetri umnogome doprinosi razvoju masne jetre usled smanjenja metaboličkog kapaciteta hepatocita (363). Naime, ova promena može nastati usled smanjene desaturacije SMK ili porasta intenziteta OS u jetri (332, 346, 363).

Neadekvatan unos linoleinske kiseline putem ishrane ili njena defektna desaturacija i elongacija su do sada poznati faktori koji utiču na metabolizam polinezasićenih SMK (363). U takvim okolnostima, polinezasićene SMK utiču na homeostazu lipida aktivacijom hepatičkih transkripcionih faktora i enzima, koji imaju ključnu ulogu u metabolizmu SMK i akumulaciju masti u jetri (363, 364). S tim u vezi, značajno je naglasiti da je inflamatorni proces u jetri obolelih od NAFLD povezan sa nedostatkom dugolančanih polinezasićenih SMK (362, 363).

Osim toga, uočeno je da je koncentracija dugolančanih polinezasićenih SMK u plazmi značajno snižena kod pacijenata koji su u terminalnoj fazi bolesti jetre, odnosno pacijenata sa cirozom, nastalom usled dugogodišnje hepatitis B ili C virusne infekcije (363). Nasuprot ovim podacima dobijenih iz kontrolisanih kliničkih studija, u našoj studiji proporcija linoleinske kiseline bila je značajno viša u grupi miševa na HFD u poređenju sa miševima koji su bili na kontrolnoj ishrani (Grafikon 9). Ova diskrepanca između proporcije linoleinske kiseline u našem istraživanju i kliničkim istraživanjima, mogla bi se delimično objasniti eksperimentalnim protokolom. Naime, u okviru našeg animalnog modela potrebno je duže vreme za indukciju smanjenja hepatičke proporcije linoleinske kiseline, s obzirom da miševi na HFD nisu razvili cirozu, za razliku od kliničkih studija NAFLD. Pored toga, rezultati naše studije pokazuju da je primena

rimonabanta dovela do porasta proporcije linoleinske kiseline u jetri u obe grupe tretirane rimonabantom u poređenju sa kontrolom i miševima na HFD (Grafikon 9). Ovakvi rezultati ukazuju da farmakološka inhibicija CB1 kanabinoidnih receptora, na neki način, doprinosi protektivnm efektu linoleinske kiseline.

Poznato je da je gojaznost kod ljudi praćena smanjenjem inteziteta metabolizma esencijalnih SMK, uglavnom usled smanjenja aktivnosti desaturaza (363). S tim u vezi, arahidonska kiselina je biološki aktivna i u malim koncentracijama (168, 363). Ova esencijalna SMK je veoma značajna komponenta ćelijskih membrana, koja utiče na njihovu fluidnost, kao i na funkciju membranskih receptora i enzima (363). Osim toga, arahidonska kiselina je prekursor eikosanoida, koji ukoliko su zastupljeni u povišenoj koncentraciji, doprinose razvoju NAFLD i utiču na odvijanje inflamatornih procesa, stepeni viskoznosti krvi i na vazokonstrikciju (332, 346, 347, 363). U našoj studiji registrovano je značajno smanjenje proporcije arahidonske kiseline u HF grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (Grafikon 9). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa objavljenim rezultatima koji ukazuju da metabolički derivati arahidonske kiseline, odnosno eikosanoidi, mogu da poremete metabolizam lipida u jetri (332, 346, 347, 363, 364). Nasuprot tome, primena rimonabanta dovela je do značajnog porasta hepatičke proporcije arahidonske kiseline u HFR grupi u poređenju sa HF grupom (Grafikon 9). Ovi podaci ukazuju da blokada CB1 receptora može da doprinese pogoršanju postojećih poremećaja metabolizma masnih kiselina u tkivu jetre.

Rezultati kliničkih studija ukazuju da pacijenti sa steatozom ili NASH, u odsustvu DM tip 2, imaju smanjenu insulinsku senzitivnost (137, 138). S obzirom da je IR u direktnoj vezi sa nastankom lipotoksičnosti, OS i progresijom inflamacije, kao što je već prethodno istaknuto, utvrđeno je da ona ima krucijalnu ulogu, kako u razvoju steatoze, tako i u njenoj progresiji u NASH (139). S tim u vezi, IR u NAFLD, je zapravo prepoznata kao primarni metabolički poremećaj koji se odvija nezavisno od razvoja gojaznosti i DM tip 2, što je pokazano kod normalno uhranjenih i normoglikemičnih pacijenata sa NAFLD (140). Imajući u vidu da je NAFLD hepatična manifestacija MS (133), koju najčešće prate pridruženi poremećaji glikemije i smanjenje insulinske senzitivnosti, u našoj studiji određivane su koncentracije glukoze i insulina u plazmi.

U našem istraživanju uočen je značajan porast koncentracije glukoze u plazmi u HF grupi u poređenju sa kontrolom (Grafikon 10). Poznato je da je jetra glavno mesto produkcije glukoze, naročito u periodu između obroka, i to usled precizne regulacije procesa glikogenolize i glukoneogeneze. Budući da u ovom eksperimentalnom modelu dolazi do razvoja IR, porast koncentracije glukoze u plazmi je najvećim delom uzrokovan intenzivnijim odvijanjem procesa glukoneogeneze, do kojeg dovodi hiperaktivnost ES u jetri (354, 365). Takođe, studije sprovedene na ćelijskim kulturama pokazuju da je povećanje koncentracije glukoze direktno povezano sa porastom koncentracije endokanabinoida (319). Danas se smatra da CB1 receptori imaju značajnu modulatornu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze, imajući u vidu da tkiva uključena u održavanje homeostaze glukoze eksprimiraju CB1 receptore (242). S druge strane, CB1 *knockout* miševi na dijeti koja je bogata mastima ne ispoljavaju IR, za razliku od divljeg soja miševa iste vrste (242). *Ravinet i sar.* su pokazali da blokada CB1 receptora koju uzrokuje primena rimonabanta, poboljšava poremećaje homeostaze glukoze na mišjem modelu dijetom indukovane gojaznosti (246).

Slično našem nalazu, ovi istraživači su takođe utvrdili da usled blokade CB1 receptora dolazi do smanjenja glikemije u grupi životinja koje su bile na normalnoj ishrani (Grafikon 10). Moguće objašnjenje ovakvog rezultata trebalo bi tražiti u porastu influksa glukoze u pojedine ćelije (uglavnom skeletne mišiće), koji je uzrokovan blokadom CB1 receptora (366). *Linborg i sar.* su radeći na izolovanom skeletnom mišiću (*musculus soleus*), pokazali značajno povećanje transporta glukoze u skeletni mišić kod miševa tretiranih rimonabantom, u poređenju sa kontrolnom grupom (367). Time se zapravo potvrđuje da endokanabinoidi preko CB1 receptora vrše negativnu modulaciju insulin-zavisnog preuzimanja glukoze, u skeletnim mišićima gojaznih i normalno uhranjenih životinja (367).

Slično našim rezultatima, *Osei-Hyiaman* je sa svojim saradnicima pokazao da su smanjenje tolerancije glukoze i pojava IR koje razvijaju gojazne životinje posledica delecije ili blokade hepatičnih CB1 receptora (312). Smanjenje koncentracije glukoze u plazmi u HFR i R grupi, koje je registrovano u našoj studiji, moglo bi se objasniti korelacijom između antagonizma CB1 receptora i porasta ekspresije gena ključnih u metabolizmu glukoze (319). S tim u vezi, publikovani podaci ukazuju da rimonabant

može da poveća ekspresiju gena ključnih u metabolizmu glukoze, kao što su enzimi glikolize u masnom tkivu (β -enolaza, fosfofruktokinaza, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza /GAPDH/ i fosfoglicerat mutaza) (366).

Naša studija je potvrdila prisustvo poremećaja glikoregulacije i IR u životinja na HFD, koje se reflektuje porastom koncentracije glukoze i insulina u plazmi ove eksperimentalne grupe (Grafikon 11). Poznato je da hiperglikemija, kao relevantan faktor u patogenezi NAFLD, prevashodno dovodi do porasta intenziteta OS u tkivu jetre (Grafikon 3, 4 i 5). Do olakšanog nastanka OS u bolesnika sa IR dovode hiperglikemija, povišen unos SMK, kao i izlaganje ultravioletnom zračenju (368). Štaviše, hiperglikemija u ovom animalnom modelu predstavlja glavni faktor koji doprinosi nastanku OS u MS, budući da je poznato da se u stanju hiperglikemije značajno povećava stvaranje ROS, i samim tim remeti oksidoredukciona ravnoteža u hepatocitima. Ove promene se događaju kroz nekoliko mehanizama (pojačan metabolizam glukoze poliolskim putem sa posledičnim porastom produkcije sorbitola, povećano intracelularno formiranje završnih produkata glikozilacije /AGE/, aktivacija PKC i povećano stvaranje peroksidnih anjona u mitohondrijskom transportnom lancu elektrona) (369).

Uslove hiperglikemije odlikuje intenzivnija konverzija glukoze u sorbitol, što za posledicu ima smanjenje količine redukovano oblika NADPH, koji predstavlja ključni kofaktor za stvaranje najvažnijeg intraćelijskog antioksidansa, redukovano GSH. U prilog tome govori registrovano smanjenje koncentracije GSH u ovoj studiji, koje je praćeno razvojem hiperglikemije u grupi miševa na HFD (Grafikon 5 i 10). Aktivacijom poliolskog puta, to jest nagomilavanjem sorbitola i njegove konverzije u fruktozu, kao i povećanjem odnosa NADH/NAD, može doći do aktivacije PKC i inhibicije aktivnosti GAPDH (370).

Hiperglikemija dovodi do direktne ili indirektne produkcije ROS aktivacijom DAG-PKC puta celularne signalizacije (369). Familija PKC se sastoji iz više različitih izoformi, od kojih se većina aktivira posredstvom DAG, lipidnog "drugog glasnika". U uslovima hiperglikemije nastaje povećano stvaranje dihidroksi-aceton-fosfata, koji se potom redukuje u glicerol-3 fosfat, što posledično dovodi do porasta sinteze DAG. Aktivacija izoformi PKC je u osnovi različitih poremećaja prenošenja ćelijskih signala.

Važno je istaći da PKC ispoljava i aktivnost serin-treonin kinaze, koja fosforilacijom serinskih rezidua IRS smanjuje insulinsku senzitivnost jetre (369). Štaviše, protein kinaza C- α predstavlja snažan induktor aktivnosti NADPH oksidaze, što posledično uzrokuje stvaranje ROS i progresiju hepatocelularnog oštećenja (369). Osim stimulacije produkcije ROS, do kojeg dovodi porast aktivnosti signalnog puta DAG-PKC, hiperglikemija smanjuje i kapacitet antioksidativne zaštite hepatocita. U prilog tome govore podaci koji ukazuju da intracelularni porast koncentracije glukoze indukuje inaktivaciju antioksidativnih proteina (Cu/Zn SOD i dr.), smanjujući na taj način antioksidativni kapacitet hepatocita (368).

Rezultati naše studije su u saglasnosti sa eksperimentalnim i kliničkim studijama koje potvrđuju vezu između NAFLD i različitih komponenti MS (naročito sa abdominalnim tipom gojaznosti, IR, porastom koncentracije TG u plazmi, kao i porastom LDL, odnosno smanjenjem koncentracije HDL u cirkulaciji) (371-377). Prevalencija MS kod normalno uhranjenih pacijenata sa NAFLD iznosi 18%, dok se kod gojaznih pacijenata sa NAFLD može kretati u opsegu do 67% (321, 378-380). Osim toga, uočeno je da je NAFLD često udružena sa dijabetesom tip 2 (371). Uz to, utvrđena je i pozitivna korelacija između ektopične akumulacije masti u visceralnom masnom tkivu u bolesnika sa NAFLD i hipertenzije (378, 381). Pokazano je, takođe, da je 85% bolesnika sa NAFLD rezistentno na dejstvo insulina. Bitno je napomenuti i da ovi bolesnici često manifestuju poremećaje metabolizma glukoze (predijabetes ili DM tip 2, koji međutim nije dijagnostikovao) (382).

