

UNIVERZITET U PRIŠTINI
MEDICINSKI FAKULTET

Doktorska disertacija

**Dejstvo surutke i tikvinog ulja (*Cucurbita pepo L.*) na
oštećenja jetre pacova indukovanih alkoholom**

Kandidat: Mr sci dr Ivan Radić

Mentor: Prof. dr Snežana Janićijević-Hudomal

1. UVOD

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Alkohol i alkoholizam

2.1.1. Biološke osnove i metabolizam alkohola

2.1.2. Akutna i hronična zloupotreba alkohola

2.2. Alkoholna bolest jetre

2.2.1. Faktori rizika u nastanku alkoholne bolesti jetre

2.2.2. Oksidativni stres i alkoholna bolest jetre

2.2.2.1. Oksidativni stres

2.2.2.2. Slobodni radikali

2.2.2.3. Prooksidantni enzim (Ksantin-oksidaza)

2.2.2.4. Lipidna peroksidacija

2.2.2.5. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi alkoholne bolesti jetre

2.2.2.6. Nuklearni faktor κ B(NF κ B)

2.2.2.7. P53

2.2.3. Histopatologija alkoholne bolesti jetre

2.2.3.1. Steatoza

2.2.3.2. Steatohepatitis

2.2.3.3. Steatofibroza

2.2.4. Biohemijski pokazatelji oštećenja jetre

2.2.4.1. Ast i Alt

2.2.4.2. Alkalna fosfataza

2.2.4.4. Bilirubin

2.2.5. Antioksidativna zaštita

2.2.5.1. Superoksid - dismutaza

2.2.5.2. Katalaza

2.2.5.3. Glutation peroksidaza

2.2.5.4. Glutation-S-transferaza

2.2.5.5. Glutation-reduktaza

2.2.6. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

2.2.6.1. Glutation

2.3. Surutka

2.3.1. Laktoferin

2.3.2. Beta-laktoglobulin (β laktoglobulin)

2.3.3. Alfa-laktalbumin (α laktalbumin)

2.3.4. Laktoperoksidaza

2.3.5. Imunoglobulini

2.3.6. Glukomakropeptid

2.4. TIKVINO ULJE (Cucurbita pepo L.)

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Uticaj etanola kod izloženih životinja

3.2. Uticaj surutke kod nealkoholisanih i alkoholisanih životinja:

3.3. Uticaj tikvinog ulja (Cucurbita pepo L.) kod nealkoholisanih i alkoholisanih životinja:

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ogledne životinje

4.2. Plan rada

4.3. Ogledne grupe životinja

- 4.4. Supstance primenjene u toku oglada
- 4.5. Način uzimanja uzoraka
- 4.6. Histopatologija uzoraka
- 4.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzimska tkiva jetre
 - 4.7.1. Priprema homogenata jetre za analizu
 - 4.7.2. Određivanje koncentracije proteina
 - 4.7.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)
 - 4.7.4. Određivanje aktivnosti MnSOD i CuZnSOD
 - 4.7.5. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)
 - 4.7.6. Određivanje aktivnosti glutathion-peroksidaze (GSH-Px)
 - 4.7.7. Određivanje aktivnosti glutathion-reduktaze (GR)
 - 4.7.8. Određivanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD)
 - 4.7.9. TBARS - indeks lipidne peroksidacije
 - 4.7.10. Određivanje koncentracije ukupnog glutathiona (GSH+GSSG)
- 4.8. Biohemijske analize krvi
 - 4.8.1. Određivanjealanin aminotransferaze (ALT)
 - 4.8.2. Određivanje aspartat aminotransferaza (AST)
 - 4.8.3. Određivanje alkalne fosfataze (ALP)
 - 4.8.4. Određivanje laktat dehidrogenaze (LDH)
 - 4.8.5. Određivanje ukupnog bilirubina
 - 4.8.6. Određivanje triglicerida (TAG)
 - 4.8.7. Određivanje HDL- holesterola
 - 4.8.8. Određivanje ukupnog holesterola
 - 4.8.9. Određivanje LDL- holesterola
 - 4.8.10. Određivanje indeksa ateroskleroze
- 4.9. Western blot analiza
 - 4.9.1. Priprema tkiva jetre za western blot analizu
 - 4.9.1. Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim frakcijama
 - 4.9.2. Separacija proteina metodom SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)
 - 4.9.3. Western blot analiza proteina
- 4.10. Statistička obrada podataka
- 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA**
 - 5.1. Potrošnja hrane i vode, koncentracija etanola u krvi i butnom mišiću i promena telesne mase po nedeljama
 - 5.1.1. Potrošnja hrane
 - 5.1.2. Potrošnja vode
 - 5.1.3. Koncentracija etanola u krvi i butnom mišiću
 - 5.1.4. Promena telesne mase po nedeljama
 - 5.2. Rezultati histopatološke analize jetre
 - 5.2.1. Kontrolna grupa životinja
 - 5.2.2. Životinje tretirane alkoholom
 - 5.2.3. Životinje tretirane surutkom
 - 5.2.4. Životinje tretirane tikvinim uljem
 - 5.2.5. Životinje tretirane alkoholom i surutkom
 - 5.2.6. Životinje tretirane alkoholom i tikvinim uljem
 - 5.3. Rezultati statističke obrade histopatoloških nalaza
 - 5.3.1. Kongestija
 - 5.3.2. Dilatacija centralne vene
 - 5.3.3. Dilatacija grane vene porte

- 5.3.4. Inflamacija portnih prostora
- 5.3.5. Hiperplazija Kupferovih ćelija
- 5.3.6. Novoformirani žučni duktulusi
- 5.3.7. Masne hepatocitne promene
- 5.3.8. Edem ćelije
- 5.3.9. Fokalna nekroza
- 5.4. Biohemijski pokazatelji
- 5.4.1. Alanin aminotransferaza (ALT)
- 5.4.2. Aspartat aminotransferaza (AST)
- 5.4.3. De Ritisov koeficijent
- 5.4.4. Alkalna fosfataza
- 5.4.5. Ukupni bilirubin
- 5.4.6. Holesterol
- 5.4.7. Indeks ateroskleroze
- 5.4.8. Laktat dehidrogenaza
- 5.4.9. Trigliceridi
- 5.4.10. LDL-holesterol
- 5.4.11. HDL- holesterol
- 5.5. Rezultati izmerenih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite
- 5.5.1. Aktivnost enzima bakar cink superoksid dizmutaze (CuZnSOD)
- 5.5.2. Aktivnost enzima mangan superoksid dizmutaze (MnSOD)
- 5.5.3. Aktivnost enzima katalaze (CAT)
- 5.5.4. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px)
- 5.5.5. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GR)
- 5.5.6. Aktivnost enzima glutation - S- transferaze (GST)
- 5.5.7. Aktivnost enzima Ksantin oksidaze (XOD)
- 5.5.8. Aktivnost ukupnog glutationa (GSH +GSSG)
- 5.5.9. Aktivnost malondialdehida (MDA)
- 5.6. Western blot parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite
- 5.6.1. Western blot enzima bakar-cink superoksid dizmutaze (CuZnSOD)
- 5.6.2. Western blot enzima Mangan superoksid dizmutaze (MnSOD)
- 5.6.3. Western blot enzima katalaze (CAT)
- 5.6.4. Western blot enzima glutation peroksidaze (GSH-Px)
- 5.6.5. Western blot enzima glutation reduktaze (GR)
- 5.6.6. Western blot nuklearnog faktora k B (NFkB)
- 5.6.7. Western blot proteina p53 (p53)

6. DISKUSIJA

- 6.1. Histopatološki nalazi
- 6.2. Biohemijski pokazatelji funkcije jetre
- 6.3. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

7. ZAKLJUČCI

8. LITERATURA

1. UVOD

Alkohol se od davnina koristi radi opuštanja, ali nažalost, zloupotreba alkoholnih pića je godinama stalno u porastu, što značajno utiče na psihosocijalne i bihevioralne aspekte života, kao i na ukupno fizičko zdravlje čoveka, oštećujući značajno različite sistema organa, a naročito jetru.

Dugotrajno uzimanje alkohola neminovno dovodi do Alkoholne bolesti jetre, ali najvažniju ulogu u nastanku bolesti ima zapravo njegov dnevni unos i vremenski period konzumiranja. Genetska predispozicija, imunološka hiperreaktivnost, primarni i sekundarni deficit hranljivih materija, stimulacija razvoja fibroznog tkiva kao i uticaj alkohola na regenerativne procese, takođe utiču na razvoj ove bolesti.

Lečenje alkoholne bolesti jetre najbolje se, naročito u početnim fazama, sprovodi upravo apstinencijom, zbog velike regenerativne sposobnosti jetrinog tkiva. Trajna apstinencija dovodi po potpunog izlečenja reverzibilnih formi alkoholne bolesti jetre, međutim hronično konzumiranje alkohola dovodi do razvoja bolesti zavisnosti i tada apstinencija predstavlja veoma zahtevan terapijski postupak. Često se u terapiji alkoholne bolesti jetre koriste hepatoprotektivne supstance kako bi se sprečilo napredovanje bolesti ili pak restituisale funkcije jetre i vratilo njeno stanje u pređašno.

Na tržištu lekova veoma je mali broj definisanih hepatoprotektiva, poput silymarina, dok brojne hepatoprotektivne supstance koje se tradicionalno vekovima koriste u ishrani mnogih naroda, često nemaju jasno ispitano terapijsko dejstvo, niti definisanu dozu i način primene. Kako je sve manje novih lekova, a biološka terapija i similari postaju sastavni deo savremenog lečenja, potraga za potencijalno novim molekulima iz prirodnih supstrata prilično je zastupljena, jer se njihovi uticaji mogu pratiti na molekularnom nivou. Tikvino ulje i surutka zastupljeni su i u ishrani i suplementaciji, a naročito proteini surutke koji su postali najpopularniji i često predozirani dodatak ishrani osoba koje u teretanama vežbaju zarad preoblikovanja tela.

Ideja ovog istraživanja bila je da se utvrdi protektivni uticaj surutke i tikvinog ulja na alkoholom indukovano oštećenje jetre i eventualno definišu potencijalni mehanizmi njihovog delovanja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Alkohol i alkoholizam

Alkohol je najomiljenija i skoro sigurno najstarija i najmasovnije upotrebljavana droga biljnog porekla (pored duvana). Reč alkohol je arapskog porekla i znači: "veoma fin". Prvi kontakt ljudi sa alkoholom je verovatno bio slučajan. U praistorijsko doba, prema jednoj od brojnih hipoteza, čovek je probao gnjilo voće i osetio prijatne efekte opuštanja i popravljanja raspoloženja. Potom je počeo da ostavlja namerno zrelo voće u posude da gnjili (fermentiše), da bi posle određenog vremena dobio željeni napitak, čime je i započela proizvodnja alkoholnih pića. Danas se pod terminom alkohol podrazumevaju brojni napici u kojima je dominantna supstanca etanol.

Iako u organizmu normalno nema alkohola, neznatna koncentracija alkohola se može dokazati u krvi (alkoholemija) posle upotrebe hrane bogate ugljenim hidratima, tzv. metabolički ili prirodni alkohol (0,10% – 0,30%). Dejstvo alkohola je opojno čak i kada se uzme u malim količinama jer remeti psihičke funkcije (koncentraciju, pažnju i rasuđivanje), pa time menja i ponašanje osobe koja ga pije.

U svetu je, danas, opšte prihvaćeno medicinsko shvatanje alkoholizma. Više od jednog veka teorijski i praktični radovi, u svetu i kod nas, su tvrdjenje T. Trotera-a "Alkoholizam je bolest", ali danas ipak nema opšte prihvaćene definicije alkoholizma. Nedostatak jasne definicije, tačnog objašnjenja i sadržaja pojma, otežava praktični rad lekara, dijagnostiku alkoholizma, naročito u početnim fazama alkoholne bolesti (Nikolić, 2007).

Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je potvrdila da je alkoholizam bolest, socijalni i medicinski problem, i definiše ga kao ekscesivno uzimanje alkohola u tom stepenu da konzumentima uništava zdravlje, remeti međuljudske odnose i psihički mir, dovodeći do psihičke i fizičke zavisnosti (Bukelić, 2004). SZO uvodi termin "zavisnost alkoholnog tipa" umesto termina "alkoholizam". Prema toj definiciji, zavisnost od droge alkoholnog tipa podrazumeva: konzumiranje alkoholnih pića

preko granica koje su kulturološki prihvaćene, kada osoba pije alkohol u neprimereno vreme i kada ugrožava svoje zdravlje i socijalno funkcionisanje (Dimitrijević, 2004).

Alkoholizam tzv. "treća bolest" dolazi po broju obolelih odmah iza bolesti srca i krvnih sudova, koje se nalaze na prvom mestu, i zloćudnih tumora koji se nalaze na drugom mestu. To je biopsihosocijalna bolest, bolest koja postepeno i sigurno ugrožava telesno, duševno i socijalno zdravlje osobe koja prekomerno pije. Alkohol remeti skladno funkcionisanje svih naših organa sa centralnim i vegetativnim nervnom sistemu (Nikolić, 2007).

2.1.1. Biološke osnove i metabolizam alkohola

Etanol je mali hidrosolubilni molekul koji se brzo i kompletno resorbuje iz digestivnog trakta procesom proste difuzije. Celokupna uneta količina resorbuje se za jedan čas. Oko 90-98% od unesene količine etanola oksidiše se u hepatocitima jetre (Choudhry i sar., 2008; Kawakami i sar., 1989; Brown i sar., 2006).