Hiperinsulinemija u našoj studiji predstavlja potvrdu razvijene IR u miševa koji su bili na dijeti bogatoj mastima (Grafikon 11). Hiperinsulinemija *per se*, koja je pri tom udružena sa pojačanim intenzitetom lipolize i povećanim unosom masti, stimuliše sintezu TG u hepatocitima (371). *Gaggini M i sar.* su potvrdili da porast sadržaja TG u hepatocitima, kao i povećanje količine visceralnog masnog tkiva, u podjednako meri doprinose razvoju IR u jetri, mišićima i masnom tkivu (354). U uslovima IR, senzitivnost jetre na insulin i njegov hepatski klirens su smanjeni proporcionalno povećanju količine intrahepatične i visceralne masti, što je najizraženije kod pacijenata sa DM tip 2 u poređenju sa osobama sa IR i nemanifestnim DM tip 2 (371, 383). Osim toga, utvrđeno je da gojazne osobe sa povećanom količinom visceralnog masnog tkiva imaju povećan intenzitet ukupne telesne lipolize u poređenju sa normalno uhranjenim

osobama (384, 385). U tom smislu, pokazano je da je u slučajevima abdominalne gojaznosti koncentracija SMK u portnoj cirkulaciji značajno povećana u poređenju sa njihovom koncentracijom u arterijskoj krvi, što za posledicu ima direktnu izloženost hepatocita SMK (386, 387). Do sada je poznato da porast koncentracije SMK deluje stimulatивно na hepaticnu glukoneogenezu i sintezu VLDL usled delovanja hiperinsulinemije (386, 388). S tim u vezi, porast intenziteta lipolize u visceralnom masnom tkivu dovodi do prekomernog snabdevanja hepatocita glicerolom i SMK, što zatim indukuje porast hepaticke sinteze TG i glukoneogeneze, pri čemu se glicerol koristi kao glavni supstrat u procesu glukoneogeneze (388).

U našoj studiji, u miševa na HFD je registrovan povišen HOMA-IR indeks, što ukazuje na prisustvo IR (Grafikon 12). Pretpostavljeni mehanizam kojim prekomerni unos masti dovodi do razvoja IR kod C57BL/6 miševa je porast količine zasićenih masnih kiselina koje su u sastavu fosfolipida mitohondrijalne membrane, što dovodi do smanjenja mitohondrijalne funkcije (389). IR je praćena razvojem hiperinsulinemije (Grafikon 11), koja zajedno sa porastom lipolize i povećanim unosom masti indukuje akumulaciju TG u hepatocitima, doprinoseći na taj način razvoju NAFLD. Poznato je da je IR najčešće prisutna u osnovi nastanka steatoze i njene dalje progresije u teže oblike bolesti. Naime, utvrđena je pozitivna korelacija između količine masti u jetri i svih komponenti MS, nezavisno od prisustva gojaznosti (389). Tako je studija koju je sproveo *Chutturi* sa svojim saradnicima, biopsijom verifikovala NASH u 66 bolesnika (390). Prema njihovoj studiji, IR (merena HOMA-IR indeksom) je esencijalna sistemska metabolička karakteristika NASH, koja je prisutna nezavisno od stepena gojaznosti. Tom prilikom je, takođe, uočeno da se IR češće javlja kod pacijenata sa abdominalnim tipom gojaznosti. Osim toga, uočeno je da svi ovi pacijenti ispunjavaju minimalne kriterijume za dijagnozu sindroma IR. Poređenjem ove grupe obolelih od NASH sa kontrolnom grupom, koju su činili pacijenti oboleli od hepatitisa C istog uzrasta, pola i stepena fibroze, stepen IR bio je značajno veći kod pacijenata sa NASH (390). Slično tome, ulogu IR u patogenezi NASH potvrđuje pilot klinička studija koju su sprovedi *Caldwell* i saradnici (391). Oni su utvrdili da primena troglitazona, leka koji povećava senzitivnost tkiva na insulin, dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti transaminaza (391). Sa druge strane, kod gojaznih leptin deficijentnih miševa (392), kao i kod ljudi (393), metformin redukuje aktivnost transaminaza, pri čemu ih čak i vraća na

normalnu vrednost u 50 % slučajeva. Metformin, takođe, poboljšava i druge metaboličke poremećaje udružene sa sindromom IR (394).

Naša studija pokazuje da primena dijeta bogate mastima dovodi do značajnog porasta koncentracije IL-6 i IFN- γ u supkutanom i visceralnom masnom tkivu (Tabela 7 i 8). Ovakav nalaz bi se mogao objasniti činjenicom da je gojaznost praćena ekspanzijom masnog tkiva, usled prekomerne hipertrofije adipocita, što posledično dovodi do formiranja hipoksičnih zona u masnom tkivu. U uslovima hipoksije dolazi do nekroze pojedinih adipocita, što indukuje infiltraciju masnog tkiva makrofagima (395). Adipociti, potom, oslobađaju hemokin, MCP-1, koji stimuliše hemotaksu monocita u masne depoe, sastavljene, pored ostalih ćelijskih komponenti, i od oštećenih adipocita, čime se održava hronična inflamacija u masnom tkivu (395). Naime, hroničnu niskostepenu inflamaciju u masnom tkivu odlikuje povećana produkcija različitih proinflamatornih citokina, kao što su IL-6 i IFN- γ . Uz to, ovoj inflamaciji doprinosi i povećano oslobađanje hemokina, koji zatim stimulišu makrofagnu infiltraciju masnog tkiva, i indukuju nastanak i održavanje IR, kao glavne karakteristike NAFLD i MS (395). Klinička istraživanja su pokazala da između 10% i 35% ukupne koncentracije IL-6 u cirkulaciji potiče iz masnog tkiva, pri čemu je ovaj procenat značajno viši u stanju hipertrofičnog uvećanja ovog tkiva (201).

Rezultati naše studije su pokazali da primena dijeta bogate mastima dovodi do pojave hiperglikemije, porasta koncentracije insulina, kao i značajnog povećanja HOMA-IR indeksa u poređenju sa kontrolom, što ukazuje na prisustvo IR (Grafikon 10, 11 i 12). Ovakve promene bi mogle biti delom objašnjene porastom koncentracije IL-6 u supkutanom i visceralnom masnom tkivu. Animalne studije ukazuju da postoji pozitivna korelacija između ekspresije IL-6 u masnom tkivu i stepena IR, kako u *in vivo*, tako i u *in vitro* uslovima (396). Osim toga, postoje indicije o povratnoj vezi između koncentracije IL-6 i koncentracije glukoze, imajući u vidu da rezultati nekih studija ukazuju da porast koncentracije glukoze indukuje porast koncentracije IL-6, kao i da primena IL-6 dovodi do hiperglikemije i IR (395).

Naša studija je, takođe, pokazala da primena rimonabanta dovodi do značajnog pada koncentracije IL-6 i IFN- γ u supkutano i visceralnom masnom tkivu u HFR grupi u poređenju sa HF grupom (Tabela 7 i 8). Ovakvi nalazi mogli bi se objasniti

antiinflamatornim i citoprotektivnim efektima blokade CB1 receptora, ili njihovom genskom delecijom, što je ustanovljeno u brojnim prekliničkim i kliničkim studijama (138, 292, 293, 312).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da primena dijeta bogate mastima dovodi do značajnog porasta koncentracije leptina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Tabela 7 i 8). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa drugim studijama koje, takođe, ukazuju da je ekspresija leptina u masnom tkivu povećana u odnosu na normalno uhranjene osobe (209, 395). Prema našoj studiji, primena blokatora CB1 receptora dovela je do normalizacije količine supkutanog i visceralnog masnog tkiva (Grafikon 8), ograničavajući time mogućnost akumulacije intracelularnih lipida. Stoga, dolazi do smanjenja produkcije leptina do normalnih vrednosti u oba ispitivana masna tkiva, koje su približne vrednostima u kontrolnoj grupi (Tabela 7 i 8).

Porast koncentracije leptina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u HF grupi bio je udružen sa značajnim promenama histološke građe jetrinog parenhima, karakterističnim za NASH (Slika 1C). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa drugim animalnim studijama, koje su ukazale na dualno dejstvo leptina u NAFLD (397). Leptin može da ispolji protektivnu ulogu u NAFLD, naročito u početnim stadijumima razvoja steatoze. Nasuprot tome, u slučaju dalje progresije bolesti, ovaj adipokin može da indukuje inflamaciju i fibrozu jetre (206). Ovi efekti leptina bi se mogli objasniti pokretanjem procesa kojima se poboljšava stepen insulinske senzitivnosti. Pored toga, leptin ispoljava i antisteatotične efekte redukcijom glukoneogeneze, inhibicijom *de novo* lipogeneze, kao i stimulacijom β -oksidacije u hepatocitima (397). Nasuprot tome, u uznapredovalim stadijumima bolesti, leptin ispoljava sasvim suprotne efekte. Kao moguće objašnjenje takvog efekta leptina, spominje se uloga aktiviranih stelatnih ćelija u kasnijim fazama NAFLD (397). Istraživanja su pokazala da aktivirane stelatne ćelije ekspimiraju leptinski receptor, čijom aktivacijom se, potom, u ovim ćelijama indukuje porast produkcije proinflamatornih i proangiogenih citokina, kao i faktora rasta, što u značajnoj meri doprinosi razvoju inflamacije i fibroze u tkivu jetre (Slika 1C).

Bitno je napomenuti da je u našoj studiji porast produkcije leptina u grupi miševa hranjenih dijetom bogatom mastima bio praćen značajnim smanjenjem unosa hrane.

Ovo smanjenje unosa hrane je bilo mnogo izraženije u toku primene rimonabanta, to jest u obe grupe tretirane rimonabantom (Grafikon 2). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa nekim animalnim studijama, koje su pokazale da gojazne životinje kojima nedostaje leptin (*ob/ob* miševi) imaju značajno viši nivo AEA i 2-AG u hipotalamusu u poređenju sa kontrolama (398). Sa druge strane, akutna primena leptina kod *ob/ob* miševa i normalnih pacova smanjuje koncentraciju endokanabinoida u hipotalamusu, što ukazuje da bi endokanabinoidi mogli imati ulogu u regulaciji unosa hrane, kao deo neuronalnog sistema regulisanog leptinom (398). S tim u vezi, primena antagonista CB1 receptora bi mogla da ispolji pozitivne terapijske efekte u toku gojaznosti i sa njom udruženih poremećaja.

Ova studija je, takođe, pokazala da primena HFD dovodi do porasta koncentracije rezistina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u poređenju sa kontrolom (Tabela 7 i 8). Ovakvo povećanje koncentracije rezistina uočeno je i u drugim studijama koje su našle pozitivnu korelaciju između MS, BMI i težine patohistoloških promena sa povišenim koncentracijama rezistina u cirkulaciji (339). Porast koncentracije rezistina u HF grupi praćen je porastom koncentracije IL-6 i IFN- γ u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u poređenju sa kontrolom (Tabela 7 i 8). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa drugim prekliničkim studijama koje ukazuju da rezistin u značajnoj meri doprinosi nastanku inflamacije i IR na mišjim modelima ove bolesti (400, 401). Takođe, potvrđeno je da rezistin ispoljava proinflamatorno dejstvo stimulacijom ekspresije proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-6, IFN- γ , i dr.) u monocitima i makrofagima, utičući time na pogoršanje stepena IR (206).

U našoj studiji, porast koncentracije rezistina u HF grupi u oba ispitivana masna tkiva je bio praćen porastom koncentracije glukoze i insulina, kao i povišenim HOMA-IR indeksom (Grafikon 10, 11 i 12). Ustanovljeno je da rezistin različitim mehanizmima inhibira intracelularnu insulinsku signalizaciju u adipocitima, prewashodno indukujući SOCS-3, koji predstavlja inhibitor insulinske signalizacije u masnom tkivu (395). U našoj studiji porast koncentracije rezistina u HF grupi bio je praćen značajnim patohistološkim promenama u tkivu jetre (Tabela 7, 8 i Slika 1C). Osim toga što doprinosi nastanku i održavanju hronične niskostepene inflamacije u supkutanom i visceralnom masnom tkivu (Tabela 4 i 5), Rezistin, takođe, dovodi do porasta

inflamacije u tkivu jetre, aktivacijom MAPK puta i faktora koagulacije (206). Našom studijom je pokazano da blokada CB1 kanabinoidnih receptora dovodi do značajnog smanjenja koncentracije rezistina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u HFR grupi u poređenju sa HF grupom (Tabela 7 i 8). Ovakvo smanjenje koncentracije rezistina u našoj studiji moglo bi da bude objašnjeno antiinflamatornim efektom blokade CB1 receptora, koji je uočen u brojnim eksperimentalnim studijama (133, 293, 312). S tim u vezi, antiinflamatorni efekat rimonabanta bi takođe mogao da bude od važnosti, s obzirom da je pokazano da proinflamatorni citokini stimulišu sekreciju rezistina (206).

Uočili smo značajan porast koncentracije apelina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u grupi životinja na HFD u poređenju sa onima koje su bile na kontrolnoj ishrani (Tabela 7 i 8). Ovakav nalaz je kompatibilan sa rezultatima drugih studija, koje su pokazale da apelin utiče na metabolizam glukoze i lipida, kao i da doprinosi razvoju inflamacije (402). Osim toga, rezultati drugih studija ukazuju da je porast koncentracije cirkulišućeg apelina prisutan u toku gojaznosti, kao i u stanjima koja su povezana sa IR (206, 402). Prednost ove studije bi mogla biti i uporedna komparacija patohistoloških promena po grupama, čime se lakše sagledava težina i stepen progresije NAFLD, kao i povezanost ovih promena sa koncentracijom adipokina i drugih ispitivanih parametara.

Naša studija je pokazala da je porast koncentracije apelina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u grupi životinja koje su bile na dijeti bogatoj mastima bio udružen sa značajnim promenama histološke građe jetre (Slika 1C). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima kliničkih studija (403, 404). Naime, kliničke studije su pokazale da postoji statistički signifikantna povezanost koncentracije apelina u cirkulaciji i stepena hepatocelularnog oštećenja (403, 404). Tako su registrovane povišene koncentracije apelina kod pacijenata sa NAFLD u poređenju sa kontrolama. Nasuprot tome, nisu pronađene statistički značajne razlike koncentracije apelina kod pacijenata sa jednostavnom steatozom u poređenju sa onima koji imaju razvijenu formu NASH, (403, 404). Naša studija ukazuje da je primena blokatora CB1 receptora u potpunosti dovela do normalizacije koncentracije apelina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u HFR grupi (Tabela 7 i 8). Ovakav nalaz mogao bi se objasniti redukcijom količine masnog tkiva u ovoj grupi životinja (Grafikon 8), smanjenjem

produkcije proinflamatornih citokina, kako u supkutanom, tako i u visceralnom masnom tkivu (Tabela 7 i 8), kao i poboljšanjem metaboličkog profila u grupi tretiranoj rimonabantom (Grafikon 10, 11 i 12).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da ishrana bogata mastima u značajnoj meri povećava koncentraciju visfatina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u HF grupi u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Tabela 7 i 8). Slično tome, kliničke studije su ustanovile povišenu koncentraciju visfatina kod pacijenata sa NAFLD u poređenju sa zdravim ispitanicima (405). Osim toga, rađene su i animalne studije, koje su utvrdile da visfatin u najvećoj meri proizvode makrofagi, koji infiltrišu masno tkivo u mnogo većem stepenu u poređenju sa adipocitima (406). Ovako povišene koncentracije visfatina u HF grupi bile su praćene porastom koncentracije proinflamatornih citokina (IL-6 i IFN- γ) u supkutanom i visceralnom masnom tkivu (Tabela 7 i 8). Osim toga, značajno je napomenuti da visfatin u masnom tkivu može imati inhibitorno dejstvo na apoptozu makrofaga, produžavajući tako životni vek ovih ćelija, pa time i sopstvenu produkciju (407).

Rezultati naše studije su pokazali da je primena rimonabanta dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije visfatina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu u HFR grupi u poređenju sa HF grupom (Tabela 7 i 8). Ovi rezultati su u saglasnosti sa nalazima studija sprovedenih na humanoj populaciji i eksperimentalnim animalnim modelima, koje potvrđuju da aktivacija CB1 receptora stimuliše deponovanje masti u adipocitima, prvenstveno aktivacijom lipogenih enzima i inhibicijom aktivnosti AMPK (319). Ovakav nalaz se podudara sa našim rezultatima koji se odnose na težinu supkutanog i visceralnog masnog tkiva u HF i HFR grupi (Grafikon 8). S tim u vezi, dobijeni rezultati nam ukazuju da smanjenje količine masnog tkiva usled blokade CB1 receptora redukuje intenzitet inflamatornog procesa u masnom tkivu i sa njim povezanu sekreciju visfatina (Tabela 7 i 8).

Ova studija je, takođe, pokazala da primena HFD dovodi do porasta koncentracije IL-6 i IFN- γ u jetri, u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Tabela 9). U istoj grupi životinja verifikovano je prisustvo glavnih patohistoloških karakteristika NASH (Slika 1C). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima animalnih studija, koje ukazuju da su oštećenje hepatocita i inflamacija ključne karakteristike dalje progresije

jednostavne steatoze u mnogo teže oblike bolesti (133, 178, 252, 283, 389). Dosadašnje animalne studije sprovedene na modelu gojaznosti indukovane primenom dijete bogate mastima pokazale su da dolazi do razvoja IR, koja je praćena aktivacijom signalnih puteva posredstvom TLR4 (engl. *Toll-like receptors*), kao i indukcijom NF-κB signalnog puta (178). Razvoj inflamacije u toku NASH je rezultat interakcije parenhimskih i neparenhimskih ćelija, kao i njihovih biološki aktivnih produkata. Hepatociti su, takođe, meta različitih medijatora, koje stvara visceralno masno tkivo infiltrirano zapaljenjskim ćelijama (178). Zapravo, masno tkivo u toku gojaznosti igra značajnu ulogu u nastanku inflamacije i IR, u najvećoj meri indukujući porast produkcije IL-6 i IFN-γ (395).

Takođe, ima dokaza da je ekspresija ovih citokina u jetri povećana kod pacijenata sa NASH u poređenju sa kontrolama i pacijentima koji su imali samo nalaz jednostavne steatoze. Pri tom je utvrđeno da je ekspresija ovih citokina statistički značajno veća kod pacijenata koji imaju teži oblik bolesti (408, 409). Ono što u najvećoj meri doprinosi porastu hepatičke ekspresije citokina je aktivacija Kupferovih i stelatnih ćelija u jetrinom parenhimu (410). Nedavno je sugerisano da IL-6 ima kontroverznu ulogu u nastanku NAFLD, s obzirom da ovaj citokin ispoljava veoma povoljne efekte u slučajevima jednostavne steatoze, stimulišući regeneraciju hepatocita (411). Sa druge strane, hronično izlaganje hepatocita visokim koncentracijama IL-6 prouzrokuje njihovo oštećenje, razvoj inflamacije i IR (412).

Naša studija pokazuje da primena rimonabanta dovodi do značajnog smanjenja koncentracije IL-6 i IFN-γ u tkivu jetre u HFR grupi u odnosu na HF grupu (Tabela 9). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima pretkliničkih studija, koji ukazuju da dijeta bogata mastima dovodi do porasta hepatičke koncentracije anandamida, gustine CB1 receptora i sinteze masnih kiselina u jetrinom parenhimu, što je bilo redukovano nakon primene antagoniste CB1 receptora (156). Osim toga, nedavno sprovedene kliničke studije pokazale su vezu između koncentracije endokanabinoida u splanhničkoj cirkulaciji i stepena steatoze (413). U ovoj studiji ispitanici sa različitim stadijumima steatoze podvrgnuti su kateterizaciji hepatične vene u kombinaciji sa infuzijom (²H₂) palmitata u periodu gladovanja, i u toku primene niskih doza insulina u infuzionom rastvoru. Tom prilikom je utvrđena pozitivna korelacija između sadržaja masti u tkivu

jetre i ekstrakcije SMK iz splahnjičke cirkulacije tokom primene insulina putem infuzije, sa posledičnim porastom koncentracije 2-AG u arterijskoj i hepaticnoj venskoj krvi. Ovi rezultati ukazuju da jetra u toku steatoze ima sposobnost da u povećanom opsegu preuzima 2-AG i hiperprodukuje TG, koji sadrže zasićene masne kiseline nastale porastom intenziteta *de novo* lipogeneze (413). Našom studijom je pokazano da primena antagoniste CB1 receptora smanjuje inflamaciju u jetrinom parenhimu (Tabela 9 i Slika 1D). Slično tome, neke eksperimentalne i kliničke studije kardiomiopatije i nefropatije pokazale su antiinflamatorne i citoprotektivne efekte primene rimonabanta, prevashodno smanjujući produkciju proinflamatornih citokina inaktivacijom NF-κB signalnog puta (280, 281).

VI ZAKLJUČCI

1. Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije može se zaključiti da primena antagonista CB1 receptora ispoljava mnogobrojne protektivne i potencijalno terapijske efekte na NAFLD izazvane HFD. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja je ispitala efekte blokade CB1 receptora na oksidativno/nitrozativno oštećenje jetre, kao i na promene koncentracije oligoelemenata (Cu, Zn, Mn i Fe) koje nastaju u NAFLD. Ovi efekti su posledica izmene modulacijske uloge ES u patogenezi NAFLD, što se ogleda u značajnom smanjenju OS/NS u tkivu jetre. Endokanabinoidi pogoršavaju OS u NAFLD i doprinose razvoju NASH posredstvom CB1 receptora. Prooksidantni efekti endokanabinoida su potvrđeni redukcijom intenziteta lipidne peroksidacije u obe grupe tretirane rimonabantom. Primena rimonabanta dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti AST i ALT, kao i smanjenja koncentracije MDA. HFD indukuje porast koncentracije NOx u jetri. Rimonabant dovodi do značajnog smanjenja koncentracije NOx.
2. Značajno povećanje sadržaja GSH u jetri miševa na HFD koji su tretirani rimonabantom može da predstavlja adaptivni odgovor hepatocita na povećanu produkciju ROS. Porast GSH ukazuje da blokada CB1 receptora ima blagotvorno dejstvo na redoks status hepatocita.
3. Porast aktivnosti ukupne SOD, kao i njenih izoenzima utvrđen je u jetri miševa tretiranih rimonabantom. S obzirom na ulogu SOD, kao važnog sistema odbrane od štetnog dejstva ROS, može se zaključiti da je porast njegove aktivnosti nakon dejstva rimonabanta doveo do povećanja antioksidativnog kapaciteta hepatocita, čineći ih manje osetljivim na oksidativno i nitrozativno oštećenje.
4. Blokada CB1 receptora ublažava posledice oksidativnog oštećenja hepatocita indukovano porastom koncentracije Fe u ovim ćelijama. Uočena je značajno povišena koncentracija Zn u obe grupe tretirane rimonabantom. Ovakav nalaz ukazuje da blokada CB1 receptora doprinosi ispoljavanju citoprotektivnih efekata Zn, s obzirom na ulogu ovog oligoelementa u održanju strukturnog i funkcionalnog integriteta ćelije. Za razliku od koncentracije Cu, u grupi tretiranoj rimonabantom

registrovana je snižena koncentracija Mn. Ovaj nalaz ukazuje da se inhibicijom CB1 receptora može uticati na sadržaj Cu i Mn u jetri.

5. Rimonabant dovodi do značajnog sniženja hepaticke proporcije palmitinske i stearinske kiseline u obe grupe tretirane ovim antagonistom CB1 kanabinoidnih receptora. Pokazano je da tretman rimonabantom dovodi do povećanja proporcije linoleinske kiseline u jetri, ukazujući da inhibicija CB1 receptora doprinosi citoprotektivnim efektima ove dugolančane masne kiseline.
6. HFD indukuje značajan porast koncentracije glukoze i insulina u plazmi, kao i HOMA-IR indeksa. Farmakološka inhibicija CB1 receptora, koja je dovela do smanjenja glikemije, insulinemije i HOMA-IR indeksa, potvrđuje da endokanabinoidi preko CB1 receptora vrše negativnu modulaciju insulin-zavisnog preuzimanja glukoze.
7. Blokada CB1 receptora dovodi do normalizacije profila adipokina u supkutanom i visceralnom masnom tkivu, kao i smanjenja produkcije hepatickih i adipoznih proinflamatornih citokina. Rimonabant indukuje značajno smanjenje hepatickog inflamatornog odgovora, dovodeći do pada koncentracije IL-6 i IFN- γ i poboljšanja patohistoloških promena u jetri.
8. Rezultati ove doktorske disertacije doprinose rasvetljavanju nepoznanica vezanih za modulacijsku ulogu endokanabinoida i CB1 receptora, kako u regulaciji energetske homeostaze, tako i u patogenezi NAFLD i njenoj progresiji. Blokada CB1 kanabinoidnih receptora ublažava strukturne i funkcionalne promene u jetri miševa na HFD, koje se ispoljavaju u vidu modulacije lipidnog statusa i hepatickog profila SMK, kao i značajnog smanjenja intenziteta OS/NS i poboljšanja patohistoloških promena u jetri. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju značajnu osnovu koja bi omogućila usmeravanje dosadašnjih nedovoljno efikasnih terapijskih procedura u pravcu uspešnijeg i ciljanog lečenja ove bolesti. Bolje razumevanje i preciznije sagledavanje uloge endokanabinoida i CB1 receptora u patogenezi i progresiji NAFLD bi omogućilo njenu efikasniju prevenciju i samim tim produženje životnog veka.