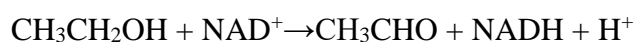
Etanol je značajan izvor energije, 7,1 kcal (29,7 kj) po gramu, vrednost koja prevazilazi sadržaj energije u ugljenim hidratima i proteinima. U proseku, etanol zauzima polovinu kalorija koju alkoholičari unose, zamenjuje normalne nutritijente i dovodi do malnutricije, kao i deficijencije folata, tiamina i drugih vitamina. Sekundarna malnutricija se takođe javlja zbog malapsorpcije kao posledica gastrointestinalnih komplikacija, kao što su insuficijencija pankreasa i smanjen hepatski metabolizam hranljivih materija. Dodatno, alkohol utiče na degradaciju hranljivih materija, kao na primer vitamina A (Lieber, 1992).

Etanol, je dobro poznat hepatotoksin. Različiti mehanizmi su uključeni u hepatotoksičnost, uključujući direktno oštećenje ili oštećenja prouzrokovana: etanolom ili njegovim metabolitima, acetaldehidom, oksidativnim stresom, otpuštanjem endotoksina iz gastrointestinalnog trakta, indukcijom imunog odgovora i oslobađanjem različitih citokina i proinflamatornih medijatora iz infiltrišućih leukocita (Dandona i sar., 2007; Thiele i sar., 2004; Albano i sar., 2006; Dey i sar.,

2006; Das i sar., 2007; Tang i sar., 2008). Etanol takođe, može da indukuje hipoksiju hepatocita tokom povećane konzumacije kiseonika u metabolizmu etanola (Li i sar., 2006).

Do sada su opisana tri metabolička puta etanola u ljudskom telu, koji uključuju sledeće enzime: alkoholna dehidrogenaza, mikrozomalni etanolni oksidativni sistem (MEOS) i katalaza. Svaki od ovih puteva može da dovede do produkcije slobodnih radikala, koji utiču na antioksidantni sistem. Klasičan put metabolizma etanola, koji katališe alkoholna dehidrogenaza, pri čemu se formira acetaldehid, dovodi do stvaranja slobodnih radikala (Cederbaum i sar., 1991; Das i sar., 2005; Kukielka i sar., 1994; Mantle i sar., 1999).

Kada se konzumira u umerenim količinama najveći deo etanola se metaboliše alkoholnom dehidrogenazom (ADH) u jetri, koja pretvara alkohol u toksičnu supstancu, acetaldehid.



U ovoj reakciji se vodonikov jon prenosi iz etanola u NAD^+ (nikotin-amid-adenin-dinukleotid) (Cunningham, 2001). Alkoholna dehidrogenaza eliminiše otprilike jedno piće (13 g alkohola) za sat vremena. Limitirajući faktor ovog puta oksidacije nije sama alkoholna dehidrogenaza, već raspoloživost kofaktora NAD na koji se prenosi vodonik iz alkohola. Stvoreni acetaldehid se skoro u potpunosti (preko 90%) oksidiše u jetri pod dejstvom enzima aldehidne dehidrogenaze.

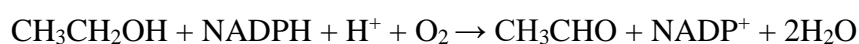


Produkt ove reakcije je acetat, koji se zatim preko ciklusa trikarboksilne kiseline oksidiše do ugljen-dioksida i vode. Kod prekomernog unosa alkohola dolazi do porasta njegove koncentracije u krvi pa je ovaj metabolički put značajan.

Mitohondrijalna forma aldehid dehidrogenaze igra ključnu ulogu u održavanju niske koncentracije acetaldhida. Acetat se onda aktivira preko acetil CoA sintetaze u acetil CoA (Cunningham, 2001). Kao rezultat oksidacije etanola alkoholnom dehidrogenazom i sledstvenom oksidacijom acetaldhida dolazi do značajnog povećanja hepatičkog NADH/NAD^+ odnosa. Ova promena se javlja i u citoplazmi i u mitohondrijama. Mitohondrijalna niska K_m aldehidna dehidrogenaza generiše najveći

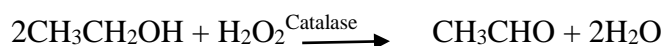
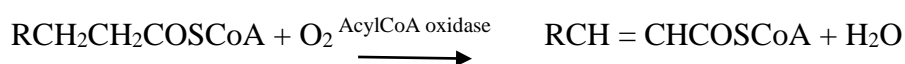
deo NADH u mitohondrijama. Redukujući ekvivalenti citoplazmatičke NADH se transportuju u mitohondrije primarno preko malat-aspartatnog šatl sistema. Ovaj povećani NADH se reoksiduje preko mitohondrijalnog elektronskog transportnog sistema, ako je tkivo aerobno. Oksidacija etanola povećava dostupnost NADH u mitohondrijama (Cunningham, 2001).

Mikrozomalni elektronski transportni sistem takođe učestvuje u oksidaciji etanola preko izoenzima citohroma P450 (Liber i sar., 1970). Enzimi ove familije uključuju 2E1, 1A2 i 3A4 izoforme (Salmela i sar., 1998). Ove izoforme variraju svojim kapacitetom za oksidaciju etanola. Oni katalizuju sledeću reakciju:



Citohrom P450 2E1 izoforma indukuje se hroničnim unosom alkohola, stoga ovaj mehanizam kvantitativno postaje važniji kod osoba koje konzumiraju alkohol. Pored ove reakcije u mitohondrijama, 2E1 izoenzim može biti značajan katalizator za stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kod alkoholičara, jer je pokazano da generiše stvaranje veće količine vodonik-peroksida (H_2O_2) (Nordsblom i Coon, 1997). Povećanje slobodnih radikala u jetri osoba koje konzumiraju alkohol je takođe povezano sa povećanim stvaranjem hidroksil radikala (Klein i sar., 1983).

Peroksizmalna aktivnost takođe doprinosi oksidaciji etanola u jetri, što se vidi iz sledećih reakcija:



Ovaj mehanizam je zastupljeniji kod osoba koje konzumiraju alkohol u velikim količinama, gde dolazi do akumulacije masnih kiselina u jetri, zbog povećane peroksizmalne oksidacije masnih kiselina (Rubin i sar., 1972).

2.1.2. Akutna i hronična zloupotreba alkohola

Štetni efekti akutne intoksikacije alkoholom kao i hronične zloupotrebe alkohola znatno prevazilaze navodne korisne efekte. Hronična upotreba alkohola je kod ljudi povezana sa različitim bolestima, kao što su bolesti jetre (steatoza, steatohepatitis, fibroza, hepatocelularni karcinom) (O'Shea i sar., 2009; Schütte i sar., 2009; Sheitz i Stickel, 2009), pankreasa (pankreatitis i rak) (Apte i sar., 2009), bolesti gastrointestinalnog trakta (povećanje permeabilnosti u crevima, endotoksemija, i rak) (Benedetti i sar., 2009), respiratornog trakta (bolesti disajnih puteva, akutni respiratorni distress sindrom, i infekcije pluća (Boé i sar., 2009), mišića (alkoholna miopatija) (Fernandez-Solà i sar., 2007), i imunog sistema (Szabo i Mndrekar, 2007). Obrazac i trajanje upotrebe alkohola, u asocijaciji sa drugim kofaktorima, kao što su genetska predispozicija, pol, ishrana, i uslovi životne sredine, determinišu individualnu sklonost za razvoj bolesti povezanih sa alkoholom (Testino, 2008; Pelucchi i sar., 2008)

2.2. Alkoholna bolest jetre

Jetra je najveći organ u ljudskom telu težine 1-1,5 kg i predstavlja 1,5-2,5 % telesne mase (Al-Jumaily i Khaleel, 2012). Klasičnu histološku i funkcionalnu jedinicu jetre čine jetrin lobulus. Histološku građu jetre predstavljaju hepatociti sa 78%, 6,3% druge ćelije smeštene u sinusoidima (2,8% endotelne ćelije, 2,1% Kupferove ćelije i 1,4 % zvezdaste ćelije - Ito ćelije), dok 16% čini ekstracelularni prostor (Popović i sar., 1996). Na mikroskopskom nivou, osnovna funkcionalna jedinica jetre je acinus, koji je definisan prostorom, koji krvlju snabdevaju terminalne grane hepatičke arterije i portne vene (Giannini, 2005).

Jetra je kompleksan organ, koji ima centralnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti. Zajedno sa slezinom, jetra je uključena u destrukciju ostarelih eritrocita i u ponovno korišćenje eritrocitnih konstituenata. Važna uloga jetre, jeste i u sintezi i sekreciji žuči, u sintezi lipoproteina i proteina u plazmi, uključujući

faktore koagulacije (Burkitt i sar., 1993). Jetra učestvuje u održavanju stabilnog nivoa glukoze u serumu, tako što preuzima i deponuje glukozu procesom glikogeneze, pri čemu nastaje glikogen, a kada je potrebno osloboditi glukozu u krv, glikogenolizom obezbeđuje potrebne količine molekula. Pored glikogenolize, glukozu može da sintetiše iz neugljenohidratnih izvora, kao što su aminokiseline, procesom glukoneogeneze. Mnoge od ovih biosintetskih funkcija koriste produkte varenja. Sa izuzetkom mnogih lipida, produkti varenja prolaze direktno iz gastrointestinalnog trakta do jetre preko krvotoka vene porte (Giannini, 2005). Jedna od njenih veoma bitnih funkcija je detoksikacija toksičnih supstanci i sinteza neophodnih biomolekula. Jetra je mesto gde se otpadni proizvodi metabolizma detoksikuju kroz procese kao što je deaminacija amino kiselina, tokom kojeg se stvara urea. Iz ovih razloga, oštećenje jetre dovodi do teških posledica (Baskaran i sar., 2010).

Alkoholna bolest jetre (ABJ) se može definisati kao spektar promena i oštećenja jetre, nastalih kao posledica hroničnog uzimanja alkohola. Patološke promenemogu biti od banalnih i reverzibilne steatoze do teške i ireverzibilne ciroze (Celli i Zhang, 2014).

Postoji jaka veza između konzumacije alkohola u populaciji sa mortalitetom uzrokovanim oštećenjima jetre. Alkohol predstavlja glavni uzrok bolesti jetre širom sveta. U 2010. god. skoro 50 % svetske populacije je u nekoj formi konzumiralo alkohol. Tokom te godine, više od milion smrtnih slučajeva širom sveta dovedeno je u vezu sa cirozom jetre, a 47.9% od tog broja je bilo uzrokovano hroničnom upotrebom alkohola (Rehm i sar., 2013).

Masna jetra se razvija kod 90% osoba koji piju više od 60g alkohola po danu (Crabb, 1999), ali se može javiti i kod osoba koji piju manje od ove količine (Lieber i sar. 1965). Jednostavna nekomplikovana masna jetra je obično asimptomatska i može biti potpuno reverzibilna nakon apstinencije od 4-6 nedelja (Mandenhall, 1968). Progresija do fibroze i ciroze se javlja od 5 do 15 % pacijenata uprkos apstinenciji (Leevy, 1962; Sorensen i sar., 1984). Perivenularna fibroza se javlja kod 40-60 % pacijenata koji uzimaju više od 40-80 g alkohola po danu u vremenskom periodu od 25 godina. Perivenularna skleroza je značajan i nezavisan faktor rizika za progresiju alkoholnog oštećenja jetre u fibrozu ili cirozu (Worner, 1985; Nakano i sar. 1982). Krajnji stadijum ABJ kulminira razvojem ciroze, koja je obično mikronodularna, ali

ponekad može biti mešovita, odnosno mikronodularna sa makronodularnom (MacSween i Scott, 1973).

Određeni procenat osoba sa ABJ razvija težak alkoholni hepatitis koji ima goru prognozu (Orrego i sar., 1987). Alkoholni hepatitis predstavlja spektar bolesti od lakšeg do teških oštećenja (Lancet, 1981). Prisutan je kod 10-35 % osoba koje konzumiraju alkohol (Christoffersen i Nielsen 1972; Mendenhall 1981; Trabut i sar., 2008). Apstinencija u ograničenim vremenskim periodima ne garantuje kompletan oporavak. Samo 27 % osoba koje su u apstinenciji ima histološko poboljšanje, dok 18 % progredira do ciroze, a ostali imaju perzistentni alkoholni hepatitis (Galambos, 1972).

2.2.1. Faktori rizika u nastanku alkoholne bolesti jetre

Identifikovani su mnogi faktori rizika koji utiču na razvoj i progresiju alkoholne bolesti jetre. Neki od tih faktora, koji imaju uticaj na razvoj oštećenja jetre su: doza, dužina upotrebe alkohola, vrsta alkoholnog pića, obrasci pijenja, pol, etnička pripadnost, kao i neki drugi faktori rizika kao što su gojaznost, preopterećenje gvožđem, infekcije kao što je virusni hepatitis i genetska predispozicija.

Količina unetog alkohola (nezavisno od vrste i načina na koji se konzumira) je najvažniji faktor rizika za razvoj alkoholne bolesti jetre (Savolainen i sar., 1993). Odnos između količine unetog alkohola i razvoja bolesti jetre nije potpuno linearan (Becker i sar., 1996; Kamper-Jorgensen i sar., 2004). Rizik od razvoja ciroze postoji kod konzumacije više od 60-80g dnevno alkohola u toku deset godina ili duže, kod muškaraca ili više od 20 g dnevno za isti period kod žena (Mandayam i sar., 2004; Bellentani i sar., 1997).

Vrsta alkohola koja se konzumira može imati uticaj na razvoj bolesti jetre. Neka istraživanja su pokazala da je konzumacija piva češće dovođena u vezu sa bolešću jetre u odnosu na konzumaciju vina (Becker i sar., 2002). Sledeći faktor od značaja (za nastanak ABJ) jeste obrazac pijenja. Uzimanje alkohola van obroka povećava rizik za ABJ u odnosu na osobe koje konzumiraju alkohol samo u toku obroka (Lu i sar., 2004).