VII LITERATURA

1. Polyzos SA, Mantzoros CS. Nonalcoholic fatty liver disease. *Metab Clin Exp* 2016;65:1007-16.
2. Katski N, Mikhailitidis DP, Mantzoros CS. Nonalcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. *Metab Clin Exp* 2016;65:1109-23.
3. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metab Clin Exp* 2016;65:1096-108.
4. Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Metab Clin Exp* 2016;65:1017-25.
5. Živanović S. Bolesti drevnih ljudi. Osnovi paleopatologije. Srpska književna zadruka, Beograd, 1984.
6. Vučević D, Đorđević D, Jorgačević B, Radosavljević T, Radak Đ, Kovačević D. Povezanost insulinske rezistencije i poremećaja kardiovaskularnog sistema. *Med Istraživ* 2015;49:5-15.
7. Kylin E. Hypertonie, hyperglykaemie, hyperurikemie syndrome. *Zentrablatt Innere Med* 1923;44:105-27.
8. Jorgačević B. Patofiziološki aspekt metaboličkog sindroma. Završni specijalistički akademski rad, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2014.
9. Reaven GM. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
10. Friedman LS. Liver, biliary tract and pancreas disorders. In: Papadakis MA, McPhee SJ, eds. *Current medical diagnosis and treatment*. New York: McGraw Hill; 2016: p. 663-720.
11. Diehl AM, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2017;377:2063-72
12. Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:193-8.
13. Speakman JR. Thrifty genes for obesity, an attractive but flawed idea, and an alternative perspective: the “drifty gene” hypothesis. *Int J Obes* 2008;32:1611-17.

14. Inzucchi SE. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:140-9.
15. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
16. Itoh S, Yougel T, Kawagoe K. Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1987;82:650-4.
17. Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohol like liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988;95:1056-62.
18. Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo ME, De Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis. A long-term follow-up study: comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 2003;48:1909-13.
19. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol* 2015;62:47-64.
20. Schreuder TCMA, Verwer BJ, van Nieuwkerk CMJ, Mulder CJJ. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol* 2008;14:2474-86.
21. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD) and European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;64:1388-402.
22. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
23. Paniagua JA. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes* 2016;7:483-514.
24. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metab Clin Exp* 2016;65:1038-48.

25. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metab Clin Exp* 2016;65:1080-6.
26. d'Assignies G, Fontes G, Kauffmann C, Latour M, Gaboury L, Boulanger Y, et al. Early detection of liver steatosis by magnetic resonance imaging in rats infused with glucose and intralipid solutions and correlation to insulin levels. *Metabolism* 2013;62:1850-7.
27. Adams LA, Ratziu V. Nonalcoholic fatty liver - perhaps not so benign. *J Hepatol* 2015;62:1002-4.
28. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:511-31.
29. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010;51:820-32.
30. Karagozian R, Derdak Z, Baffy G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Metabolism* 2014;63:607-17.
31. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol* 2013;59:550-56.
32. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol* 2015;62:1148-55.
33. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2011;54:344-53.
34. Wree A, Schlattjan M, Bechmann LP, Claudel T, Sowa JP, Stojakovic T, et al. Adipocyte cell size, free fatty acids and apolipoproteins are associated with non-alcoholic liver injury progression in severely obese patients. *Metabolism* 2014;63:1542-52.
35. Angrish MM, Kaiser JP, McQueen CA and Chorley BN. Tipping the Balance: Hepatotoxicity and the 4 Apical Key Events of Hepatic Steatosis. *Toxicological Sciences* 2016;150:261-8.

36. Lefkowitz JH, Haythe JH, Regent N. Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. *Mod Pathol* 2002;15:699-704.
37. Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014;59:1393-405.
38. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Unalp A, Behling CE, Lavine JE, et al. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatology* 2009;49:809-20.
39. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:371-79.
40. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-19.
41. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. *In vivo* assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006;44:27-33.
42. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009;50:1072-78.
43. Guy CD, Suzuki A, Burchette JL, Brunt EM, Abdelmalek MF, Cardona D, et al. Costaining for keratins 8/18 plus ubiquitin improves detection of hepatocyte injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2012;43:790-800.
44. Zatloukal K, French SW, Stumtner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, et al. From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? *Exp Cell Res* 2007;313:2033-49.
45. Franke WW, Denk H, Schmid E, Osborn M, Weber K. Ultrastructural, biochemical, and immunologic characterization of Mallory bodies in livers of griseofulvin-treated mice. Fimbriated rods of filaments containing prekeratin-like polypeptides. *Lab Invest* 1979;40:207-20.

46. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, et al. p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* 2002;160:255-63.
47. Cadrin M, Marceau N, French SW. Cytokeratin of apparent high molecular weight in livers from griseofulvin-fed mice. *J Hepatol* 1992;14:226-31.
48. Mallory FB. Cirrhosis of the Liver. Five different types of lesions from which it may arise. *Johns Hopkins Hosp Bull* 1911;22:69-75.
49. Caldwell SH, Lee VD, Kleiner DE, Al-Osaimi AM, Argo CK, Northup PG, et al. NASH and cryptogenic cirrhosis: a histological analysis. *Ann Hepatol* 2009;8:346-52.
50. Klion FM, Schaffner F. The ultrastructure of acidophilic "Councilman-like" bodies in the liver. *Am J Pathol* 1966;48:755-67.
51. Wakabayashi T. Megamitochondria formation - physiology and pathology. *J Cell Mol Med* 2002;6:497-538.
52. Caldwell SH, Chang CY, Nakamoto RK, Krugner-Higby L. Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:595-617.
53. Matsushashi T, Liu X, Nishizawa Y, Usukura J, Wozniak M, Wakabayashi T. Mechanism of the formation of megamitochondria in the mouse liver induced by chloramphenicol. *Toxicol Lett* 1996;86:47-54.
54. Pinto HC, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, de Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 1996;41:172-79.
55. Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, Yeh MM, Kleiner DE, Unalp-Arida A, et al. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011;53:448-57.
56. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Rovida S, Rametta R, Fatta E, et al. A randomized trial of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia. *World J Gastroenterol* 2014;20:3002-10.
57. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon B. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.

58. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
59. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012;56:1751-9.
60. Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, et al. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:641-9.
61. Patton HM, Lavine JE, Van Natta ML, Schwimmer JB, Kleiner D, Molleston J, et al. Clinical correlates of histopathology in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008;135:1961-71.
62. Moretto M, Kupski C, Mottin C, Repetto G, Garcia Toneto M, Rizzolli J, et al. Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and co-morbidities. *Obes Surg* 2003;13:622-4.
63. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology* 2009;137:532-40.
64. Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC, Patterson B, Grant L, Feirt N, et al. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006;130:1564-72.
65. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006;45:600-6.
66. Kleiner DE, Berk PD, Hsu JY, Courcoulas AP, Flum D, Khandelwal S, et al. Hepatic pathology among patients without known liver disease undergoing bariatric surgery: observations and a perspective from the longitudinal assessment of bariatric surgery (LABS) study. *Semin Liver Dis* 2014;34:98-107.
67. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric surgery reduces features of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Gastroenterology* 2015;149:379-88.
68. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an aasld single topic conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.

69. Schreuder TCMA. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): from epidemiology to diagnosis. Doctoral dissertation. VU University Medical Center, Amsterdam, 2012.
70. Pallayova M, Taheri S. Nonalcoholic fatty liver disease in obese adults: clinical aspects and current management strategies. *Clin Obes* 2014;4:243-53.
71. Shen J, Chan HL, Wong GL. Non-invasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol* 2012;56:1363-70.
72. Adams LA, Feldstein AE. Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors and diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;4:623-35.
73. Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL). *Hepatology* 2000;32:477-81.
74. Ratziu V, Bugianesi E, Dixon J. Histological progression of nonalcoholic fatty liver disease: a critical reassessment based on liver sampling variability. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:821-30.
75. Festi D, Schiumerini R, Marzi L, Di Biase AR, Mandolesi D, Montrone L, et al. The diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease-availability and accuracy of non-invasive methods. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:392-400.
76. Povero D, Feldstein AE. Novel molecular mechanisms in the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab J* 2016;40:1-11.
77. Tahan V, Canbakan B, Balci H, Dane F, Akin H, Can G, et al. Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes nonalcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology* 2008;55:1433-8.
78. Shen J, Chan HL, Wong GL. Non-invasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol* 2012;56:1363-70.
79. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-62.
80. Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:539-43.
81. Valls C, Iannaccone R, Alba E, Murakami T, Hori M, Passariello R, et al. Fat in the liver: diagnosis and characterization. *Eur Radiol* 2006;16:2292-308.

82. Ricci C, Longo R, Gioulis E, Bosco M, Pollesello P, Masutti F, et al. Noninvasive *in vivo* quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol* 1997;27:108-13.
83. Karcaaltincaba M, Akhan O. Imaging of hepatic steatosis and fatty sparing. *Eur J Radiol* 2007;61:33-43.
84. Duman DG, Celikel C, Tuney D, Imeryuz N, Avsar E, Tozun N. Computed tomography in nonalcoholic fatty liver disease: a useful tool for hepatosteatosis assessment? *Dig Dis Sci* 2006;51:346-51.
85. Fishbein M, Castro F, Cheruku S, Jain S, Webb B, Gleason T, et al. Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis and ultrasound. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:619-25.
86. Kim SH, Lee JM, Han JK, Lee JY, Lee KH, Han CJ, et al. Hepatic macrosteatosis: predicting appropriateness of liver donation by using MR imaging-correlation with histopathologic findings. *Radiology* 2006;240:116-29.
87. Machann J, Thamer C, Schnoedt B, Stefan N, Haring HU, Claussen CD, et al. Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized ¹H-MR spectroscopy. *Magn Reson Med* 2006;55:913-7.
88. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, et al. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation *in vivo*. *Am J Physiol* 1999;276:977-89.
89. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274-85.
90. Weiss J, Rau M, Geier A. Nonalcoholic fatty liver disease-epidemiology, clinical course, investigation and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2014;111:447-52.
91. Bataller R, Rombouts K, Altamirano J, Marra F. Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:231-44.
92. Hossain N, Afendy A, Stepanova M, Nader F, Srishord M, Rafic N, et al. Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1224-9.

93. Younossi ZM, Stepanova M, Rafic N, Makhlof H, Younoszai Z, Agrawal R, et al. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatology* 2011;53:1874-82.
94. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011;141:1249-53.
95. Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PloS Medicine* 2014;11(7). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001680>.e1001680.
96. Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, Erario M, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology* 2015;62:1723-30.
97. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010;51:1820-32.
98. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arii S, Imai Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:428-33.
99. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop Lj, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:643-54.
100. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:1972-8.
101. Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004;40:578-84.
102. Pacifico I, Chiesa C, Anania C, De Merulis A, Osborn JF, Romaggioli S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the heart in children and adolescents. *World J Gastroenterol* 2014;20:9055-71.

103. World Health Organization. Noncommunicable diseases progress monitor 2015. WHO Press, Geneva, Switzerland: 2015.
104. Pekmezović T. Molekularna prevencija hroničnih nezaraznih bolesti: koliko smo blizu? *Med Istraživ* 2017;51(1):36-9.
105. GBD 2013 Mortality and causes of death collaborators. Global, regional and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385:117-71.
106. Global burden of diseases, injuries and risk factors study 2010. GBD profile: Serbia. <http://www.healthmetricsandevaluation.org>
107. About 9 voluntary global targets. WHO Global monitoring framework on NCDs. <http://www.who.int/nmh/ncd-tools/definition-targets/en>
108. WHO. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs131/en/index.html>
109. Pirgon O, Bilgin H, Kurku H. Association between insuline resistance and oxidative stress parameters in obese adolescents with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5:33-9.
110. Naučna konferencija “Epidemija gojaznosti i Srbija.” SANU, Beograd, 2016.
111. Fattahi MR, Niknam R, Safarpour AR, Sepehrimanesh M, Lotfi M. The prevalence of metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Middle East J Dig Dis* 2016;8:131-7.
112. The metabolic syndrome. <http://www.eufic.org/article/en/artid/metabolic-syndrome-epidemic>
113. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* 2016;65:425-43.
114. Lonardo A, Sookoian S, Pirola CJ, Targher G. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metab Clin Exp* 2016;65:1136-50.
115. Kramer L. Jetra “plaća danak” lošim navikama u ishrani. *Dani srpske medicinske dijaspore*, Beograd, 2011.
116. Unhealthy diet. http://www.who.int/gho/ncd/riskfactors/unhealthy_diet_text/en/

117. Nascimbeni F, Pais R, Bellentani S, Day CP, Ratziu V, Loria P, et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol* 2013;59:859-71.
118. Smits MM, Ioannou GN, Boyko EJ, Utzschneider KM. Nonalcoholic fatty liver disease as an independent manifestation of the metabolic syndrome: results of a US national survey in three ethnic groups. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:664-70.
119. Tarantino G, Finelli C. What about nonalcoholic fatty liver disease as a new criterion to define metabolic syndrome? *World J Gastroenterol* 2013;19:3375-84.
120. Naderian M, Kollahdoozan S, Sharifi AS, Garmaroudi G, Yaseri M, Poustchi H, et al. Assessment of lean patients with nonalcoholic fatty liver disease in a middle income country; prevalence and its association with metabolic disorders: a cross-sectional study. *Arch Iran Med* 2017;20(4):211-7.
121. Do A, Lim JK. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a primer. *Clin Liv Dis* 2016;7(5):106-8.
122. Van den Berg EH, Amini M, Schreuder TCMA, Dullaart RPF, Faber KN, Alizadeh BZ, et al. Prevalence and determinants of nonalcoholic fatty liver disease in lifelines: a large Dutch population cohort. *PLoS ONE* 2017;12(2) doi:10.1371/journal.pone.0171502
123. Sherif ZA, Saeed A, Ghavimi S, Nouraie SM, Laiyemo AO, Brim H, Ashktorab H. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and perspectives of US minority populations. *Dig Dis Sci* 2016;61(5):1214-25.
124. American Diabetes Association <http://www.diabetes.org/home>
125. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2015. *Diabetes Care* 2015;38(Suppl 1):S11-90.
126. Masharani U. Diabetes mellitus and hypoglycemia. In: McPhee SJ, Papadakis MA, eds. *Current medical diagnosis and treatment*. Mc Graw Hill, New York, 2016, 1190-238.
127. International Diabetes Federation. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.