Pol ima značajan uticaj na to da li će i koliko brzo doći do oštećenja jetre. Žene su dva puta osetljivije na dejstvo alkohola i mogu da razviju teži oblik ABJ konzumirajući manje doze u kraćem vremenskom periodu nego muškarci (Nakano i sar., 1982). Ovo se može objasniti razlikama relativne količine gastrične dehidrogenaze između muškaraca i žena kao i većom količinom masnog tkiva kod žena i promenom u apsorpciji alkohola povezanom sa menstrualnim ciklusom.

Veći rizik za oštećenje jetre može biti povezan i sa *rasnom i etničkom pripadnošću* (Stewart, 2002). Procenat alkoholne ciroze je veći kod afroamerikanaca i muškaraca hispano porekla u poređenju sa kavkaskim tipom muškaraca, pri čemu je mortalitet najveći kod muškaraca hispano porekla (Stinson i sar., 2001). Nema dokaza da su ove razlike povezane sa količinama konzumiranog alkohola (Wickramasinghe i sar., 1995).

Malnutricija povećava rizik za razvoj ABJ. Mortalitet kod teške malnutricije može da dostigne i 80% (Mendenhall i sar 1995). Ishrana bogata polinezasićenim mastima promovise alkoholom izazvanu bolest jetre kod životinja (Mezey, 1998), dok ishrana bogata zasićenim mastima može da ima protektivnu ulogu. Pokazano je da je gojaznost faktor rizika za razvoj alkoholne bolesti jetre (Iturriaga i sar., 1988; Naveau i sar., 1997).

Faktori nasleđa mogu da imaju predisponirajuću ulogu i u alkoholizmu i u alkoholnoj bolesti jetre (Uhl i sar., 2001; Brown, 1992; Day i Basendine, 1992). Deca alkoholičara koja rastu kao usvojena imaju značajno veći rizik za alkoholnu zavisnost nego usvojena deca nealkoholičara (18% prema 5 %) (Goodwin i sar., 1973).

Postoji jasna sinergistička veza između *hroničnog virusnog hepatitisa* i alkohola koja dovodi do težeg oštećenja jetre. Alkoholičari sa hepatitisom C razvijaju mnogo teže oštećenje jetre od alkoholičara koji nisu inficirani ovim virusom (Degos, 1999; Monto i sar., 2004).

2.2.2. Oksidativni stres i alkoholna bolest jetre

2.2.2.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres je normalan fenomen u telu. U normalnim okolnostima, fiziološki važni intracelularni nivoi slobodnih radikala se održavaju na niskim

vrednostima raznim enzimskim sistemima koji učestvuju u homeostazi. Zbog toga se oksidativni stres može definisati kao disbalans između prooksidanasa i antioksidanasa u telu.

Više endogenih ćelija, kao i ćelijske komponente učestvuju u inicijaciji i propagaciji slobodnih radikala (Misra i Fridovich, 1972; Reed, 1995; Yu, 1994; Stoian i sar., 1996; Younes, 1999). Svi ti faktori igraju ključnu ulogu u održavanju ćelijske homeostaze. Stresori deluju tako što pokreću neki od ovih mehanizama. Oksidativni stres se dešava kada homeostatski procesi oslabe, a stvaranje slobodnih radikala prevazilazi odbrambene kapacitete u organizmu, dovodeći do oštećenja ćelije i tkiva (Reed, 1995; Younes, 1999; Marks i sar. 1996).

2.2.2.2. Slobodni radikali

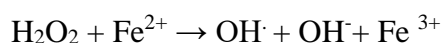
Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju nesparene elektrone, obično su nestabilni i visoko reaktivni (Finkel i Holbrook, 2000). Gubitak ili dodavanje jednog elektrona prevodi atom ili molekul u nestabilno i mnogo reaktivnije stanje (Simić, 2010).

Najčešće se govori o kiseoničnim slobodnim radikalima KSR u koje spadaju: superoksid anjon, vodonik peroksid i hidroksil radikal. KSR ekstrahuju elektron iz drugih jedinjenja da bi kompletirali sopstvene orbitale, započinjući lančane reakcije. Dva nesparena elektrona kiseonika imaju paralelne spinove pa ostaju u odvojenim orbitalama, što favorizuje parcijalnu redukciju kiseonika sa po jednim elektronom u svakom koraku. Dodavanjem jednog (-prvog-) elektrona molekulskom kiseoniku, stvara se prvi kiseonični slobodni radikal superoksid anjon. Superoksid anjon (O_2^-) se u ćeliji stvara na nekoliko načina. Najčešće nastaje slučajno, kada npr. sa komponenti respiratornog lanca u mitohondrijama "iscuri" mala količina elektrona direktno na kiseonik ili u direktnim reakcijama nekih jedinjenja sa kiseonikom katalisanim oksidazama, peroksidazama i oksigenazama u mitohondrijama, peroksizomima i endoplazmatskom retikulumu. Pored toga, superoksid anjon se u većoj meri oslobađa u aktiviranim fagocitima (neutrofilima, eozinofilima, makrofagima i monocitima).

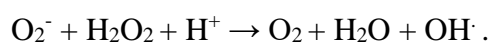
Superoksid radikal se, u prisustvu enzima superoksid dizmutaze (SOD) redukuje u vodonik peroksid. Vodonik peroksid je poluredukovani oblik kiseonika, ne poseduje nesparen elektron, pa ustvari i nije pravi slobodni radikal. Međutim, on se

ubraja u KSR i reaktivno je intermedijerno kiseonično jedinjenje, jer se lako prevodi u hidroksil radikal, OH·. Vodonik peroksid može difundovati kroz membrane, a njegov poluživot je mnogo duži nego poluživot superoksid anjona. U ćeliji se stvaraju male količine vodonik peroksida i u reakcijama oksidacije nekih metabolita sa flavoproteinskim oksidazama koje koriste molekularni kiseonik.

Dalja sudbina vodonik peroksida u ćeliji je različita. Može biti metabolisan sa jednim od dva antioksidantna enzima, glutation peroksidazom (GSH-Px) ili katalazom u molekule vode. Međutim, u prisustvu jona prelaznih metala kao donora elektrona, najčešće Fe²⁺ i Cu²⁺, vodonik peroksid se u tzv. Fentonovoj reakciji redukuje u hidroksilni radikal, OH·



Hidroksilni radikal se stvara i u tzv. Haber- Weiss-ovoj reakciji, u kojoj H₂O₂ reaguje sa superoksid radikalom

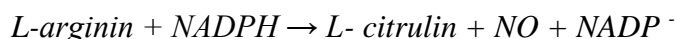


Hidroksilni radikal je zastrašujuće reaktivan i veoma toksičan. On bez ikakve diskriminacije reaguje sa bilo kojim molekulom u svojoj blizini i oštećuje biološki važne makromolekule DNK, proteina, ugljenih hidrata i lipida (Simić, 2010).

Slobodni radikali mogu biti i regulatorni molekuli u biohemijskim procesima. Limfociti i fibroblasti, npr. neprestano stvaraju male količine superoksidnog radikala, koji je regulator rasta. I druge nefagocitne ćelije (endotelne, glatke mišićne ćelije) mogu biti stimulisane da oslobađaju superoksid radikal. Produkcija KSR je značajna za ćeliju, jer oni mogu biti i unutarćelijski sekundarni glasnici. Interleukin 1 (IL-1) i faktor tumorske nekroze (TNF) npr., deluju preko membranskih receptora tako što stimulišu produkciju KSR u ćeliji (Simić, 2010).

Tokom normalnog metabolizma ćelije, osim reaktivnih kiseoničnih vrsta stvaraju se i azotni radikali. Produkcija azot-oksida (NO) može imati dvostruku ulogu, kao protektivnu u manjim koncentracijama, i ulogu u oštećenju tkiva prilikom hiperprodukcije. On ima ulogu važnog medijatora u vaskularnom tonusu i nervnom sprovođenju, ali ima i citotoksičke efekte. Stabilni metaboliti (nitriti i nitrati) su povećani kod alkoholičara (Zima i sar., 2001). NO se sintetiše iz amino kiseline

arginina pri čemu se sintetizira citrulin kao sporedni produkt (Beckman i Crow, 1993). Reakciju katalizuje sintetaza azot oksida (NOS, engl. Nitric oxide synthetase).



Grupu sintetaza azot oksida (NOS) čine citosolni i membranski izoenzimi. Postoje tri forme ovog enzima: neuronalna NOS (NOS1 ili nNOS), inducibilna (NOS2 ili iNOS) i endotelna NOS (NOS3 ili eNOS) (Simić, 2010).

NO brzo reaguje superoksidnim anjonom ($O_2^{\cdot-}$) što dovodi do nastanka peroksinitrita ($ONOO^{\cdot}$) koji ispoljava različite citotoksične efekte. Peroksinitrit može narušiti nativnu strukturu proteina i može se dekomponovati u toksična jedinjenja nitrata i nitrite.

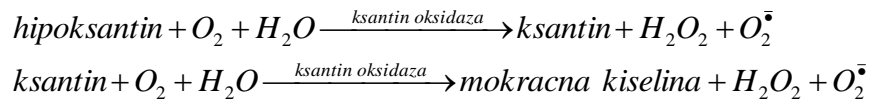
Pored toga, pokazano je da NO deluje kao aktivator ili inhibitor određenih proteina. Ti proteini u sastavu svoje prostetske grupe imaju metale sa promenljivom valencom (gvožđe, bakar, cink). NO, kao slobodni radikal, ispoljava veliku reaktivnost prema slobodnim metalima koji su prisutni u tim prostetskim grupama i na taj način može da ih aktivira ili inhibira (Simić, 2010).

S obzirom na to da NO difunduje slobodno u mitohondrije, može brzo da reaguje sa intramitohondrijalnim superoksidom (Radi i sar., 2002).

Mitohondrije su uključene u stvaranje slobodnih radikala, kao i u odbranu od njih. Mitohondrije su istovremeno mete oksidativnog stresa, kao i doprinoseći faktor mehanizmima pomoću kojih oksidativni stres kontroliše sudbinu ćelija (Garcia-Ruiz i sar., 1995; Turrens i Boveris, 1980; Turrens i sar. 1985). Mitohondrijalni elektronski transport predstavlja glavni intracelularni izvor reaktivnih kiseoničnih vrsta (Bailey i Cunningham, 2002; Hoek i sar., 2002).

2.2.2.3. Prooksidantni enzim (Ksantin-oksidaza)

Ksantin-oksidaza (XOD) je enzim koji je široko rasprostranjen kod različitih vrsta (od bakterija do čoveka) i u različitim tkivima sisara. Enzim učestvuje u oksidaciji širokog spektra endogenih (purina) i egzogenih (etanol) supstrata. Mada glavna fiziološka funkcija ksantin oksidaze ostaje nejasna, sve je veće interesovanje da se objasni sposobnost ovog enzima da služi kao izvor oksidišućih agenasa kao što su vodonik peroksid i superoksid anjon radikal (Parks i Granger, 1986).



Interesovanje za enzim kao izvor oksidišućih agenasa poraslo je značajno nakon što je uočena njegova uloga u patogenezi ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja tkiva kao što su: creva, bubrezi i srce. Puno je dokaza da su radikali kiseonika, generisani ksantin oksidazom, primarno odgovorni za ćelijsko oštećenje povezano sa reoksigencijom hipoksičnih tkiva (Parks i Granger, 1986).

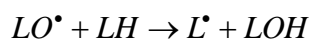
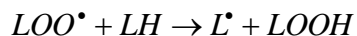
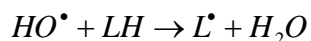
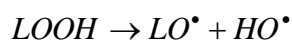
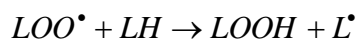
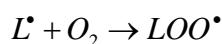
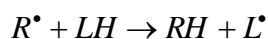
Uočeno je da ksantin oksidaza ima najveću aktivnost u jetri i crevima sisara (Della Corte i Stirpe, 1972).

2.2.2.4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija polinezasićenih masti, jedan je od najčešćih procesa, najviše proučavan i najbolje opisan mehanizam u oksidativnom stresu. Lipidna peroksidacija uključuje stvaranje lipidnih peroksil radikala (LOO^{\bullet}) i lipidnih hidroperoksida ($LOOH$). Lipidni peroksidi u reakcijama koje su katalizovane metalima stvaraju aloksil radikale (LO^{\bullet}), holesterol hidroperokside, endoperokside, epokside holesterola i masnih kiselina i druge aldehide (Halliwell i Chirico, 1993; Halliwell, 1995).

Tri karakteristične faze lipidne peroksidacije su: inicijacija, propagacija i terminacija lanca (Dargel, 1991).

Prvi korak u inicijaciji lipidne peroksidacije predstavlja izdvajanje atoma vodonika iz polinezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav bioloških membrana tako da nastaje lipidni radikal (L^{\bullet}). U daljim procesima, u fazi propagacije, dolazi do lančanih slobodno-radikalnih reakcija, koje dovode do stvaranja velikog broja peroksil radikala i organskih hidroksiperoksida (Dargel, 1991). Ovi lipidni radikali mogu reagovati sa susednim lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama, izazivajući seriju oštećenja i stvaranje reaktivnih produkata.



R^{\bullet} - radikal

LH - polinezasićena masna kiselina

L^{\bullet} - alkil radikal

LOO^{\bullet} - lipidni peroksid

$LOOH$ - lipidni hidroperoksid

LO^{\bullet} - aloksil radikal

Lančana reakcija može se prekinuti (terminacija) samo u slučaju da produkti reakcije reaguju međusobno ili da reaguju sa antioksidansom.