128. Stone NJ. Treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: synopsis of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association Cholesterol Guideline. *Ann Intern Med* 2014;160:339-43.
129. Juvenile Diabetes Foundation <http://www.jdf.org.index.html>
130. Vučević D, Radosavljević T. Priča o insulinu – 90 godina od otkrića koje je promenilo svet. *Med Podmladak* 2012;63:107-11.
131. Vučević D, Jorgačević B, Đorđević D, Radak Đ, Radosavljević M, Lalić D. Dijabetska vaskularna bolest – ćelijski i molekularni pristup. *Med Istraživ* 2017;51:18-30.
132. Zoppini G, Fedeli U, Gennaro N, Saugo M, Targher G, Bonora E. Mortality from chronic liver diseases in diabetes. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1020-5.
133. Jorgačević B, Mladenović D, Ninković M, Vesković M, Dragutinović V, Vatazević, et al. Rimonabant improves oxidative/nitrosative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Long* 2015; DOI: 10.1155/2015/842108
134. Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res* 2013;52: 165–74.
135. Dowman JK, Tomlinson JW and Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med* 2010; 103:71–83.
136. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016; doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012
137. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183–92.
138. Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC. Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome? *Clin Nutr* 1999;18:353–8.
139. Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci* 2014;15:8591–638.

140. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005;48:634–642.
141. Capasso I, Esposito E, Pentimalli F, Montella M, Crispo A, Maurea N, et al. Homeostasis model assessment to detect insulin resistance and identify patients at high risk of breast cancer development: National Cancer Institute of Naples experience. *J Exp Clin Cancer Res* 2013;32:14.
142. Harris MF. The metabolic syndrome. *Aust Fam Physician* 2013;42:524-7.
143. Sangeeta RK, Ralph AD. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diabetes Vasc Dis Res* 2007;4:13-19.
144. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine* 2008;14:72-81.
145. Westley RL, May FE. A twenty-first century cancer epidemic caused by obesity: the involvement of insulin, diabetes and insulin-like growth factors. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 632461. doi: 10.1155/2013/632461.
146. Phillipa JM, Ralph AD, Robert MC. Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology and mechanisms. *Am Heart J* 2005;149:34-45.
147. Jornayvaz FR, Shulman GI. Diacylglycerol activation of protein kinase C ϵ and hepatic insulin resistance. *Cell Metabol* 2012;15:574-84.
148. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012;142:711-25.
149. Environmental factor and nutrition related diseases. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R, eds. *Robbins Basic Pathology*, Saunders, Elsevier Inc, New York, 2007, 279-318 (prevod sa engleskog jezika).
150. Ying X, Jiang Y, Qian Y.B. Association between insulin resistance, metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease in Chinese adults. *Iranian journal of public health* 2012;41:45-9.
151. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2013;48:434–441.

152. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829–38.
153. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343–51.
154. Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman CE, Neese RA, Tremaroli JD, Hirsch J. Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *J Lipid Res* 2000; 41:595–604.
155. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDouglass OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res* 2012;53:227-46.
156. Osei-Hyiaman D, De Petris M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005;115:1298-1305.
157. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 2014;7:221–239.
158. Friedman JM. Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 2009; 459:340-2.
159. Karalis DG. Intensive lowering of low density lipoprotein cholesterol levels for primary prevention of coronary artery disease. *Mayo Clin Proc* 2009;84:345-52.
160. Canto C, Auwerx J. Cell biology. FGF21 takes a fat bite. *Science* 2012;336:675–6.
161. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1079–86.
162. Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res* 2009;5:162–6.
163. Garbarino J, Sturley SL. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metabol Care* 2009;12:110-16.

164. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 2009;284:5637-44.
165. Charlton M, Viker K, Krishnan A. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2009;49:1375-84.
166. Micić DD, Pejković D. Insulinska rezistencija i diabetes-etiotogeneza, kliničke i terapijske karakteristike. U: Đorđević PB, urednik. Bazični i praktični problemi dijabetologije i bolesti metabolizma – Inovacije znanja XI. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2005. 15-23.
167. Nolan CJ, Larter CZ. Lipotoxicity: why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:703-6.
168. Fuchs CD, Claudel T and Trauner M. Role of metabolic lipases and lipolytic metabolites in the pathogenesis of NAFLD. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2014;25:576-585.
169. Lei OL, Eric LK, Rosalind AC. Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:246-51.
170. Snel M, Jonker TJ, Schoones J, Lamb H, de Roos A, Pijl H, et al. Ectopic fat and insulin resistance: Pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. *Int J Endocrinol* 2012; doi:10.1155/2012/983814.
171. Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:379-85.
172. Ibrahim SH, Kohli R, Gores GJ. Mechanisms of Lipotoxicity in NAFLD and Clinical Implications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:131–140.
173. Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:365–371.
174. Gill JM, Sattar N. Ceramides: a new player in the inflammation-insulin resistance paradigm? *Diabetologia* 2009;52:2475–77.

175. Clarke CJ, Cloessner EA, Roddy PL, Hannun YA. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is the primary neutral sphingomyelinase isoform activated by tumour necrosis factor- α in MCF-7 cells. *Biochem J* 2011;435:381–90.
176. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2011;60:313–26.
177. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* 2011;17:2801–11.
178. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology & Medicine* 2012;52:59–69.
179. Videla LA. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatol* 2009;1:72-78.
180. Podrini C, Borghesan M, Greco A, Pazienza V, Mazzoccoli G, Vinciguerra M. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NALFD). *Curr Pharm Des* 2013;19:2737-46.
181. Pan MH, Lai CS, Tsai ML, Ho CT. Chemoprevention of nonalcoholic fatty liver disease by dietary natural compounds. *Molecular Nutrition and Food Research* 2014;58:147-71.
182. Savu O, Sunkari VG, Botusan IR, Grunler J, Nikoshkov A, Catrina SB. Stability of mitochondrial DNA against reactive oxygen species (ROS) generated in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:470-9.
183. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 2008;57:1071-7.
184. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta* 2011;412:1297–1305.
185. Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem*. 2005;280:9887-94.

186. Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-Behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghzal GJ, et al. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17787-92.
187. Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006;160:1–40.
188. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006;6:1-28.
189. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1095-1105.
190. Nishida M, Funahashi T, Shimomura I. Pathophysiological significance of adiponectin. *Med Mol Morphol* 2007;40:55-67.
191. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006;130:207–10.
192. Martin GG, Landrock D, Chung S, Dangott LJ, McIntosh AL, Mackie JT, et al. Loss of fatty acid binding protein-1 alters the hepatic endocannabinoid system response to a high-fat diet. *J Lipid Res* 2017;58:2114-26.
193. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marsetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age related diseases. *Ageing Res Rev* 2009;8:18-30.
194. Bruning U, Fitzpatrick SF, Frank T, Birtwistle M, Taylor CT, Cheong A. NFκB and HIF display synergistic behaviour during hypoxic inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:1319-29.
195. Vučević D, Radak Đ, Milovanović I, Radosavljević T, Mladenović D. Patofiziološki mehanizmi angiogeneze u aterogenezi. *Med Pregl* 2013;66:297-306.
196. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011;121:2094-101.
197. Kaelin WG JR, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008;30:393-402.

198. Wang B, Wood IS, Trayhurn P. Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes. *J Endocrinol* 2008;198:127-34.
199. Ruiz de Azua I, Mancini G, Srivastava RK, Rey AA, Cardinal P, Tedesco L. Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *J Clin Invest* 2017;127(11):4148-62.
200. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 2012;18:363-74.
201. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009;117:241–50.
202. Finucane OM, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc* 2012;71:622-33.
203. Kamchybekov U, Figulla HR, Gerdes N, Jung C. Macrophage migration inhibitory factor is elevated in obese adolescents. *Arch Physiol Biochem* 2012;118:204-9.
204. Koska J, Stefan N, Dubois S, Trinidad C, Considine RV, Funahashi T, et al. mRNA concentrations of MIF in subcutaneous abdominal adipose cells are associated with adipocyte size and insulin action. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:842-50.
205. Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M, et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* 2009;105:99-107.
206. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism Clinical and Experimental* 2016;65:1062-79.
207. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:365–83.
208. Zhang Y, Proenca R, Maffei M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.

209. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-70.
210. Murphy R, Carroll RW, Krebs JD. Pathogenesis of the metabolic syndrome: insights from monogenic disorders. *Mediators Inflamm* 2013; doi 10.1155/2013/290214.
211. Martos-Moreno G, Chowen JA, Argente J. Metabolic signals in human puberty, effects of over and undernutrition. *Mol Cell Endocrinol* 2010;324:70-81.
212. Mayer-Davis EJ, D'Agostino R, Karter AJ. Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA* 1998;279:669-74.
213. Dubuc GR, Phinney SD, Stern JS, Havel PJ. Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism* 1998;47:429-34.
214. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002;110:1093-103.
215. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism* 2015;64:24-34.
216. Anty R, Lemoine M. Liver fibrogenesis and metabolic factors. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35:10-20.
217. Dattaroy D, Pourhoseini S, Das S, Alhasson F, Seth RK, Nagarkatti M, et al. Micro-RNA 21 inhibition of SMAD7 enhances fibrogenesis via leptin-mediated NADPH oxidase in experimental and human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015;308:298–312.
218. Lemoine M, Ratziu V, Kim M. Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2009;29:1431-8.
219. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:525-40.
220. Tam CS, Clement K. Obesity and low-grade inflammation: A paediatric perspective. *Obesity Rev* 2010;11:118-26.

221. Fukushima J, Kamada Y, Matsumoto H. Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatology Res* 2009;39:724-38.
222. Jung TW, Lee YJ, Lee MW, Kim SM. Full-length adiponectin protects hepatocytes from palmitate-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH terminal kinase. *FEBS J* 2009;276:2278–84.
223. Saxena NK, Anania FA. Adipocytokines and hepatic fibrosis. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:153–61.
224. Ordovas JM, Corella D. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Kidney International* 2008;74:10-14.
225. Roh S, Song SH, Choi KC. Chemerin-a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:1013-18.
226. Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS letters* 2008;582:573-8.
227. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramirez B, Rotellar F, Valenti V, et al. Increased levels of chemerin and its receptor, chemokine-like receptor-1, in obesity are related to inflammation: tumor necrosis factor- α stimulates mRNA levels of chemerin in visceral adipocytes from obese patients. *J Surg Obes Relat Dis* 2013; doi:10.1016/j.soard.2011.11.001.
228. Hart R, Greaves DR. Chemerin contributes to inflammation by promoting macrophage adhesion to VCAM-1 and fibronectin through clustering of VLA-4 and VLA-5. *J Immunol* 2010;185:3728–39.
229. Yang RZ, Lee MJ, Hu H. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:1253-61.
230. De Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 2007;56:1655-61.
231. Tan BK, Farhatullah S. Omentin-1, a novel adipokine, is decreased in overweight insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: *ex vivo*

- and *in vivo* regulation of omentin-1 by insulin and glucose. *Diabetes* 2008;57:801-8.
232. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, et al. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obesity Surgery* 2009;19:1574–80.
 233. Yu S, Zhang Y, Li MZ, Xu H, Wang Q, Song J, et al. Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients. *Chinese Medical Journal* 2012;125:3440–4.
 234. Lu Y, Zhu X, Liang GX, Cui RR, Liu Y, Wu SS, et al. Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF-kB/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino Acids* 2012;43:2125–36.
 235. Bian Z and Ma X. Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Frontiers in Physiology* 2012; doi: 10.3389/fphys.2012.00248
 236. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. *J. Cell. Mol. Med* 2006;10:76-99.
 237. Schuppan D and Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838–51.
 238. Khalid A. Alswat. The Role of Endocannabinoids System in Fatty Liver Disease and Therapeutic Potentials. *Saudi J Gastroenterol.*2013;19:144-51.
 239. Kim D, Kim W, Kwak MS, Chung GE, Yim JY, Ahmed A, et al. Inverse association of marijuana use with nonalcoholic fatty liver disease among adults in the United States. *PLoS One* 2017;12(10):e0186702.doi: 10.1371/journal.pone.0186702
 240. Sviženska I, Dubovy P, Šulcova A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2008;90:501-511.
 241. Rodriguez De Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: Physiology and Pharmacology. *Alcohol & Alcoholism* 2005;40:2–14.
 242. Di Marzo V. CB1 receptor antagonism: Biological basis for metabolic effects. *Drug Discovery Today* 2008;13:1026-1041.