Jedan od produkata lipidne peroksidacije je i malonodialdehid (MDA) koji nastaje termolizom intermedijera endoperoksida (Scott, 1995). MDA se smatra glavnim izvorom lipofuscina, čija se koncentracija u tkivima i organima tokom starenja povećava. MDA se lako detektuje u krvi/plazmi i koristi se kao marker oksidativnog stresa (Cotgreave i sar., 1988). Takođe, može da reaguje sa slobodnim amino grupama proteina i nukleinskih kiselina i da dovede do još većih oštećenja ćelija (Scott, 1995). Lipidna peroksidacija može da dovede do sledećih procesa (Dargel, 1991):

1. Degradacije lipidnih membrana;
2. Interakcije degradacionih produkata sa različitim ciljevima u ćeliji i izvan nje;
3. Produkcije novih reaktivnih vrsta kiseonika u toku lančane reakcije.

Proces peroksidacije lipida smanjuje hidrofobnost lipidnog dvosloja, što menja afinitet i interakciju proteina sa lipidima i utiče na procese neophodne za odvijanje velikog broja funkcija membranskih proteina kao što su: deljenje, diferencijacija, fagocitoza, prijem i prenos signala, transport jona i materija i dr.

U procesu detoksikacije lipidnih hidroperoksida koji podrazumeva isecanje (eksciziju) oksidaciono modifikovane nezasićene masne kiseline, kao i repariranje postojećeg defekta učestvuju tri enzima (Đorđević, 2000):

1. klasična glutation peroksidaza

2. fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza
3. selen nezavisna glutation-S-transferaza tipa α

Tokom trajanja procesa lipidne peroksidacije oštećenje biomembrana se ostvaruje pomoću sledećih mehanizama:

1. promenom fizičko-hemijskih svojstava membranskih fosfolipida
2. delovanjem na proteinske komponente ćelijskih membrana
3. narušavanjem barijerne funkcije membrane

Kritičan događaj u složenom mehanizmu oštećenja tkiva slobodnim radikalima zasniva se na narušavanju barijerne funkcije biomembrana. Tokom jedne ovakve reakcije dolazi do menjanja funkcije membranskih receptora, enzima i jonskih kanala (Michelangeli i sar., 1991). Narušavanjem mehanizma održavanja homeostaze kalcijuma i njegovom povećanom intracelularnom koncentracijom dolazi do aktiviranja kalcijum-zavisnih enzima biomembrane (posebno fosfolipaze A2 i C). Na taj način se u proces uključuju enzimi ciklooksigenaznog i lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline čime se stvara čitav spektar endoperoksida i drugih bioaktivnih produkata (Mirić, 1997).

2.2.2.5. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi alkoholne bolesti jetre

Sada se zna da su slobodni radikali uključeni u različite fiziološke procese, kao i u mnoga patološka stanja kao što su: mutacije DNK, karcinogeneza, starenje, ateroskleroza, oštećenje nastalo radijacijom, inflamacija, ishemija - reperfuzija, dijabetes melitus, neurodegenerativne bolesti i toksična oštećenja uključujući akutnu i hroničnu alkoholnu toksičnost. Na ulogu slobodnih radikala u alkoholnoj bolesti jetre se sumnjalo još ranih šezdesetih godinadvadesetog veka (Albano, 2002).

Metabolizam etanola je direktno uključen u produkciju KSR ali i povezan sa formiranjem uslova koji pospešuju oksidativni stres kao što su hipoksija, endotoksemija i oslobađanje citokina (Sergent i sar., 2001). Alkohol, dalje može da promeni nivo određanih metala u telu i time facilitira produkciju KSR. Alkohol smanjuje nivo antioksidanasa koji bi mogli da eliminišu KSR. Kao rezultat toga, etanol dovodi do narušavanja ravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa u takvom stepenu da dolazi do oštećenja biomolekula kao što su masti, proteini i DNK.

Produkcija KSR i oksidativni stres u hepatocitima igraju centralnu ulogu u razvoju alkoholne bolesti jetre (Sergent i sar., 2001; Wu i Cederbaum, 2003).

Oksidativni stres se smatra jednim od osnovnih uzroka različih bolesti, uključujući i alkoholnu bolest jetre. 1966 god. Di Luzio (Di Luzio, 1966) je bio prvi koji je opisao lipidnu peroksidaciju nakon hroničnog izlaganja alkoholu, što su ubrzo potvrdili i drugi autori (Shaw i sar., 1981). Oksidativni stres povezan sa ABJ najverovatnije nije uzrokovan samo povećanjem produkcije prooksidanasa. Znajući da alkohol zamenjuje i do 50 % unosa dnevnih kalorija (Patek, 1979), pri čemu dovodi do malnutricije (Bujanda, 2000). Rezultat toga je da alkoholičari često imaju smanjene nivoe ključnih antioksidantnih molekula i samim tim im je smanjen antioksidantni status (Lieber, 2000). Na osnovu ovoga se može izvesti zaključak da je oksidativni stres kod ABJ posredovan i povećanom produkcijom prooksidanasa i smanjenjem antioksidantne zaštite.

Superoksid anjon radikal (O_2^-) najverovatnije igra centralnu ulogu u oštećenjima jetre izazvanih alkoholom. Postoje dva glavna razloga za ovu pretpostavku. O_2^- se stvara u mnogim procesima u organizmu i mnogi drugi oksidansi nađeni in vivo potiču od O_2^- (McCord i Fridovich, 1969). Mada postoje jasni dokazi da stvaranje prooksidanata zavisi od produkcije O_2^- , samo prisustvo ovog radikala nije dovoljno da objasni oksidativno oštećenje uzrokovano alkoholom. O_2^- nije potentan oksidans i ima relativno slab redoks potencijal (Wheeler i sar., 2001; Wheeler, Nagakami i sar., 2001). Ipak, pokazano je da je O_2^- ključni okidač oksidativnog stresa kod hronične zloupotrebe alkohola.

Drugi izvori oksidanasa u inflamatornim ćelijama uključuju ksantin oksidazu i mijeloperoksidazu (Kono i sar., 2000). U hepatocitima nastaju najočiglednije patološke promene u jetri usled konzumacije alkohola. Lipidni peroksidi se predominantno akumuliraju u hepatocitima. Može se zaključiti, da produkcija oksidanasa u ovom tipu ćelija ima kritičnu ulogu kod oštećenja jetre izazvanog alkoholom. Postoje mnogi potencijalni izvori prooksidanasa u njima, pri čemu su dva glavna mesta produkcije etanol inducibilni CYP2E1 i mitohondrije. Prisustvo CYP2E1 u hepatickom lobulusu, gde je prisutno oštećenje jetre izazvano alkoholom, ukazuje na mogućnost da CYP2E1 dovodi do oštećenja jetre izazvano alkoholom (Albano i sar., 1996).

Mobilizacija slobodnog gvožđa takođe može uzrokovati povećanje produkcije oksidanasa (Fentonova reakcija). Eksperimenti su pokazali da postoji jaka veza između neregulisane homeostaze gvožđa (hemohromatoza) i alkoholne bolesti jetre (Adams i Agnew, 1996), i da suplementacija gvožđem pojačava oštećenje prouzrokovano alkoholom (Cederbaum i sar., 2001; Tsukamoto i sar., 1995). Alkohol takođe izaziva hipoksiju u pericentralnim regionima jetrenog lobulusa (Tsukamoto i Xi, 1989; Arteel i sar., 1997). Hipoksija povećava produkciju prooksidanasa i smanjuje sposobnost hepatocita da detoksikuju slobodne radikale (Jones, 1985; Shan i sar., 1989; Nakanishi i sar., 1995). Sledeći primer je inhibicija alkoholom proteozoma 26S u hepatocitima (Bardag-Gorce i sar., 2000), koji je odgovoran za degradaciju oksidativno modifikovanih proteina. Alkohol takođe snižava citosolno i mitohondrijalno snabdevanje energijom i na taj način indirekto oštećuje ćelijsku antioksidantnu zaštitu.

Jedan od mehanizama kojim oksidativni stres prouzrokuje ćelijsko oštećenje je hemijska modifikacija bioloških molekula. Ova hemijska modifikacija može da alteriše i interferira u normalnim biološkim procesima i da bude direktno toksična za ćeliju. Modifikovani biološki molekuli mogu da stimulišu imunski odgovor domaćina i prouzrokuju autoimune bolesti. Pronađena su antitela protiv tako oksidativno modifikovanih proteina i kod humanih i kod animalnih modela alkoholne bolesti jetre (Klassen i sar., 1995). Etanol moduliše signale mnogih kaskada u ćelijama kod ABJ, na primer, pokazano je etanol menja aktivaciju stresom aktiviranih protein kinaza u hepatocitima, a ovaj efekat bi mogao biti posredovan i produkcijom oksidanasa (Shi i sar., 2002; Chen i sar., 1998). Iako alkohol povećava cirkulišući lipopolisaharid (LPS), čije povećanje stimuliše inflamatorni odgovor kod ABJ, nivoi LPS nađeni kod alkoholičara su relativno niski u poređenju sa nivoima nađenim kod endotoksemije (Deaciuc i sar., 1999). Osim aktivacije inflamatornih ćelija, alkohol čini hepatocite osetljivijim (Pastorino i Hoek, 2000).

Prooksidansi iz inflamatornih ćelija ne oštećuju direktno hepatocite kod ABJ, već povećavaju produkciju signalnih molekula koji onda dovode do oštećenja. Posebno produkcija proinflamatornih citokina (TNF-alfa) iz Kupferovih ćelija, dovodi do ovih promena (Haddad, 2002).

Produkcija prooksidanasa, stimulirana TNF-alfa u hepatocitima, oštećuje mitohondrijalni elektronski protok i prouzrokuje lipidnu peroksidaciju. Neki drugi

citokini (IL-1, IL-6) indukovani alkoholom, mogu da poremete transport i sekreciju triglicerida (Navasa i sar., 1998). Hronična konzumacija alkohola stimuliše citokine da povećaju snabdevanje jetre masnim kiselinama, dok simultano oštećuju ili smanjuju sposobnost hepatocita da ih metabolišu i sekretuju. Ovi efekti dejstvuju u tandemu sa alkoholom indukovanim promenama u NADH redoks statusu, što zajedno vodi steatozi (Navasa i sar., 1998).

Pored produkcije KSR u hepatocitima i inflamatornim ćelijama tokom izlaganja alkoholu, zapaženo je da i hepatičke stelatne ćelije produkuju KSR. Tretman alkoholom ili njegovim metabolitima (acetaldehid) stimuliše formiranje KSR iz NOX-a u stelatnim ćelijama. Tako formirani KSR, kao i KSR dobijeni iz drugih ćelijskih izvora kao što je P4502E1, može igrati važnu ulogu u transformaciji zvezdastih ćelija u miofibroblaste, kao i imati ulogu u povećanoj produkciji kolagena, koji se navodi kao ključni proces u fibrozi jetre (Beier i McClain, 2010; Nieto i sar., 1999).

Ključna komponenta progresije oštećenja jetre koje je izazvano alkoholom je inflamacija. Endogene proinflamatorne ćelije (Kupferove ćelije) infiltrišuće inflamatorne ćelije (neutrofili i limfociti) su nosioci zapaljenja kod ABJ. Njihova fiziološka uloga se ogleda u njihovoj sposobnosti da uklone i detoksikuju različite egzogene i endogene supstance. Međutim, njihova aktivacija može dovesti do oštećenja tkiva. Dokazano je da aktivacija Kupferovih ćelija može dovesti do oštećenja jetre prouzrokovanog alkoholom (Thurman, 1998). Alkohol povećava fagocitnu aktivnost i produkciju citokina kod Kupferovih ćelija i monocita (Martinez i sar., 1992; McClain i sar., 2002). Drugi važan proces kod aktiviranih makrofaga i monocita je produkcija prooksidanata. Dva glavna izvora prooksidanata u ovim ćelijama uključuju NAD(P)H oksidaze i inducibilna forma NOS-a (iNOS) (Kono i sar., 2000).

Dok su hepatociti istorijski imali centralnu ulogu u mnogim istraživačkim studijama o efektima etanola na funkciju jetre, sadašnji nalazi nam pokazuju da Kupferove ćelije produkuju ključne medijatore, koji stimulišu metabolizam alkohola i iniciraju rano oštećenje izazvano alkoholom (Bradford i sar., 1993; Adachi i sar., 1994). Specifično, Kupferove ćelije stimulisane tokom konzumacije etanola produkuju slobodne radikale i citokine, kao što je TNF-alfa (Iimuro i sar., 1997). Dokaz o ulozi Kupferovih ćelija u ranom alkoholom indukovanom oštećenju jetre je

priličan. Na primer, etanolom indukovano oštećenje jetre, kada je gram negativna mikroflora eliminisana iz gastrointestinalnog trakta nakon tretmana lactobacillus-om (Nanji i sar., 1994) ili antibioticima (Adachi i sar., 1995) podržava hipotezu da endotoksini iz gastrointestinalnog trakta, igraju značajnu ulogu u etanolom indukovanom oštećenju jetre (Adachi i sar., 1994).

Različiti toksični medijatori uključujući kiseonične radikale, TNF-alfa, interleukine i prostaglandine, oslobađaju se iz aktiviranih Kupferovih ćelija (Martinez i sar., 1992). Oksidansi imaju ulogu ključnih signalnih molekula i dovode do aktivacije redoks-senzitivnog transkripcionog faktora (NFkB) (Baldwin, 1996; Li i Karin, 1999), koji povećava ekspresiju kritičnih citokina, kao što je TNF-alfa i interleukina.

2.2.2.6. Nuklearni faktor kB (NFkB)

Nuklearni faktor kapa B je transkripcioni faktor koji se aktivira kao odgovor na različite stresore. Nakon aktivacije akumulira se u nukleusu i vezuje za DNK molekul gde reguliše ekspresiju gena. Nuklearni faktor kapa B je centralni regulator ćelijskog stresa u svim tipovima ćelija u jetri. Familija NFkB proteina kao što su RelA/p65, RelB, c-Rel i p50 se nalaze u citosolu ćelija kao dimeri u kompleksu sa kB molekulima. Ovi dimeri se aktiviraju i transportuju u nukleus ćelije kao odgovor na stresogene signale koji potiču od strane patogena ili oksidativnog stresa. Opasni signalni molekuli dovode do aktivacije IKK kinaza kompleksa, koji se sastoji od IKK/IKKB/NEMO, i fosforilacije Ikb. Fosforilisani Ikb se tada razgrađuje proteozomalnom aktivnošću. Disocijacija Ikb otkriva mesta u jedru gde se zatim Nfkb premešta i vezuje za određene delove DNK. Nfkb formira p65 i p50 heterodimere u makrofagima i vezuje se za region promotera različitih proinflammatoryh gena gde ih aktivira (Ghosh, 1999). NFkB reguliše ekspresiju mnogobrojnih proinflammatoryh medijatora u makrofagima jetre. Oštećenje jetre hroničnom alkoholnom intoksikacijom posredovano je aktivacijom TLR4 na makrofagima cirkulišućim lipopolisaharidom i sledstvenom aktivacijom NFkB i stvaranjem proinflammatoryh citokina (Wheeler i sar., 2001). Pored rezidentnih makrofaga u jetri, monociti takođe pokazuju povećanu aktivaciju NFkB pri hroničnoj konzumaciji alkohola (Hill i sar., 2000). Eksperimentalni modeli hronične alkoholne intoksikacije pokazali su povećano vezivanje NFkB za DNK u jetri (Wheeler i sar.,

2001). Smatra se da hronično uzimanje alkohola dovodi do aktivacije NFκB i produkcije bazalnog i lipopolisaharidom - stimulisanog TNF-alfa (Nanji i sar. 1999). Akutno konzumiranje alkohola, međutim smanjuje nuklearnu translokaciju i aktivaciju NFκB p65/p50 heterodimera (Mandrekar i sar., 1999). Dakle, različita regulacija NFκB odnosno njegova uloga u razvoju alkoholne bolesti jetre zavisi od dužine izlaganja alkoholu. S obzirom na to da povećana produkcija vodonik peroksida tokom konzumacije alkohola dovodi do aktiviranja NFκB, pojedine studije navode da regulacija vodonik peroksida može imati važnu ulogu u dizajniranju individualne terapije lekovima koji ciljano deluju na NFκB, jer je pojedinačni nukleotidni polimorfizam prisutan na κB mestima odgovoran za različiti obrazac genske ekspresije kod ljudi (Oliviera-Marques i sar., 2009).

2.2.2.7. P53

Gen p53 (poznat i kao TP53) je tumor supresorni gen, sa bitnom ulogom u kontroli ćelijskog rasta, lociran je na kratkom kraku 17p13.1 hromozoma 15, 16. Javlja se u dva oblika: normalni (wilde type) i mutirani tip. Kada je prisutno oštećenje DNK, nivo normalnog p53 proteina raste u ćeliji, vezuje se za DNK i dovodi do transkripcije nekoliko gena kontrolišući dva bitna efekta na ćeliju: prvo, zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi, tokom koga se oštećenje DNK popravlja, tako da, ako je došlo do reparacije oštećenja, nivo p53 opada u ćeliji uz pomoć dejstva produkata MDM2 gena, a ćelija nastavlja deobu u pravcu ćelija kod kojih nema oštećenja DNA; ukoliko prvi proces nije doveo do reparacije oštećenja DNK, p53 uz pomoć ćelijskih gena smrti BAX i IgF-BP3, inicira apoptozu ćelije (Komarova i sar., 2001).

2.2.3. Histopatologija alkoholne bolesti jetre

Alkoholna bolest jetre (ABJ) dovodi do trijasa histopatoloških promena: steatoze, steatohepatitisa i steatofibroze (Lefkowitz, 2005; Crawford, 2012). Sve ove promene počinju i najčešće su u centrolobularnom regionu hepatičkog lobulusa. Centrolobularni hepatociti su enzimski pripremljeni da metabolišu alkohol preko citoplazmatske alkoholne dehidrogenaze, kao i preko indukcije citohroma p450 enzima (Crawford, 2012). Ovi metabolički putevi dovode do produkcije masnih

kiselina koje se nakupljaju u steatotičnim hepatocitima i stvaraju toksične metabolite, koji izazivaju inflamaciju, oštećenje hepatocita i fibrozu (Theise, 2013).

Preko 90% hroničnih alkoholičara razvijaju masnu jetru, a 10-35% razvije alkoholni hepatitis. Oko 8-20 % hroničnih alkoholičara razvije cirozu jetre, koja eventualno može da progredira u hepatocelularni karcinom (Lefkowitz, 2005).

2.2.3.1. Steatoza

Steatoza je abnormalno nakupljanje mono di i tri- glicerida i masnih kiselina u hepatocitima u formi lipidnih kapljica (Mavrelis i sar., 1983). Kod normalnog metabolizma lipida, slobodne masne kiseline u plazmi nevezane ili vezane za lipoproteinske partikule se prenose do jetre i onda se oksiduju služeći kao gorivo u mitohondrijama hepatocita ili se skladište kao trigliceridi. Trigliceridi se izlučuju kao VLDL partikule ili se organizuju u masne kapljice i čuvaju unutar hepatocita privremeno. Prekomerno nagomilavanje masnih kapljica direktno dovodi do oštećenja ćelija jetre. Povećanje slobodnih masnih kiselina u plazmi se viđa i kod nealkoholne i kod alkoholom izazvane steatoze i verovatan je doprinoseći mehanizam patološke masne akumulacije u jetri (Bradbury, 2006). Pored toga, steatoza indukovana alkoholom stimuliše seriju patofizioloških poremećaja. Oksidacija etanola, npr, smanjuje NADH, koji suprimira oksidativne mehanizme mitohondrija. Pokazalo se da etanol, primarno u kulturi ćelija i kod animalnih modela, stimuliše hepaticku lipogenezu tako što aktivira transkripcione faktore, koji regulišu ekspresiju gena uključenih u biosintezu lipida (Ji i sar., 2006).

Steatoza je najraniji i najčešći nalaz kod ABJ i reverzibilna je ukoliko dođe do prestanka konzumacije alkohola (Donohue, 2007). Procenjeno je da normalni parenhim jetre sadrži do 5% lipida, tako da se prisustvo hepatickih lipida više od toga smatra patološkim (Odze, 2009). Termin masna degeneracija se koristi kada više od 5% hepatocita pokazuje steatozu, dok se termin masna jetra odnosi na stanje kada više od 50% hepatocita pokazuje steatozu (Tannapfel i sar., 2011). Prisustvo steatoze nije esencijalno za postavljanje dijagnoze ABJ, zato što može da dođe i do njenog smanjivanja uprkos nastavku uzimanja alkohola i progresije bolesti (Yip i Burt, 2006). Mikroskopski, steatoza počinje u zoni 3 (perivenularno - centrolobularno) i širi se upolje sa pogoršanjem (Theise, 2013).

Steatoza može da se klasifikuje kao mikrovezikularna (male kapljice) ili kao makrovezikularna (velike kapljice). Mikrovezikularna steatoza je manje prevalentna i karakteriše se hepatocitima sa centralno smeštenim jedrom i malim i vezikularnim masnim kapljicama lokalizovanim cirkumferentno oko jedra. Makrovezikularna steatoza se karakteriše hepatocitima koji sadrže jedro potisnuto na jednu stranu ćelije i velikim masnim kapljicama. Ruptura masno promenjenih hepatocita može da dovede do pojave lipogranuloma (mikroskopska mesta inflamacije oko masnih kapljica). Oni se tipično viđaju pojedinačno i često su dispergovani kroz parenhim. Ćelije hroničnog zapaljenja se mogu videti rasute unutar lobulusa, ali ne u značajnoj gustini ako se radi samo o steatozi. Steatoza se smatra faktorom rizika za progresiju bolesti u steatohepatitis i druge ozbiljnije komplikacije bolesti jetre (ciroza, hepatocelularni karcinom). Međutim, studije koje uključuju humane i animalne modele su pokazale da steatoza može da progredira direktno u cirozu i fibrozu bez karakterističnih inflamatornih promena za steatohepatitis (Rehm i sar., 2013).

2.2.3.2. Steatohepatitis

Steatohepatitis je histološki obrazac koji može da se vidi kod hroničnih korisnika alkohola, a karakterišu ga inflamacija parenhima, oštećenje hepatocita i fibroza (Lancet, 1981). Ovaj histološki obrazac može biti uzrokovan direktnim dejstvom alkohola ili višestrukim nealkoholnim etiološkim faktorima (nealkoholni steatohepatitis). Generalno, ove promene su najizraženije perivenalno, i šire se kroz lobuluse kako bolest progredira.

Steatohepatitis, kao histopatološka dijagnoza se može videti kod hroničnih alkoholičara sa ili bez prisustva akutnog kliničkog sindroma nazvanog alkoholni hepatitis. Drugim rečima, alkoholni steatohepatitis nije sinonim za alkoholni hepatitis, pri čemu pacijenti sa kliničkom slikom alkoholnog hepatitisa skoro uvek imaju alkoholni steatohepatitis (Lucey i sar., 2009). Inflamacija kod alkoholnog steatohepatitisa nije zonalno distribuirana i tipično je bogata neutrofilima, mada retko uključuje i hronične inflamatorne ćelije kao što su limfociti (Lancet, 1981). Infiltracija neutrofilima je zavisna od porasta hemokina kao što su IL-8 i IL-17 kako u serumu tako i u jetrenom parenhimu. Apoptotične ćelije, balonasti hepatociti i Mallory-Denk

telašca predstavljaju glavna obeležja oštećenja hepatocita kod alkoholnog steatohepatitisa. Prisustvo Mallory-Denk telašaca ukazuje na intacelijski oksidativni stres i može da bude signal za druga patološka stanja jetre kao što su nealkoholni steatohepatitis, Wilsonova bolest, primarna bilijarna ciroza ili izloženost nekim lekovima (amjodaron). Balonirani hepatociti izgledaju otečeno i uvećano sa promenjenim izgledom citoplazme (Lemmers i sar., 2009; McClain i sar., 1999).

2.2.3.3. Steatofibroza

Mnogi faktori su uključeni u nastanak i razvoj difuzne fibroze-ciroze kod alkoholne bolesti jetre. Oštećenje hepatocita alkoholom vodi do aktivacije hepatskih zvezdastih ćelija. Ovako aktivirane zvezdaste ćelije dobijaju miofibroblastni fenotip i sposobnost da proizvode kolagen (Friedman, 2008). Debeli lanci kolagena mogu se videti oko centralne vene, kao i u hepatskim lobulusima, pri čemu inhibiraju difuziju ključnih nutrijenata između hepatocita i sinusoidalne krvi. Ovo vodi do izgladnjivanja i fokalne atrofije hepatocita koji se nalaze u blizini. Sa druge strane, vremenom, dolazi do ožiljavanja i zadebljanja fibroznih septi. Kao odgovor na oštećenje hepatocita, simultano dolazi do njihove regeneracije u drugim područjima. Kao rezultat fibroze, atrofije hepatocita i fokalne regeneracije, nastaju cirotični čvorovi. Ovi čvorovi mogu biti klasifikovani kao mikronodularni ili makronodularni u zavisnosti od njihove veličine (manji ili veći od 3 mm). Jetra, koja je na početku bila steatotična (uvećana i žuto-smeđa), sada postaje cirotična (skvrčena, često ispod 1kg težina, smeđa, tvrda i nodularna).

Mada se češće razvija od alkoholnog steatohepatitisa, fibroza isto tako može da se razvije iz steatotične jetre (Crawford, 2012; Friedman, 2008). Po tom scenariju, fibroza je direktan rezultat štetnog dejstva alkohola, a ne sekundarna inflamacija. Ovaj proces tipično traje duže nego fibroza nastala agresivnijom prirodom alkoholnog steatohepatitisa.

2.2.4. Biohemijski pokazatelji oštećenja jetre

2.2.4.1. Ast i Alt

Oštećenje jetre, akutno ili hronično, dovodi do povećanja aminotransferaza u serumu. Alanin amino-transferaza i aspartat amino-transferaza (ALT i AST) su enzimi, koji katalizuju transfer alfa amino grupa sa alanina i aspartata na alfa keto grupu ketoglutarne kiseline pri čemu nastaju oksal acetat i piruvat, koji su važni učesnici u ciklusu limunske kiseline (Giannini, 2005). Oba enzima zahtevaju piridoksal fosfat (vitamin B6) za svoje reakcije, međutim, efekat deficita piridoksal fosfata se više odražava na aktivnost ALT-a u odnosu na AST (Dufour i sar., 2000; Vanderlinde, 1986). Ovaj efekat ima klinički značaj kod pacijenata sa ALD-om, kod kojih deficijencija piridoksal fosfata može smanjiti aktivnost ALT-a u serumu i učestvovati u povećanju odnosa AST-a i ALT-a (Cohen i Kaplan, 1979; Diehl i sar., 1984). Obe aminotransferaze su visoko koncentrisane u jetri. AST se takođe nalazi u srcu, skeletnim mišićima, bubrezima, mozgu, crvenim krvnim zrnima, a ALT je niske koncentracije u skeletnim mišićima i bubrezima, tako da je povećanje ALT-a u serumu mnogo specifičniji pokazatelj oštećenja jetre (Wroblewski, 1958). U jetri, ALT je lokalizovan samo u ćelijskoj citoplazmi, dok se AST nalazi u citoplazmi (20%) i mitohondrijama (80%) (Rej, 1989). Zona 3 hepatičkog acinusa sadrži veće koncentracije AST-a i oštećenje u ovoj zoni, ishemično ili toksično, može rezultovati povećanjem nivoa AST-a. Klirens aminotranferaza je obezbeđen jetrenim sinusoidalnim ćelijama (Kamimoto i sar., 1985). Poluživot u cirkulaciji ALT-a je oko 47 sati, 17 sati za ukupni AST i oko 87 sati za mitohondrijalni AST (Dufour i sar., 2000).