243. Hussien NI, El-Kerdasy HI, Ibrahim ME. Protective effect of rimonabant, a cannabinoid receptor 1 antagonist, on nonalcoholic fatty liver disease in a rat model through modulation of the hepatic expression of activin A and follistatin. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95:1433-41.
244. Naughton SS, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. Fatty Acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *Int J Endocrinol* 2013; doi: 10.1155/2013/361895.
245. Sugiura T. Biosynthesis of anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Cannabinoids and the Brain*. 2008:15–30.
246. Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, et al. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:345–53.
247. Matias I, Cristino L, Di Marzo V. Endocannabinoids: Some Like it Fat (and Sweet Too). *Journal of Neuroendocrinology* 2008;20:100–109.
248. Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003;63:908–14.
249. Xu A, Wang Y, Keshaw H. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100.
250. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18:2300-08.
251. Ninomiya M, Kondo Y, Shimosegawa T. Murine models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *ISRN Hepatology* 2013; DOI: 10.1155/2013/237870
252. Jorgačević B, Mladenović D, Ninković M, Prokić V, Stanković M, Aleksić V, et al. Dynamics of oxidative/nitrosative stress in mice with methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Exp Toxicol* 2013; DOI: 10.1177/0960327113506723

253. Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 2005;8:585–9.
254. Cheung BMY, Cheung TT, Samaranayake NR. Safety of antiobesity drugs. *Ther Adv Drug Saf* 2013;4:171–81.
255. Pi-Sunyer F, Aronne L, Heshmati H, Devin J, Rosenstock J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;295:761–75.
256. Scheen A, Finer N, Hollander P, Jensen M, Van Gaal L. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 2006;368:1660–72.
257. Butler H, Korbonits M. Cannabinoids for clinicians: the rise and fall of the cannabinoid antagonists. *Eur J Endocrinol* 2009;161:655–62.
258. Despres J, Golay A, Sjostrom L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 2121–2134.
259. Li M, Cheung B. Pharmacotherapy for obesity. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:804–10.
260. Samat A, Tomlinson B, Taheri S, Thomas G. Rimonabant for the treatment of obesity. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2008;3:187–93.
261. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
262. Girotti M, Khan N, McLellan B. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991;31:32-35.
263. Hibbs JB, Taintor R, Vavrin Z, Rachlin M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;157:87-94.
264. Anderson ME. Tissue glutathione. In: Greenwald RA, editor. *The DTNB-GSSG reductase recycling assay for total glutathione (GSH+1/2GSSG)*. CRC Press: Boca Raton, Florida. 1986, pp. 317-323.
265. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978;90:81-89.

266. Enamorado-Baez SM, Abril JM, Gomez-Guzman JM. Determination of 25 trace element concentrations in biological reference materials by ICP-MS following different microwave-assisted acid digestion methods based on scaling masses of digested samples. *ISRN Analytical Chemistry* 2013; ID 851713, 14 pages.
267. Allain CC, Poon LS, Richmond R. Plasma lipid determination. *Clin Chem* 1974;20:470-75.
268. Friedwald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of the LDL cholesterol in plasma, without use of the centrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
269. Trinder P. PAP method. *Ann Clin Biochem* 1983;6:485.
270. Biligh EC, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:913-917.
271. Ichihara K, Fukubayashi K. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* 2010;51:635-40.
272. Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2010;59:926-34.
273. Yuen VG, McNeill JH. Comparison of the glucose oxidase method for glucose determination by manual assay and automated analyzer. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;44:543-546.
274. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
275. Estradella D, Da Penha Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Ribeiro EB, Damaso AR, de Piano A. Lipotoxicity: Effects of Dietary Saturated and Transfatty Acids. *Mediators of Inflammation* 2013; doi: 10.1155/2013/137579.
276. Pagotto U and Pasquali R. Fighting obesity and associated risk factors by antagonising cannabinoid type 1 receptors. *Lancet* 2005;365:1363-4.
277. Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Despres JP. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese

- patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 2008;31:229-40.
278. Bosier B, Muccioli G, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochemical Pharmacology* 2010;80:1-12.
279. Hudson BD, Hébert TE, Kelly MEM. Ligand-and heterodimer-directed signaling of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2010;77:1-9.
280. Mukhopadhyay P, Pan H, Rajesh M, Bátkai S, Patel V, Harvey-White J, et al. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *Br J Pharmacol* 2010;160:657-68.
281. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Patel V, Kashiwaya Y, Liaudet L, et al. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2010;85:773-84.
282. Gornicka A, Morris-Stiff G, Thapaliya S, Papouchado BG, Berk M, Feldstein AE. Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in a dietary murine model of steatohepatitis. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:437-445.
283. Aubert J, Bergiche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B. Increased expression of cytochrome P4502E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35:630-637.
284. Yuzefovych LV, Musiyenko SI, Wilson GL, Rachek LI. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice. *PLOS ONE* 2013; 8: e54059. DOI: 10.1371/journal.pone.0054059.
285. Vettor R, Pagano C. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 51-63.
286. Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, Morris EM, Naples SP, Borengasser SJ, et al. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic

- steatosis and contributes to the natural history of nonalcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J Hepatol* 2010;52:727-36.
287. Ha SK, Chae C. Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity. *Exp Anim* 2010;59:595-604.
288. Garcia-Monzon C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol* 2000;32:331-8.
289. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-324.
290. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11:183-90.
291. Bermudez-Silva FH, Cardinal D, Cota D. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J Psychopharmacol* 2012;26:114-24.
292. Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ. Cannabinoids, eating behaviour, and energy homeostasis. *Drug Test Analysis* 2014;6:52-8.
293. Nam DH, Lee MH, Kim JE, Song HK, Kang YS, Lee JE, et al. Blockade of cannabinoid receptor 1 improves insulin resistance, lipid metabolism and diabetic nephropathy in db/db mice. *Endocrinology* 2012;153:1387-96.
294. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:438-455.
295. Pacher P, Hasko G. Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2008;153:252-262.
296. Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease-successes and failures. *FEBS J* 2013;280:1918-1943.
297. Tibirica E. The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2: DOI:10.1186/1758-5996-2-5.
298. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *IJBCB* 2007;39:44-84.

299. Castro L, Demicheli V, Tórtora V, Radi R. Mitochondrial protein tyrosine nitration. *Free Radic Res* 2011;45:37-52.
300. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134:489-492.
301. Nešović-Ostojić J, Mladenović D, Ninković M, Vučević D, Bondžić K, Ješić-Vukićević R, Radosavljević T. The effects of cold-induced stress on liver oxidative injury during binge drinking. *Hum Exp Toxicol* 2012;31:387-96.
302. Ahmed U, Latham PS, Oates PS. Interactions between hepatic iron and lipid metabolism. *World J Gastroenterol* 2012;18:4651-58.
303. Datz C, Felder TK, Niederseer D, Aigner E. Iron homeostasis in the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* 2013;43:215-24.
304. Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K et al. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 2007;170:967-80.
305. Zhong W, Zhao Y, Sun X, Song Z, McClain CJ, Zhou Z. Dietary zinc deficiency exaggerates ethanol-induced liver injury in mice: involvement of intrahepatic and extrahepatic factors. *PLOS ONE* 2013; 8: e76522.
306. Schnabl B, Czech B, Valletta D, Weiss TS, Kirovski G, Hellerbrand C. Hellerbrand C. Increased expression of zinc finger protein 267 in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4:661-66.
307. Zhang C, Lu X, Tan Y, Li B, Miao X, Jin L, et al. Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model. *PLOS ONE* 2012; 7: e49257.
308. Zhou Z. Zinc and alcoholic liver disease. *Dig Dis* 2010;28:745-50.
309. Miao X, Sun W, Fu Y, Cai L. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Front Med* 2013;7:31-52.
310. Guo CH, Chen PC, Ko WS. Status of essential trace minerals and oxidative stress in viral hepatitis C patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Med Sci* 2013;10:730-37.

311. Ioannou GN. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:84-95.
312. Osei Hyiaman D, Liu J and Yhou L. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet induced steatosis, dyslipidemia and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3160-9.
313. Park BJ, Kim YJ, Kim DH, Kim W, Jung YJ, Yoon JH, et al. Visceral adipose tissue area is an independent risk factor for hepatic steatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:900-7.
314. Van der Poorten D, Milner KL, Hui J, Hodge A, Trenell MI, Kench JG, et al. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 2008;48:449-57.
315. Eguchi Y, Eguchi T, Mizuta T, Ide Y, Yasutake T, Iwakiri R, et al. Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2006;41:462-9.
316. Alswat KA. The role of endocannabinoids system in fatty liver disease and therapeutic potentials. *Saudi J Gastroenterol* 2013;19:144-51.
317. Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izo AA, Di Marzo V. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:553-65.
318. Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despers Jp, Di Marzo V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:692-9.
319. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and b-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2006;91:3171–3180.
320. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat metab Disord* 2004;28:12-21.

321. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* 2010;42:320-30.
322. Chen B, Lam KS, Wang Y, Wu D, Lam MC, Shen J, et al. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:549-56.
323. Neels JG, Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 2006;116:33-5.
324. Christiaensen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes* 2005;29:146-50.
325. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
326. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:2992-3002.
327. Pacher P, Bátkai S and Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006;58:389-462.
328. Shi D, Zhan X, Yu X, Jia M, Zhang Y, Yao J, et al. Inhibiting CB1 receptors improves lipogenesis in an in vitro non-alcoholic fatty liver disease model. *Lipid Health Dis* 2014;13:173-9.
329. Bartelt A, Orlando P, Mele C, Ligresti A, Toedter K, Scheja L, et al. Altered endocannabinoid signalling after a high-fat diet in Apoe (-/-) mice: relevance to adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetologia* 2011;54:2900-10.
330. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Bátkai S, et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005;54:2838-43.
331. Monteleone P, Matias I, Martiadis V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V. Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1216-21.

332. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52:774-88.
333. Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 2012;15:665-74.
334. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081-90.
335. Musso G, Gambino R and Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009;48:1-26.
336. Yasutake K, Nakamuta M, Shima Y, Ohyama A, Masuda K, Haruta N, et al. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:471-7.
337. Wouters K, van Bilsen M, van Gorp PJ, Bieghs V, Lütjohann D, Kerksiek A, et al. Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Lett* 2010;584:1001-5.
338. Savard C, Tartaglione, EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* 2013;57:81-92.
339. Ioannou GN, Haigh WG, Thorning D, Savard C. Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J Lipid Res* 2013;54:1326-34.
340. Ioannou GN, Van Rooyen DM, Savard C, Haigh WG, Yeh MM, Teoh NC, et al. Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. *J Lipid Res* 2015;56:277-85.
341. Simonen P, Kotronen A, Hallikainen M, Sevastianova K, Makkonen J, Hakkarainen A, et al. Cholesterol synthesis is increased and absorption

- decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol* 2011;54:153-9.
342. Hendrikx T, Walenbergh SM, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R. Lysosomal cholesterol accumulation: driver on the road to inflammation during atherosclerosis and non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Rev* 2014;15:424-33.
343. Trauner M, Arrese M and Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:299-310.
344. Enjoji M, Yasutake K, Kohjima M, Nakamuta M. Nutrition and nonalcoholic fatty liver disease: the significance of cholesterol. *Int J Hepatol* 2012;doi.10.1155/2012/925807.
345. Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, et al. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 2011;52:1626-35.
346. Malhi H and Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008;28:360-9.
347. Pinzani M. Pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis and basis for treatment. *Dig Dis* 2011;29:243-48.
348. Tall AR and Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2015;15:104-16.
349. Bieghs V, van Gorp PJ, Walenbergh SM, Gijbels MJ, Verheyen F, Buurman WA, et al. Specific immunization strategies against oxidized low-density lipoprotein: a novel way to reduce nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2012;56:894-903.
350. Bieghs V, Walenbergh SM, Hendrikx T, van Gorp PJ, Verheyen F, Olde Damink SW, et al. Trapping of oxidized LDL in lysosomes of Kupffer cells is a trigger for hepatic inflammation. *Liver Int* 2013;33:1056-61.
351. Dixon LJ, Berk M, Thapaliya S, Papouchado BG, Feldstein AE. Caspase-1-mediated regulation of fibrogenesis in diet-induced steatohepatitis. *Lab Invest* 2012;92:713-23.
352. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation and fibrosis in mice. *Hepatology* 2014;59:898-910.

353. Treeprasertsuk, S, Lopez-Jimenez F and Lindor, KD. Nonalcoholic fatty liver disease and the coronary artery disease. *Dig Dis Sci* 2011;56:35-45.
354. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients* 2013;5:1544-60.
355. Després JP, Ross R, Boka G, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Effect of rimonabant on the high-triglyceride/ low-HDL-cholesterol dyslipidemia, intraabdominal adiposity and liver fat: the ADAGIO-Lipids trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;9:416-23.
356. Van Gaal L, Rissanen A, Scheen A, Ziegler O, Rössner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005;365:1389-97.
357. Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodés-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, et al. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299:1547-60.
358. Sugamura K, Sugiyama S, Fujuwara Y, Matsubara J, Akiyama E, Maeda H, et al. Cannabinoid 1 receptor blockade reduces atherosclerosis with enhances reverse cholesterol transport. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:141-7.
359. Stanković MN, Mladenović, DR, Djuričić I, Šobajić SS, Timić J, Jorgačević B, et al. Time-dependent changes and association among liver free fatty acids, serum lipid profile and histological features in mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Arch Med Res* 2014;45:116-24.
360. Jung TW, Yoo HJ and Choi KM. Implication of hepatokines in metabolic disorders and cardiovascular diseases. *BBA Clin* 2016;5:108-13.
361. Povero D and Feldstein AE. Novel molecular mechanisms in the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab J* 2016;40:1-11.
362. Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay P, et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab* 2008;7:227-35.

363. El-Badry AM, Graf R, Clavien PA. Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver? *J Hepatol* 2007;47:718-25.
364. Ress C, Kaser S. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World J Gastroenterol* 2016;22:1664-73.
365. Annette D, de Kloet, Stephen C. Woods Minireview: endocannabinoids and their receptors as target for obesity therapy. *Endocrinology* 2009;150:2531-2536.
366. Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, et al. The Cb1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 2005;19:1567-1569.
367. Lindborg KA, Teachey MK, Jacob S, Henriksen EJ. Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12:722-730.
368. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52:1-8.
369. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
370. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004;63:582-92.
371. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007;133:496–506.
372. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:424–31.
373. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49:755–61.

374. Gastaldelli A, Kozakova M, Hojlund K, Flyvbjerg A, Favuzzi A, Mitrakou A, et al. Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population. *Hepatology* 2009;49:1537–44.
375. Aygun C, Kocaman O, Sahin T, Uraz S, Eminler AT, Celebi A, et al. Evaluation of metabolic syndrome frequency and carotid artery intima-media thickness as risk factors for atherosclerosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2007;53:1352–57.
376. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917–23.
377. Kantartzis K, Rittig K, Cegan A, Machann J, Schick F, Balletshofer B, et al. Fatty liver is independently associated with alterations in circulating HDL2 and HDL3 subfractions. *Diabetes Care* 2008;31:366–8.
378. Gastaldelli A. Fatty liver disease: the hepatic manifestation of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 2010;33:546–47.
379. Ribeiroiro T, Swain J, Sarr M, Kendrick M, Que F, Sanderson S, et al. NAFLD and insulin resistance do not increase the risk of postoperative complications among patients undergoing bariatric surgery—a prospective analysis. *Obes Surg* 2011;21:310–15.
380. Huang HL, Lin WY, Lee LT, Wang HH, Lee WJ, Huang KC. Metabolic syndrome is related to nonalcoholic steatohepatitis in severely obese subjects. *Obes Surg* 2007;17:1457–63.
381. Gastaldelli A, Basta G. Ectopic fat and cardiovascular disease: What is the link? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:481–90.
382. Ortiz-Lopez C, Lomonaco R, Orsak B, Finch J, Chang Z, Kochunov VG, et al. Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) *Diabetes Care* 2012;35:873–8.
383. Kotronen A, Juurinen L, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Yki-Jarvinen H. Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes. *Gastroenterology* 2008;135:122–30.

384. Albu JB, Curi M, Shur M, Murphy L, Matthews DE, Pi-Sunyer FX. Systemic resistance to the antilipolytic effect of insulin in black and white women with visceral obesity. *Am J Physiol* 1999;277:551–60.
385. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697–738.
386. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:57–63.
387. Moore MC, Connolly CC, Cherrington AD. Autoregulation of hepatic glucose production. *Eur J Endocrinol* 1998;138:240–8.
388. Boden G, Chen X, Capulong E, Mozzoli M. Effects of free fatty acids on gluconeogenesis and autoregulation of glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 2001;50:810–16.
389. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Barbosa Aguila M, Mandarim-de-Lacerda CA. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed with high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46:212-33.
390. Chutturi S, Abeygunasekera S, Farrel GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: insulin secretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-9.
391. Caldwell SH, Hespeneide EE, Redick JA, Iezzoni JC, Battle EH, Sheppard BL, et al. A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:519-25.
392. Lin HZ, Jang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000;6:998-1003.
393. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001;358:893-4.
394. Mather RJ, Verma S, Anderson TJ. Impaired endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll cardiol* 2001 37:1344-50.
395. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin

- resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:6184-223.
396. Bastard JP, Maachi M, van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2084–89.
397. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. *Metabolism* 2015;64:60–78.
398. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001;410:822-25.
399. Jamali R, Hatami N and Kosari F. The correlation between serum adipokines and liver cell Damage in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepat Mon* 2016; 16(5): doi: 10.5812/hepatmon.37412.
400. Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic “hyper-resistinemia” leads to *in vivo* insulin resistance in normal rats. *J Clin Investig* 2004;114:224–31.
401. Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, et al. Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 2006;55:3083–90.
402. Chapman NA, Dupre DJ, Rainey JK. The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR. *Biochem Cell Biol* 2014;92:431–40.
403. Ercin CN, Dogru T, Tapan S, Kara M, Haymana C, Karadurmus N, et al. Plasma apelin levels in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2010;59:977–81.
404. Aktas B, Yilmaz Y, Eren F, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, et al. Serum levels of vaspin, obestatin, and apelin-36 in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2011;60:544–9.
405. Auguet T, Terra X, Porrás JA, Orellana-Gavaldà JM, Martínez S, Aguilar C, et al. Plasma visfatin levels and gene expression in morbidly obese women with associated fatty liver disease. *Clin Biochem* 2013;46:202–8.

406. Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eisen JA, Shuldiner AR, et al. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:927–35.
407. Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, et al. Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem* 2008;283:34833–43.
408. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1372–79.
409. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A, et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2007;17:1374–8
410. Dela Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005;129:1663–74.
411. Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao BL. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2004;40:933–41.
412. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005;146:3417–27.
413. Westerbacka J, Kotronen A, Fielding BA, Wahren J, Hodson L, Perttilä J, et al. Splanchnic balance of free fatty acids, endocannabinoids, and lipids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010;139:1961–71.

VIII SPISAK SKRAĆENICA

- ACC** – acetil-CoA karboksilaza
- ACTH** – adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*)
- AEA** – anandamid (N-arahidonoil-etanolamid)
- 2-AG** – 2-arahidonoil-glicerol
- AGE** – krajnji produkt glikozilacije (engl. *advanced glycation end-product*)
- ALT** – alanin aminotransferaza
- AMPK** – adenzin monofosfat kinaza
- ANOVA** – analiza varijanse
- Apo B-100** – apolipoprotein B-100
- AST** – aspartat aminotransferaza
- ATP** – adenzin trifosfat
- BMI** – indeks telesne mase (ITM, engl. *body mass index*)
- cAMP** – ciklični adenzin monofosfat
- CART** – kokain i amfetamin regulisani transkript (engl. *cocain and amphetamine regulated transcript*)
- CB1** – kanabinoidni receptor 1
- CB2** – kanabinoidni receptor 2
- ChREBP** – protein koji vezuje ugljenohidratni respondivni element
(engl. *carbohydrate responsive element-binding protein*)
- CPT1** – karnitin palmitoil transferaza 1
- CT** – kompjuterizovana tomografija
- CYP** – citohrom P 450 (engl. *cytochrome P450*)
- DAG** – diacilglicerol
- DALY** – godine života prilagođene invalidnosti (engl. *disability adjusted life years*)

DM tip II – dijabetes melitus (*diabetes mellitus*) tip 2

DTNB – 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina

EDTA– etilendiaminotetrasirćetna kiselina

ELISA – engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

ELOVL6 – engl. *long chain fatty acid elongase 6*

eNOS – endotelna konstitutivna NO-sintaza

ER – endoplazmatski retikulum

ES – endonakabinoidni sistem

ET-1 – endotelin-1

FAAH – engl. *fatty acid amide hidrolase*

FAAS – engl. *flame atomic absorption spectrometry*

FABPs – proteini koji vezuju masne kiseline (engl. *fatty acid binding proteins*)

FAK – fokalna adhezijska kinaza

FAS – Sintaza masnih kiseline (engl. *fatty acid synthase*)

FATPs – proteini koji transportuju masne kiseline (engl. *fatty acid transport proteins*)

FER – engl. fat to energy ratio

FGF21 – fibroblastni faktor rasta 21 (engl. *fibroblast growth factor 21*)

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GCKR – engl. *glucokinase /hexokinase 4/ regulator*

GF AAS – engl. *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

GSH – glutation

γ-GT – gama-glutamiltranspeptidaza

HAART – engl. *highly active antiretroviral therapy*

HCl – hlorovodonična kiselina

HDL – lipoprotein velike gustine (engl. *high density lipoprotein*)

HE – hematoksilin i eozin

HFD – dijeta bogata mastima (engl. *high fat diet*)

HIV – virus humane imunske deficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

¹H-MRS – spektroskopija magnetnom rezonancom (engl. *¹H-magnetic spectroscopy*)

4-HNE – 4-hidroksinonenal

HNF-4 α – hepatocitni nuklearni faktor-4 α

H₂O₂ – vodonik peroksid

HOBP – hronična opstruktivna bolest pluća

HOMA – engl. *homeostatic model assessment*

HSL – hormon senzitivna lipaza

ICAM-1 – intracelularni adhezivni molekul (engl. *intracellular adhesion molecule-1*)

IDF – Međunarodno udruženje za dijabetes (engl. *International diabetes federation*)

I κ B κ - β – infibitor kB kinaze- β

iNOS – inducibilna NO sintaza

IR – insulinska rezistencija

IRS – supstrat za insulinski receptor (engl. *insulin receptor substrates*)

JNK-1 – jun-N-terminalna kinaza-1

KCN – kalijum cijanid

KVS – kardiovaskularni sistem

LPL – lipoproteinska lipaza

LDL – lipoprotein male gustine (engl. *low density lipoprotein*)

LXR – receptor X u jetri (engl. *liver X receptor*)

MAG – monoacilglicerol lipaza

MAP – mitogen aktivirani protein

MCD – metionin-holin deficijentna dijeta (engl. *methionine-choline deficient diet*)

MCP-1 – monocitni protein hemotakse-1 (engl. *monocyte chemotactic protein-1*)

MDA – malondialdehid

MFUB – Medicinski fakultet u Beogradu

MIF – faktor koji inhibira migraciju (engl. *migratory inhibiting factor*)

mikroRNK – engl. *microRNA*

Mlx – engl. Max-like protein X

MS – metabolički sindrom

α -MSH – α -melanostimulišući hormon

MTP – mikrozomni transportni protein

NADA – N-arahidonoildopamin

NAD⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid u oksidovanom obliku

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid u redukovanom obliku

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NO – azot monoksid (engl. *nitric oxide*)

NOS – azot monoksid sintaza (engl. *nitric oxide synthases*)

NAFL – nealkoholna masna jetra (engl. *nonalcoholic fatty liver*)

NASH CRN – engl. *NASH clinical research network*

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*)

NAPE – N-arahidonoil-fosfatidil-etanolamid

NASH – nealkoholni steatohepatitis (engl. *nonalcoholic steatohepatitis*)

NF- κ B – nukleusni faktor kapa B

NIDDK – engl. *national institute of diabetes, digestive and kidney diseases*

NS – nitrozativni stres

ONOO⁻ – peroksinitriti

OS – oksidativni stres

PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena -1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*)

PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. *platelet derived growth factor*)

PECAM-1 – engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

PI-3K – fosfatidil-inozitol-3 kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PMN – polimorfonuklearni leukociti

PKA – protein kinaza A

PKC – protein kinaza C

PPAR – engl. peroxisome proliferator activated receptor

PNPLA3 – engl. *patatin-like phospholipase domain-containing 3*

PPREs – engl. peroxisome proliferator response elements

RES – retikuloendotelni system

RIO – engl. *rimonabant in obesity*

RNS – engl. *reactive nitrogen species*

ROO[•] – peroksi radikal

ROS – engl. *reactive oxygen species*

RXR – receptor za retinoid X (engl. *retinoid x receptor*)

SAD – Sjedinjene američke države

SCD1 – stearoil-CoA desaturaza 1

SIRT6 – engl. *silent information regulator-2 family*

SMK – slobodne masne kiseline

SNP – engl. *single nucleotide polymorphism*

SOCS – supresori citokinske signalizacije (engl. *suppressor of cytokine signalling*)

SREBP – protein koji vezuje sterol-regulacijski element
(engl. *sterol regulatory element-binding protein*)

SOD – superoksid dismutaza

SZO – Svetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organisation*)

TBHBA – 2,4,6-tribromo-3-hidroksi benzoične kiseline

TG – trigliceridi

TGF- β – transformišući faktor rasta- β (engl. *transforming growth factor- β*)

THC – tetra-hidro-kanabinol

TLR-4 – engl. *toll-like receptor-4*

TRAIL-Rs – engl. *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptors*

TSH – tireostimulišući hormon

TM6SF2 – engl. *transmembrane 6-superfamily member 2*

TNF- α – faktor tumorske nekroze- α (engl. *tumor necrosis factor- α*)

TNF-R1 – engl. *tumor necrosis factor receptor 1*

TXA₂ – tromboksan A₂

UH – ukupni holesterol

VLDL – lipoprotein veoma male gustine (engl. *very low density lipoprotein*)

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Bojan Jorgačević, rođen je 27.05.1986. godine u Beogradu. Završio je Medicinsku školu na Zvezdari (opšti smer) sa odličnim uspehom i školske 2005/2006. godine upisao Medicinski fakultet u Beogradu.