2.2.4.2. Alkalna fosfataza

Alkalna fosfataza (ALP) je enzim koji transportuje metabolite kroz ćelijsku membranu. Koštane bolesti i bolesti jetre su najčešći uzroci patološkog povećanja nivoa ALP-a, iako ALP može imati poreklo i iz ostalih tkiva, kao što su placenta, bubrezi, intestinalni trakt ili može poticati iz leukocita (Fishman, 1990). Treći trimestar trudnoće (placentarnog porekla) i adolescencija (koštanog porekla) su povezani sa izolovanim povećanjem nivoa ALP-a u serumu (Dufour i sar., 2000). Hepatička ALP je prisutna na površini epitela bilijarnog trakta. Holestaza povećava sintezu i oslobađanje ALP-a, a akumulirane žučne soli povećavaju njeno oslobađanje sa ćelijske površine (Moss, 1997; Schlaeger i sar., 1982). Poluživot ALP-a u cirkulaciji je oko 7 dana (Dufour i sar., 2000). Ove karakteristike objašnjavaju zašto se nivoi ALP-a često povećavaju kasnije kod opstrukcije bilijarnog trakta, a opadaju

lagano nakon rezolucije. Kod nekih pacijenata (trudne žene, adolescenti) razlog povećanog nivoa ALP-a može da bude opravdan, ali kod drugih pacijenata neophodno je ispitati poreklo tog povećanja (Giannini, 2005). Oštećenje jetre izazvano lekovima, može se prezentovati kao holestaza (povećanje ALP-a ili odnos ALT/ALP < 2), iako stepen promene nivoa može biti varijabilan i može biti praćen hiperbilirubinemijom (Velayudham i Farrell, 2003). Promena ALP-a tokom bilijarne opstrukcije može biti praćena pikom nivoa aminotransferaza, tipičnim simptomima i konjugovanom hiperbilirubinemijom, naročito kod akutnog stanja ili nivoi ALP-a mogu da fluktuiraju sa normalnim nivoom bilirubina u serumu i sa/ili bez promena nivoa GGT-a (Forston i sar., 1985; Anciaux i sar., 1986).

2.2.4.4. Bilirubin

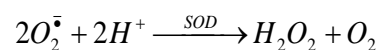
Bilirubin je produkt katabolizma hemoglobina u retikuloendotelijalnom sistemu. Razgradnja hema određuje formiranje nekonjugovanog bilirubina, koji se transportuje u jetru. U jetri, UDP-glukuroniltransferaza konjuguje nerastvorljivi u vodi nekonjugovani bilirubin u glukuronsku kiselinu i konjugovani bilirubin, koji se ekskretuje u žuč (Berk i Noyer, 1994; Fevery i Blanckaert, 1986). Kod zdravih ljudi, konjugovani bilirubin je virtuelno odsutan iz seruma, uglavnom zbog brzog procesa bilijarne sekrecije (Green i Flamm, 2002). Nivoi bilirubina rastu, kada jetra izgubi više od polovine svoje ekskretorne sposobnosti, pa samim tim povećani nivo konjugovanog bilirubina je često znak bolesti jetre. Konjugovana hiperbilirubinemija (obično < 34 $\mu\text{mol/L}$) i konkomitantno značajno povećane vrednosti aminotransferaza sugerišu na akutni virusni hepatitis, toksično ili ishemično oštećenje jetre. Bilijarna opstrukcija može izazvati različite stepene konjugovane hiperbilirubinemije. Ozbiljnost promena zavisi od stepena opstrukcije i funkcionalne rezerve jetre (Giannini, 2005). Kada se stanje konjugovane hiperbilirubinemije poboljša bez obzira na uzrok, nivoi bilirubina u serumu opadaju bimodalno. Prvo imamo brzo opadanje, a potom sporije opadanje koje nastaje zbog vezivanja bilirubina za albumin i stvaranje kompleksa (delta-bilirubin), koje ima isti poluživot kao serumski albumin (Berk i Noyer, 1994; Fevery i Blanckaert, 1986; Van Hootegeem i sar., 1985).

2.2.5. Antioksidativna zaštita

Kako bi se suprotstavio štetnim efektima koji se odvijaju u ćeliji, organizam je razvio nekoliko mehanizma odbrane. Jedan od takvih jeste mehanizam antioksidantne odbrane. Oslanjajući se na teoriju o slobodnim radikalima i oksidativnom stresu, antioksidansi su prva linija u odbrani od stresa. Odbrana endogenim antioksidansima obuhvata mrežu enzimskih i neenzimskih molekula, koji se nalaze u citoplazmi i organelama (Đuračková, 2010).

2.2.5.1. Superoksid - dismutaza

Superoksid- dismutaza (SOD) katalizuje konverziju superoksid anjon radikal u molekulski kiseonik i vodonik peroksid (McCord i Fridovich, 1969), prema sledećoj reakciji:



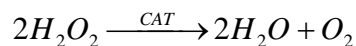
Postoje četiri vrste superoksid dismutaza, u zavisnosti od metala koji sadrži u aktivnom centru:

1. Superoksid-dismutaza koja sadrži gvožđe (FeSOD) u aktivnom centru (Fe^{3+}), karakteristična je za prokariotske organizme.
2. Superoksid-dismutaza, koja sadrži mangan (MnSOD), u aktivnom centru (Mn^{3+}) nalazi se u matriksu mitohondrija (Fridovich, 1995). Gen za MnSOD se kod čoveka nalazi na hromozomu 6.
3. Superoksid-dismutaza, koja sadrži bakar i cink (CuZnSOD), nalazi se uglavnom u citosolu, endoplazmatskom retikulumu i međumembranskom prostoru. McCord i Fridovich su 1968 godine izolovali protein iz humanih eritrocita "eritrokuprein", dokazali da uklanja superoksid anjon radikal i nazvali ga superoksid-dismutaza (McCord i Fridovich, 1969) Gen za ovaj enzim u humanom genomu nalazi se na hromozomu 21.
4. Ekstracelularna superoksid-dismutaza (ECSOD), nalazi se u plazmi, limfi i cerebrospinalnom likvoru.

SOD revitalizuje ćelije, održava njihovu funkciju i usporava vreme i brzinu njihove destrukcije (Mujović, 1998).

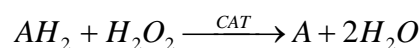
2.2.5.2. Katalaza

Katalaza (CAT) katalizuje razgradnju vodonik peroksida do vode i molekulskog kiseonika u "katalaznoj" reakciji, prema sledećoj reakciji:



"katalazna" reakcija

Katalaza može da vrši i oksidaciju H- donora uz trošak jednog molekula vodonik peroksida u "peroksidaznoj" reakciji, prema jednačini:



"peroksidazna" reakcija

Katalaza je strukturno tetramerni homoprotein koji se sastoji od četiri identične subjedinice, sadrži hematin (hem-Fe³⁺protoporfirin) grupu vezanu u aktivnom centru i ima molekulsku masu od 240 kDa (Halliwell i Gutteridge, 1999). Aktivno mesto svake subjedinice je stabilizovano sa jednim molekulom čvrsto vezanog NADPH.

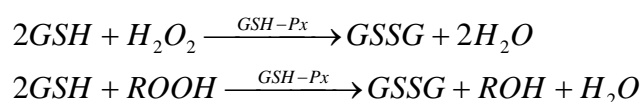
Najviši nivo katalazne aktivnosti kod sisara nađen je u jetri i eritrocitima, nizak nivo katalazne aktivnosti nađen je u mozgu, srcu, pankreasu, plućima i skeletnim mišićima (Halliwell i Gutteridge, 1999). Endotelne ćelije ne sadrže ovaj enzim. On se sintetiše u ribozomima, a zatim prenosi do peroksizoma. Peroksizomi su respiratorne organele koje katabolišu većinu supstanci preko H₂O₂ generišućih enzima. Vodonik peroksid, koji nastaje aktivnošću ovih enzima razlaže se pomoću katalaze koja čini više od 40 % svih proteina u peroksizomima. Peroksizomi imaju značajnu fiziološku ulogu i u metabolizmu neutralnih lipida. Pored lokalizacije u peroksizomima, katalaza se može nalaziti slobodna u citosolu, kao što je slučaj kod retikulocita i zrelih eritrocita.

U fiziološkim uslovima katalaza i glutation peroksidaza kompetitivno konkurišu za vodonik peroksid kao supstrat. Glutacion peroksidaza ima veći afinitet za H₂O₂ i zbog toga pokazuje veću aktivnost u detoksikaciji vodonik peroksida pri malim

koncentracijama ovog jedinjenja. Prisustvo katalaze u peroksizomima, gde pod uticajem peroksizomalnih enzima nastaje vodonik peroksid, omogućava zaštitu ovog dela ćelije od njegovog dejstva. U drugim delovima ćelije katalaze ima manje, pa ulogu u detoksikaciji H_2O_2 preuzimaju peroksidaze.

2.2.5.3. Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza- GSH-px katalizuje glutacionu zavisnu redukciju vodonik peroksida u vodu i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole prema sledećim reakcijama :



Glutation peroksidaza zauzima centralno mesto glutacionog redoks ciklusa, koji predstavlja glavni put redukcije organskih hidroperoksida. Postoji nekoliko oblika ovog enzima (Mullineaux i Creissen, 1997)

Se-zavisna glutaciona peroksidaza (SeGSH-px), koja redukuje vodonik peroksid do vode uz prisustvo glutaciona kao drugog supstrata.

Se-nezavisna forma, pripada familiji enzima glutacion-c-transferaze, GST, koji katalizuju reakcije konjugacije redukovanog glutaciona sa raznim organskim jedinjenjima;

Fosfolipid-hidroperoksid-glutaciona peroksidaza (PHGSH-px), koja reaguje samo sa fosfolipidnim hidroperoksidima. Jedina je forma glutacione peroksidaze koja inhibira procese lipidne peroksidacije, uz obavezno prisustvo fiziološke koncentracije vitamina E.

2.2.5.4. Glutation-S-transferaza

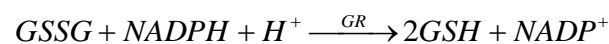
Glutation-S-transferaza (GST) se najvećim delom nalazi u citosolu. Kod sisara je prisutna u svim tkivima, ali najveću aktivnost pokazuje u jetri, gde čini i do 10% svih proteina citosola (Đorđević i sar., 2000).

Ovaj enzim ispoljava tri različite funkcije:

- Katalizuje reakciju konjugacije redukovanog glutationa sa različitim molekulama uključujući alkil- i arilaldehide, laktone, epoksidge, estre, hinone, izotiocijanate, alkene i halogenoalkane.
- Deluje kao vezujući protein za različite supstance kao što su steroidi i metaboliti nekih lekova, čime olakšava njihov transport.
- Kovalentno vezuje neke pesticide, kancerogene i potencijalno toksične supstance.

2.2.5.5. Glutation-reduktaza

Glutation-reduktaza (GR) svojom katalitičkom aktivnošću omogućava očuvanje glutaciona u redukovanom obliku. Ona je flavoproteinski enzim i regeneriše redukovanog glutaciona iz oksidovanog oblika uz pomoć, kao redukcionog kofaktora prema sledećoj reakciji:



GR je dimer sastavljen od dve proteinske subjedinice, od kojih svaka sadrži po jedan molekul FAD u aktivnom centru. Nalazi se u citosolu i mitohondrijama.

Glutation-reduktaza ima značajnu ulogu u zaštiti organizma od oksidacionih oštećenja. Promene aktivnosti GR često su povezane sa promenama aktivnosti GSH-Px i SOD (Sies, 1985). Povećana aktivnost GR zapažena je u tumorskim ćelijama i ćelijama u kojima je veštačkim putem izazvan oksidacioni stres. Smatra se da je ovo rezultat indukcije sinteze specifične RNK, kao i uspostavljanja ravnoteže sa ostalim komponentama antioksidacionog zaštitnog sistema (Mullineaux i Creissen, 1997).

Poznato je da nedostatak glutacion-reduktaze usled izlaganja pojedinim lekovima može dovesti do hemolitičke anemije. Gen za GR kod čoveka nalazi se na hromozomu 8 (Mullineaux i Creissen, 1997).