U junu 2011. godine dr Bojan Jorgačević je diplomirao u roku kao jedan od najboljih studenata, sa prosečnom ocenom 9.96. Za svoj uspeh tokom studija bio je kontinuirano pohvaljivan. Kao student, bio je stipendista Zadružbine Nikole Spasića. Takođe, bio je stipendista Grada Beograda u periodu od 2008. do 2011. godine. Od juna do decembra 2011. godine, pripravnički staž obavio je u Domu zdravlja Grocka i položio stručni ispit, decembra iste godine.

U oktobru 2011. godine upisao je specijalističke akademske studije, smer Eksperimentalna fiziologija i patološka fiziologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu i u roku položio sve ispite predviđene programom. Odbranio je završni specijalistički akademski rad marta 2014. godine, pod nazivom „Patofiziološki aspekt metaboličkog sindroma“.

Od septembra 2012. godine dr Bojan Jorgačević je zaposlen kao saradnik u nastavi, a od 2014. godine kao asistent na Medicinskom fakultetu u Beogradu za užu naučnu oblast Patološka fiziologija. Školske 2012/2013. godine upisao je doktorske studije, smer Fiziološke nauke.

Od januara 2014. godine je istraživač na projektu „Uloga neuroendokrino-inflamatorne osovine u patogenezi nealkoholne masne bolesti jetre“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a kojim rukovodi prof. dr Tatjana Radosavljević.

Do sada je dr Bojan Jorgačević objavio 18 publikacija, od čega 9 radova je objavljeno u časopisima indeksiranim sa JCR liste, 4 objavljena u časopisu Medicinska istraživanja, dok su ostalih 5 Izvodi sa međunarodnih i nacionalnih skupova.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: **Bojan Jorgačević**

broj upisa: FN-01/12

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Uloga kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi nealkoholne masne bolesti jetre izazvane dijetom bogatom mastima kod miševa“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21.12. 2017.godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Bojan Jorgačević**

Broj upisa: FN-01/12

Studijski program: Doktorske akademske studije, Medicina, Fiziološke nauke

Naslov rada: „**Uloga kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi nealkoholne masne bolesti jetre izazvane dijetom bogatom mastima kod miševa**“

Mentor: prof. Dr Danijela Vučević

Potpisani _____



izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21.12. 2017.godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Uloga kanabinoidnih CB1 receptora u patogenezi nealkoholne masne bolesti jetre izazvane dijetom bogatom mastima kod miševa“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21.12. 2017.godine



Research Article

Rimonabant Improves Oxidative/Nitrosative Stress in Mice with Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Bojan Jorgačević,¹ Dušan Mladenović,¹ Milica Ninković,²
Milena Vesković,¹ Vesna Dragutinović,³ Aleksandar Vatazević,⁴ Danijela Vučević,¹
Rada Ješić Vukićević,⁵ and Tatjana Radosavljević¹

¹Institute of Pathophysiology “Ljubodrag Buba Mihailović”, Faculty of Medicine, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

²Institute for Medical Research, Military Medical Academy, 11000 Belgrade, Serbia

³Institute of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

⁴Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

⁵Institute of Digestive Diseases, Clinical Center of Serbia, 11000 Belgrade, Serbia

Correspondence should be addressed to Tatjana Radosavljević; tanjamm@med.bg.ac.rs

Received 18 February 2015; Revised 8 April 2015; Accepted 22 April 2015

Academic Editor: Ersin Fadillioglu

Copyright © 2015 Bojan Jorgačević et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

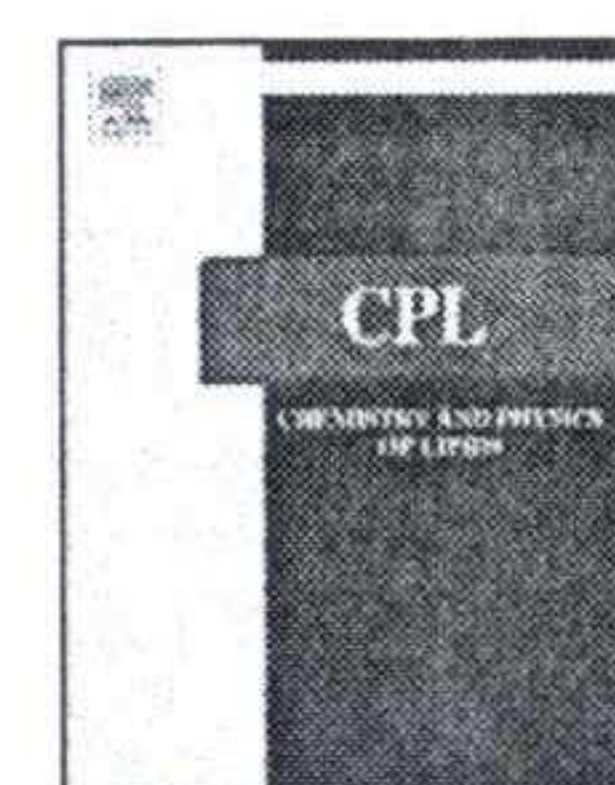
The present study deals with the effects of rimonabant on oxidative/nitrosative stress in high diet- (HFD-) induced experimental nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Male mice C57BL/6 were divided into the following groups: control group fed with control diet for 20 weeks (C; $n = 6$); group fed with HFD for 20 weeks (HF; $n = 6$); group fed with standard diet and treated with rimonabant after 18 weeks (R; $n = 9$); group fed with HFD and treated with rimonabant after 18 weeks (HFR; $n = 10$). Daily dose of rimonabant (10 mg/kg) was administered to HFR and R group by oral gavage for two weeks. Treatment induced a decrease in hepatic malondialdehyde concentration in HFR group compared to HF group ($P < 0.01$). The concentration of nitrites + nitrates in liver was decreased in HFR group compared to HF group ($P < 0.01$). Liver content of reduced glutathione was higher in HFR group compared to HF group ($P < 0.01$). Total liver superoxide dismutase activity in HFR group was decreased in comparison with HF group ($P < 0.01$). It was found that rimonabant may influence hepatic iron, zinc, copper, and manganese status. Our study indicates potential usefulness of cannabinoid receptor type 1 blockade in the treatment of HFD-induced NAFLD.

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) includes a wide spectrum of liver diseases ranging from simple steatosis to steatohepatitis, which can progress to fibrosis, cirrhosis, and, ultimately, hepatocellular carcinoma [1]. NAFLD, as a hepatic manifestation of metabolic syndrome, is associated with dyslipidemia, obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus [1, 2]. Although pathogenesis of NAFLD is still incompletely understood, two key mechanisms have been identified. Firstly, insulin resistance in the adipose tissue increases lipolysis and the hepatic entry of free fatty acids, as well as *de novo* synthesis of fatty acids and triglycerides. Secondly, oxidative/nitrosative stress, mitochondrial

dysfunction, lipotoxicity, and overproduction of proinflammatory cytokines have been involved in progression of liver steatosis to steatohepatitis and fibrosis [3, 4].

Excessive oxidants (free oxygen and nitrogen radicals, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), etc.) and decreased antioxidant defense have been observed in NAFLD patients [2, 5, 6]. Thus, the main sources of ROS are hepatic microsomal fatty acid oxidizing enzyme cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), cyclooxygenase and lipoxygenase cell signal transduction pathways, mitochondrial dysfunction, and hepatic iron overload [4, 7]. Moreover, activation of Kupffer cells and other inflammatory cells also generates ROS through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase [8].



The effect of cannabinoid receptor 1 blockade on hepatic free fatty acid profile in mice with nonalcoholic fatty liver disease



Bojan Jorgačević^a, Danijela Vučević^a, Ivana Đuričić^b, Slađana Šobajić^b,
Dušan Mladenović^a, Milena Vesković^a, Rada Ješić Vukićević^c, Tatjana Radosavljević^{a,*}

^a Institute of Pathophysiology "Ljubodrag Buba Mihailović", Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

^b Department for Bromatology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia

^c Institute of Digestive Diseases, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2017
Received in revised form 6 March 2017
Accepted 14 March 2017
Available online 29 March 2017

Keywords:

NAFLD
Endocannabinoid system
Rimonabant
CB1 receptor blockade
Free fatty acid profile
Mice

ABSTRACT

We used rimonabant to investigate the role of CB1 receptor on hepatic FFAs profile during NAFLD. Male mice C57BL/6 were divided into: control group fed with control diet 20 weeks (C; n = 6); group fed with HFD 20 weeks (HF; n = 6); group fed with control diet and treated with rimonabant after 18 weeks (R; n = 9); group fed with HFD and treated with rimonabant after 18 weeks (HFR; n = 10). Rimonabant (10 mg/kg) was administered daily to HFR and R group by oral gavage. Rimonabant decreased liver palmitic acid proportion in HFR group compared to HF group ($p < 0.05$). Liver stearic and oleic acid proportions were decreased in R group compared to control ($p < 0.01$ respectively). Rimonabant increased liver linoleic and arachidonic acid proportions in HFR group compared to HF group ($p < 0.01$ respectively). CB1 blockade may be useful in the treatment of HFD-induced NAFLD due to modulation of plasma lipid and hepatic FFA profile.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) includes wide spectrum of liver diseases ranging from steatosis (triglyceride/TG/accumulation within hepatocytes) to steatohepatitis, associated with hepatocellular injury and activation of fibrogenic pathways (fibrosis and cirrhosis), that may progress to hepatocellular carcinoma (Mallat et al., 2013; Pardo et al., 2015; Friedman, 2016). Although, pathogenesis of NAFLD is still incompletely understood, two hit mechanisms have been identified. Firstly, insulin resistance (IR) in the adipose tissue increases lipolysis and the hepatic entry of free fatty acids (FFAs), as well as *de novo* synthesis of fatty acids and TG. Secondly, oxidative/nitrosative stress, mitochondrial dysfunction, lipotoxicity and overproduction of proinflammatory cytokines have been involved in progression of liver steatosis to steatohepatitis and fibrosis (Fraulob et al., 2010; Aubert et al., 2011; Leamy et al., 2013; Stanković et al., 2014; Jorgačević et al., 2015). However, this "two hit hypothesis" is increasingly replaced by the concept that benign steatosis and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) could be two different entities

with divergent pathogenic pictures (Tilg and Moschen, 2010; Fuchs et al., 2014). Thus, "multiple hits" may occur in parallel rather than in strict sequence (Leamy et al., 2013). In this context lipid accumulation may be considered as a "bystander phenomenon" (Fuchs et al., 2014): Constant exposure of hepatocytes to FFAs, phosphatidic acid, lysophosphatidic acid, ceramides and diacylglycerols (DAG) may result in lipotoxic insults (Trauner et al., 2010), characterized by endoplasmic reticulum (ER) stress, inflammation, apoptosis and necrosis of hepatocytes (Neuschwander-Tetri, 2010; Fuchs et al., 2014). In addition to potential lipotoxic TG degradation products, cholesterol may also be an important trigger for NAFLD development (Simonen et al., 2011; Enjoji et al., 2012). There are evidence that increased dietary cholesterol uptake does not only act as disease initiator but can also promote its progression beyond the more severe stages (Subramanian et al., 2011; Fuchs et al., 2014). Many studies have demonstrated that saturated fatty acids (SFAs) are more toxic than their unsaturated counterparts, resulting in a progressive lipotoxic cascade, both in experimental models and in NAFLD patients (El-Badry et al., 2007; Puri et al., 2007; Malhi and Gores, 2008; Leamy et al., 2013; Fuchs et al., 2014; Stanković et al., 2014).

The cannabinoid system (CS) refers to the cannabinoids, cannabinoid receptors (cannabinoid receptor type 1/CB1 and type 2/CB2) and enzymes involved in endocannabinoids (ECs)

* Corresponding author at: Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Dr Subotića 9, 11000 Belgrade, Serbia.
E-mail address: tanjamm@med.bg.ac.rs (T. Radosavljević).