2.2.6. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Neenzimski sistem odbrane od oksidativnog stresa uključuje lipofilne i hidrofilne antioksidanse, čija je interakcija sa enzimskim sistemom veoma značajna u zaštiti ćelije. Inicijalna reakcija oštećenja ćelije u uslovima stvaranja slobodnih radikala počinje u ćelijskoj membrani. Zato je značajno da su u njoj prisutni liposolubilni tokoferoli (vitamin E), koji funkcionišu kao antioksidansi, jer skupljaju slobodne radikale ili reaguju sa njihovim proizvodima, pre svega peroksil radikalima. Sprečavajući nagomilavanje peroksil radikala tokoferoli prekidaju lančanu reakciju peroksidacije. U toj reakciji se stvara novi tokoferol radikal, ali se u prisustvu hidrosolubilne askorbinske kiseline (vitamin C) tokoferol regeneriše. Karotenoidi su klasa liposolubilnih antioksidanasa i prekursora vitamina A. Beta karoten hvata singlet kiseonik, sprečava lančane reakcije radikala i inhibiše lipooksigenaznu aktivnost. Askorbinska kiselina (vitamin C) je najznačajniji hidrosolubilni antioksidans i veoma je važan antioksidans u reakcijama prekidanja lančanih reakcija radikala unutar ćelije, ali i ekstracelularnim tečnostima. Pored pomenute uloge u regeneraciji alfa-tokoferola iz tokoferil radikala, askorbinska kiselina može direktno reagovati sa superoksidom i hidroksilnim anjonom, kao i različitim lipidnim hidroperoksidima (Simić, 2010).

2.2.6.1. Glutation

Glutation (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin) je tripeptid prisutan u svim ćelijama kao slobodan ili vezan u citosolu, jedru, mitohondrijama i mikrozomima. U ćeliji se nalazi u milimolarnim koncentracijama, pretežno kao tiol u redukovanom obliku (GSH) i u manjoj količini, oko 5%, kao disulfid oksidovani oblik (GSSG). Oksidovani oblik glutaciona nastaje oksidacijom dva molekula GSH, pri čemu nastaje disulfidna veza (Punchad i Kelli, 1996).

Glutation ima mnogobrojne funkcije u ćeliji. Neophodan je za sintezu proteina, učestvuje u regulaciji ćelijskog redoks balansa, redukciji metabolizma leukotrijena i prostaglandina. Takođe učestvuje u regulaciji aktivnosti enzima, zaštiti ćelija od negativnog efekta radijacije i kiseoničnih slobodnih radikala kao i drugih reaktivnih kiseoničnih intermedijera. U reakcijama redukcije vodonik peroksida i organskih

hidropoeroksida katalizovanih sa GSH-Px, redukovani glutation prelazi u oksidovani oblik (Punchad i Kelli, 1996).

Glutation ima ulogu i u detoksikaciji kao kofaktor enzima glutation-S-transferaze. Rezultat reakcije je konjugacija glutationa sa različitim metabolitima i njihov transport izvan ćelije (Dekant, 1996).

2.3. Surutka

Mleko sadrži dva primarna izvora proteina, kazein i surutku. Surutka, proteinski kompleks, koji se dobija iz mleka, izučavan je kao funkcionalna hrana koja je korisna za zdravlje ljudi. Istorijski, surutka je smatrana lekom za stomadne tegobe, kao i za oboljenja zglobova i ligamenata. Danas je postala popularni dijetetski suplement, koji zbog svojih bioloških sastojaka, kao što su: laktoferin, betalaktoglobulin, alfa-laktalbumin, glukomakropeptid imunoglobulini, laktoza, vitamini i minerali, pokazuje niz svojstava koji podstiču imunitet. Dodatno, surutka ima sposobnost da deluje kao antihipertenzivni, antitumorski, hipolipidemijski, antiviralni, antibakterijski i isceljujući činilac, a u poslednje vreme sve više se spominje i njeno potencijalno antioksidantno svojstvo (Gad i sar., 2011; Ilyas i sar., 2015). Primarni mehanizam kojim se pretpostavlja da surutka ispoljava svoj efekat je unutraćelijska zamena aminokiseline cistein sa glutationom, moćnim unutarćelijskim antioksidantom. Brojna klinička istraživanja su uspešno sprovedena upotrebom surutke u lečenju karcinoma, HIV-a, hepatitisa B, kardiovaskularnih oboljenja, osteoporoze, kao i upotrebom surutke kao antimikrobnog agensa. Protein surutke je takođe korisan u izvođenju i poboljšanju stanja tela prilikom vežbanja. Hepatoprotektivna uloga komponenti surutke se ogleda u supresiji porasta aktivnosti u plazmi alanina i aspartat-aminotransferaze, laktat-dehidrogenaze i bilirubina, koji su svi markeri hepatitisa. Isto tako smanjuje histopatološke znake portalne fibroze i perivenularne skleroze.

Danas je surutka popularni hranljivi proteinski suplement koji obezbeđuje antimikrobnu aktivnost, imunološku modulaciju, pojačava mišićnu snagu i vrši prevenciju kardiovaskularnih bolesti, malignih bolesti i osteoporoze. Tako su dnevne doze proteinskog koncentrata iz surutke (imunokal) kod obelelih od razlicitih tumora od 30-40 grama (Kenedy i sar., 1995; See i sar., 2002). Doze imunokala koje se daju kod pacijenata sa Hepatitisom B ili C u nekim istraživanjima su bile po 12 grama dva

puta dnevno. Generalno, na osnovu istraživanja, preporučene dnevne doze proteina surutke su 5-50 grama tokom 12 nedelja. Veće doze od ovih bi mogle negativno uticati na funkciju bubrega (Watanabe i sar., 2004).

2.3.1. Laktoferin

Laktoferin, glikoprotein koji vezuje gvožđe, je ne-enzimski antioksidant koji je pronađen u surutki dobijenoj iz kravljeg mleka, kao i u kolostrumu. Laktoferin iz kravlje surutke sadrži 689 aminokiselinskih delova, dok humani laktoferin sadrži 691 (Pierce i sar., 1991). Laktoferin iz goveđe surutke se sastoji od jednog polipeptidnog lanca koji ima 2 mesta za vezivanje jona gvožđa. Pre obrade, kravlji laktoferin je samo 15-20% zasićen gvožđem. Laktoferin sa sniženim gvožđem, koji ima manje od 5% gvožđa, označava se kao apolaktoferin. Mleko iz dojki žena sadrži apolaktoferin (Steijns i Van Hooijdonk, 2000). Koncentracija laktoferina u humanom mleku i kolostrumu je približno 2mg/mL i 7 mg/mL, dok je u kravljem mleku i kolostrumu približno 0,2mg/mL i 1,5mg/mL. Laktoferin je glavni sastojak proteina surutke u humanom mleku; pa ipak, koncentracija u većini proteinskih preparata surutke u prahu iznosi samo 0,35-2,0% svih proteina.

2.3.2. Beta-laktoglobulin (β laktoglobulin)

Beta-laktoglobulin predstavlja približno polovinu ukupnih proteina u kravljjoj surutki, dok u humanom mleku ne postoji. Pored toga što predstavlja izvor esencijalnih i aminokiselina sa razgranatim lancem, retinol-vezujući protein je otkriven unutar beta-laktoglobulinske strukture. Ovaj protein, kao nosač za hidrofobne molekule, poput retinolske kiseline, ima sposobnost da modifikuje limfatičke odgovore (Guimont i sar., 1997).

2.3.3. Alfa-laktalbumin (α laktalbumin)

Alfa-laktalbumin je jedan od glavnih proteina pronađenih u kravljem i humanom mleku. On čini približno oko 20-25% proteina surutke i sadrži širok spektar aminokiselina, uključujući lako dostupane količine esencijalnih i aminokiselina sa razgranatim lancem. Prečišćeni alfa-laktalbumin je najčešće dostupan u izradi preparata za ishranu novorođenčadi, s obzirom da ima najsljedniji proteinski sastav

humanom mleku. Pa ipak, zbog troškova preciznog merenja, većina preparata za novorođenčad na bazi mleka čine sastojci poput demineralizovane surutke sa višim nivoima beta-laktoglobulina, čineći ih manje sličnim humanom mleku. U istraživanjima na miševima, alfa-laktalbumin, u izvornom i hidrolizovanom obliku, pospešuju odgovor antitelima na sistematsku antigenu stimulaciju (Bounous i Kongshavn, 1982). Ista studija je dokazala da alfa-laktalbumin ima direktan efekat na funkciju B limfocita, kao i na supresor-T-limfocit-zavisne i nezavisne odgovore. (Bounous i Kongshavn, 1985).

2.3.4. Laktoperoksidaza

Surutka sadrži mnoge enzime kao što su: hidrolaze, transferaze, proteaze, lipaze. Laktoperoksidaza je jedan od najprisutnijih enzima u surutki i čini 0,25 - 0,5 % ukupne količine proteina u njoj, a ima sposobnost da katalizuje neke molekule, uključujući vodonik - peroksid (Bjorck, 1978). Tokom procesa pasterizacije, ovaj enzim ostaje aktivan što ukazuje na njegovu stabilnost.

2.3.5. Imunoglobulini

Surutka sadrži značajnu količinu imunoglobulina i to oko 10-15% od ukupne količine proteina u surutki. Studije pokazuju da mleko ne-imunizovanih krava sadrži specifična antitela za humani rotavirus, kao i antitela protiv nekih bakterija kao što je E. Coli. (Losso i sar., 1993).

2.3.6. Glukomakropeptid

Glukomakropeptid (GMP) je protein prisutan u surutki i čini 10-15% svih protein, a označava se i kao kazein makropeptid. On je jedan od samo nekoliko prirodnih proteina koji nemaju fenilalanin (bezbedan za upotrebu kod fenilketonurije), a isto tako ne sadrži u svom lancu triptofan i tirozin (Kenedy i sar., 1995; See i sar., 2002).

2.4. Tikvino ulje(Cucurbita pepo L.)

. Prirodni antioksidansi, kao sekundarni metaboliti nekih biljaka, kada se koriste u većim količinama, izgleda igraju važnu ulogu u profilaksi mnogih bolesti, uključujući bolesti jetre. Jedna od takvih biljaka je i tikva, odnosno njeno seme (Cucurbita pepo L.), koje je bogat izvor nezasićenih masnih kiselina, antioksidanasa i vlakana, te se spominje njena anti-aterogena i hepatoprotektivna aktivnost (Eraslan i sar., 2013). Visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina (posebno linolenske i oleinske kiseline), karotenoida, gama-aminobuterne kiseline, sterola, proteina, polisaharida, polifenola, fitosterola, vitamina A i E i ostalih supstanci kvalifikuje ulje iz semena tikve kao zdrav dodatak ljudskoj ishrani (Vetriselvan i sar., 2010). Polifenoli spadaju u veliku grupu antioksidanasa i deluju različitim mehanizmima u čišćenju i eliminaciji slobodnih radikala. Takođe, pospešuju aktivnost drugih antioksidanasa kao što su vitamini rastvorljivi u mastima. Povećavaju aktivnost glutationa i katalaze i smanjuju lipidnu preoksidaciju u jetri (Shanmugam i sar., 2011). Na taj način deluju antiinlamatorno, diuretski, antimikrobno (Andjelković i sar., 2010).

S obzirom da je alkoholni stres ujedno i oksidativni stres i da su do sada u mnogim istrživanjima korišćeni ekstrakti raznih biljaka sa dobrim antioksidativnim potencijalom, bilo bi eksperimentalno prihvatljivo i korisno proveriti i antioksidativni kapacitet surutke i ulja semena tikve. Paradoksalno je da su današnji trendovi ishrane u svetu okrenuti biološki zdravoj i netretiranoj hrani (tzv. organska hrana) a da se sistemski ne sprovodi koncepcija umerenijeg i manje stresnog načina života, koja bi sigurno doprinela i smanjenom unosu alkohola. Kako je konzumiranje alkohola svakodnevna pojava, dokazivanjem efikasnosti prirodnih produkata kao hepatoprotektora koji bi mogli biti sastavni deo ishrane, možda bi se mogla ublažiti ili sprečiti teška oštećenja jetrinog tkiva.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita:

3.1. Uticaj etanola kod izloženih životinja:

- a. na promene parametara oksidativnog stresa u jetri ispitivanjem aktivnosti enzima: MnSOD, CuZnSOD, CAT, GR, GST, GSH-Px, XOD; ukupan sadržaj glutaciona (GSH); intenzitet lipidne peroksidacije (MDA) i ekspresiju (Western blot) CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GR, NFkB i p53.
- b. na patohistološke promene: kongestija, dilatacija centralne vene, dilatacija grane vene porte, inflamacija portnih prostora, masne hepatocitne promene, hiperplazija Kupferovih ćelija, novoformirani žučni duktusi i edem ćelije.
- c. biohemijske parametre u jetri i krvi.

3.2. Uticaj surutke kod nealkoholisanih i alkoholisanih životinja:

- a. na promene parametara oksidativnog stresa u jetri, ispitivanjem aktivnosti enzima: MnSOD, CuZnSOD, CAT, GR, GST, GSH-Px, XOD; ukupan sadržaj glutaciona (GSH); intenzitet lipidne peroksidacije (MDA) i ekspresiju (Western blot) CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GR, NFkB i p53.
- b. na patohistološke promene: kongestija, dilatacija centralne vene, dilatacija grane vene porte, inflamacija portnih prostora, masne hepatocitne promene, hiperplazija Kupferovih ćelija, novoformirani žučni duktusi i edem ćelije.
- c. biohemijske parametre u jetri i krvi

3.3. Uticaj tikvinog ulja (Cucurbita pepo L.) kod nealkoholisanih i alkoholisanih životinja:

- a. na promene parametara oksidativnog stresa u jetri, ispitivanjem aktivnosti enzima: MnSOD, CuZnSOD, CAT, GR, GST, GSH-Px, XOD; ukupan sadržaj glutationa (GSH); intenzitet lipidne peroksidacije (MDA) i ekspresiju (Western blot) CuZnSOD, MnSOD, CAT, GSH-Px, GR, NFkB i p53.
- b. na patohistološke promene: kongestija, dilatacija centralne vene, dilatacija grane vene porte, inflamacija portnih prostora, masne hepatocitne promene, hiperplazija Kupferovih ćelija, novoformirani žučni duktusi i edem ćelije.
- c. biohemijske parametre u jetri i krvi

Utvrđivanje dejstva surutke i tikvinog ulja na ćelijskom nivou u hepatocitima, u toku intoksikacije alkoholom, ograničeno je izvodljivo na ljudima. Zato je i veoma malo literaturnih podataka koji o tome govore.

Akutna i hronična alkoholisanost predstavlja veliki sociološki i zdravstveni problem koji je povezan kako sa kvalitetom života i smanjenom radnom sposobnošću konzumenata, tako i sa velikim ekonomskim izdacima za dugotrajne i skupe a ponekad i neefikasne terapije u lečenju oštećene jetre. Poseban izazov svakako predstavlja istraživanje uticaja prirodnih supstanci ili produkata iz hrane koji se tradicionalno već stotinama godina koriste u narodnoj medicini a koji bi eventualno mogli delovati preventivno ili potpomoći u saniranju ili ublažavanju nastalih hepatičnih lezija. Eksperimentalna potvrda njihovih efekata na jetrino tkivo na molekularnom nivou i eventualno određivanje njihove efikasne doze, predstavljala bi značajan doprinos u rasvetljavanju njene uloge na ćelijskom nivou i dale adekvatne dijetetske preporuke kod osoba sa hepatičnim lezijama. Kako ovo istraživanje nije moguće sprovesti u humanoj populaciji, opravdano je bilo sprovesti ga na eksperimentalnim životinjama (pacovima). One su u ovom slučaju dobar model za ekstrapolaciju rezultata na ljude, jer postoji velika genetska sličnost citohroma u jetri čoveka (CYP2C9 - trivijalni naziv P-450MP-1) sa pacovskim. Primarna struktura citohroma P-450 reduktaze čoveka i pacova je znatnim delom identična, dok im se katalitičke aktivnosti dosta razlikuju.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Eksperimentalno istraživanje je obavljeno:

1. U centru za biomedicinska ispitivanja, Instituta za istraživanje i razvoj Galenike a.d.
2. Na medicinskom fakultetu u Prištini (sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici).
3. Na odeljenju za fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu.
4. U laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu.

4.1. Ogledne životinje

Istraživanje je sprovedeno na polno zrelim mužjacima Wistar pacova, starosti 9-11 nedelja, telesne mase 200-220 g, koji su namenski odgojeni u Vivarijumu Centra za biomedicinska ispitivanja, Instituta za istraživanje i razvoj Galenike a.d. Životinje su od početka eksperimenta boravile u standardnim kavezima, u svakom po tri životinje, na stalnoj sobnoj temperaturi $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, sa cirkadijalnim ritmom dan/noć (12 sati dan/12 sati noć), hranjene standardnom hranom za laboratorijske životinje proizvedenom u Veterinarskom institutu Zemun. Sve životinje tretirane su po principima međunarodne deklaracije o životinjama (Guide for care and Use of Laboratory Animals, Nih publication N°85-23), a pre početka oglada dobijena je saglasnost i mišljenje etičke komisije o opravdanosti obavljanja ovog ispitivanja i rešenje o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama od Ministarstva Poljoprivrede i zaštite životne sredine-Uprava za veterinu Republike Srbije, **br.119-01-13/29/2015-09 od 01.12.2015.g**

4.2. Plan rada

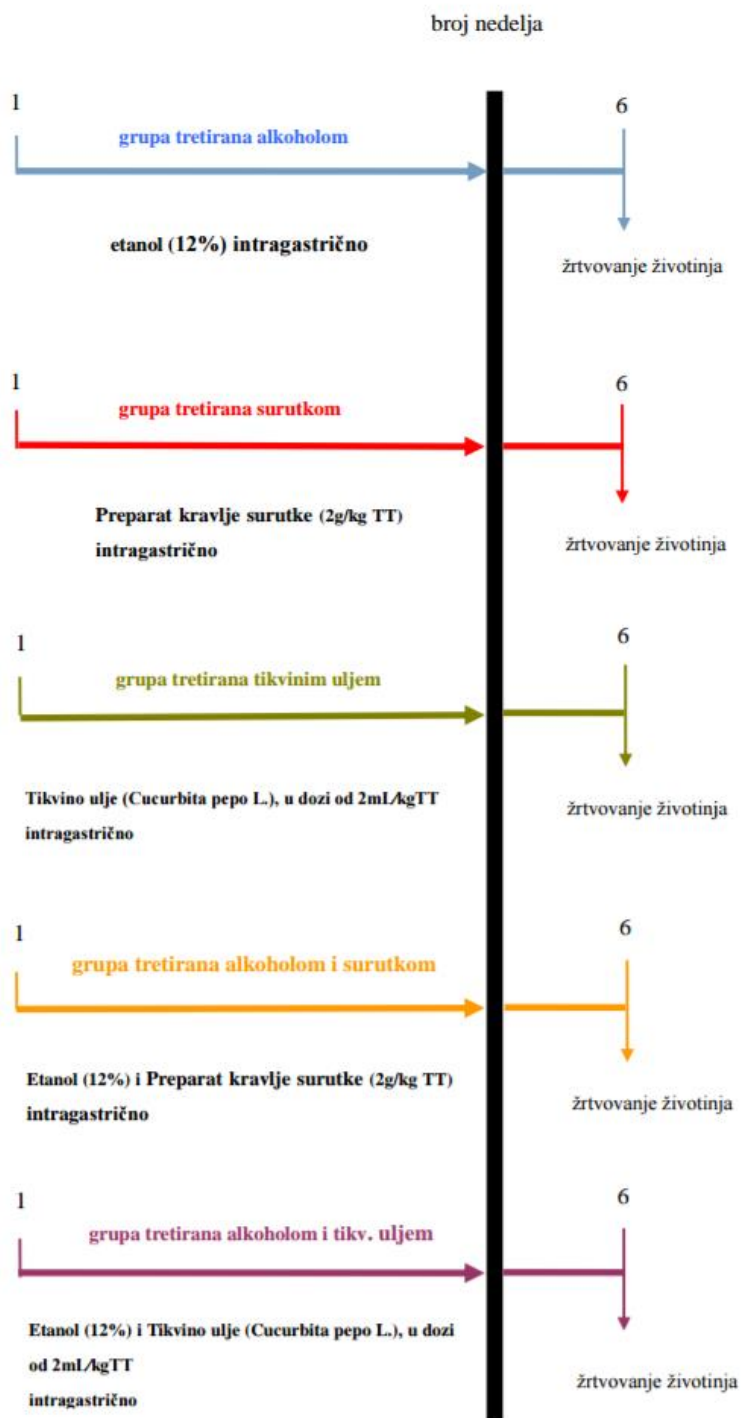
Sve ogleadne životinje pile su 12 % etanol adlibitum (etanol absoluta "Merck" 99% razblažen destilovanom vodom) u toku 6 nedelja.

Ispitivane supstance primenjivane su intragastričnom sondom svakodnevno, jednom dnevno, uvek u 9 sati pre podne, kontinuirano u toku 6 nedelja, i to: 1) preparat kravlje surutke i 2) komercijalno ulje dobijeno iz semena tikve (*Cucurbita pepo* L.), u dozama koje su određene na osnovu prosečnog poznatog dnevnog unosa surutke i tikvinog ulja u dijete, ekstrapolirane prema dnevnom unosu suve hrane sa čoveka na pacova, odnosno preko "metaboličke mase" i bile su bliske dozama koje su ranije ispitivane na pacovima u drugim eksperimentalnim modelima (hipertenzije, hiperlipidemije, imunodeficijencije, tumora, eradikacije *Helicobaktera pylori*).

Životinje su bile razvrstane u grupe, prema vrsti ispitivane supstance i kontrolnu grupu životinja koja se nije izlagala stresu.

Plan rada, grafički je prikazan na shemi 1.

Shema 1. Grafički prikaz plana rada



4.3. Ogladne grupe životinja

Životinje su prema načinu i vrsti primenjenih supstanci bile podeljene u šest grupa, od po 6 životinja:

- I grupa: kontrolna, zdrave životinje koje nisu tretirane;
- II grupa: životinje koje su tetirane etanolom u toku 6 nedelja;
- III grupa: životinje koje su tetirane sa surutkom oko 2g/kg TT;
- IV grupa: životinje koje su tetirane sa tikvinim uljem 2mL/kg TT;
- V grupa: životinje koje su tretirane alkoholom i surutkom;
- VI grupa: životinje koje su tretirane alkoholom i tikvinim uljem.

4.4. Supstance primenjene u toku oglada

U toku oglada ispitivan je uticaj sledećih supstanci na biohemijske, patohistološke i genetske promene na jetri Wistar pacova:

1. Etanol 12 % (Etanol absoluta 99% "Merck") razblažen destilovanom vodom), svakodnevno ad libitum u toku 6 nedelja.
2. Surutka, u dozi od oko 2g/kg TT, svakodnevno jednokratno intragastričnom sondom, u toku 6 nedelja.
3. Tikvino ulje (Cucurbita pepo L.), u dozi od 2mL/kgTT, svakodnevno, jednokratno intragastričnom sondom, u toku 6 nedelja.

4.5. Način uzimanja uzoraka

Sve životinje su nakon tretmana žrtvovane, pri čemu su neposredno pre žrtvovanja anestetizirane intraperitonealnim davanjem ketamina. Uzeta je krv za biohemijske

analize, a zatim im je otvaran abdomen i odvajana jetra za dalje analize, izvršena je preparacija jetre, posle čega je sledilo merenje njene mase i makroskopski pregled, kao i priprema uzoraka tkiva jetre za histopatološke i biohemijske analize. Nakon žrtvovanja, jetre životinja iz svake grupe su bile perfundovane hladnim PBS puferom in situ, pažljivo isečene i zamrznute (-70°C) za dalje analize. Koncentracija etanola u krvi merena je gasnom hromatografijom sa *headspace* tehnikom GC-FID.

4.6. Histopatologija uzoraka

Iz jetre svih eksperimentalnih životinja uzeti su isečci za rutinsku histopatološku analizu i stavljeni u 4%-ni rastvor puferizovanog formalina. Nakon fiksacije u formalinu, tkivo je kalupljeno u parafinskim blokovima, rezano na mikrotomu u više preseka na tanke preseke (5-10 mikrona).

Potom je sledilo deparafinisanje i bojenje preparata rutinskom hematoksilin-eozin metodom (HE). Bojenje tkiva ovom metodom obavlja se na sledeći način:

1. Deparafinisani rezovi se dopremiju do vode
2. Bojenje se izvodi u rastvoru hematoksilina oko 15 min
3. Ispiranje se vrši u tekućoj vodi
4. Ispira se zatim u kiselom alkoholu
5. Ponovo se ispira Bojenje se izvodi u rastvoru eozina oko 2 min
6. Dehidrira se u apsolutnom alkoholu
7. Preparatu se dodaje ksilol i balzam
8. Preparat se na kraju poklapa pokrovnom ljušpicom

4.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzimska tkiva jetre

4.7.1. Priprema homogenata jetre za analizu

Nakon brzog odmrzavanja i merenja mase, uzorcima je dodat hladni saharozni pufer (0.25 M saharoza, 0.05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) u odnosu 1:10. Tkiva su zatim homogenizovana na ledu 3 x 10 sekundi, sa pauzama od po 10 sekundi, a potom i sonifikovana 3 x 15 sekundi, sa pauzama po 15 sekundi na frekvenciji od 10 KHz. Ovako tretirani uzorci su centrifugirani 90 min. na 37500 rpm. Nakon centrifugiranja odvajanje supernatant i čuvan na -70°C.

4.7.2. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina korišćena je metoda po Loriju (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji kupri (Cu II) jona i peptidnih veza ispitivanih proteina u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens), sa aromatičnim aminokiselinama tirozinom i triptofanom prisutnim u ispitivanom uzorku. Kao rezultat ovih reakcija nastaje plavo obojeni kompleks, čiji se maksimum apsorpcije očitavao spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 500 nm.

4.7.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza je određivana adrenalinskom metodom koju su uspostavili (Misra i Fridovich, 1972). Prisutna SOD uklanja O_2^- i pri tome inhibira reakciju autooksidacije adrenalina. Brzina autooksidacije adrenalina pratila se

spektrofotometrijski preko promene apsorbance na 480 nm.. Brzina autooksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dela porasta apsorbance. Procenat inhibicije koristio se kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima uzima se kao referentna vrednost, a brzina autooksidacije u prisustvu SOD-a, odnosno uzorka je manja od referentne vrednosti. Procenat inhibicija autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD-a iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti.

Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina (U/mg proteina). Jedinica SOD aktivnosti definisana je kao količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorbance.

4.7.4. Određivanje aktivnosti MnSOD i CuZnSOD

Princip određivanja aktivnosti MnSOD je isti kao pri određivanju ukupne aktivnosti SOD, osim što je potrebno blokirati aktivnost CuZnSOD. To smo postigli inkubacijom uzoraka sa KCN (8 mM) u odnosu 1:1 u trajanju od 30 min. Takođe je bilo potrebno dodati veću količinu uzorka jer MnSOD čini svega 5-10% ukupne aktivnosti. (Misra i Fridovich, 1972). Vrednost CuZnSOD dobili smo oduzimanjem aktivnosti MnSOD od ukupne aktivnosti SOD.

4.7.5. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze je određivana metodom po Beutler-u (Beutler, 1982). Vodonik peroksid ima maksimum apsorpcije na 240 nm, pa smo aktivnost CAT merili praćenjem razlaganja H₂O₂, odnosno padom apsorbance pri datoj talasnoj dužini. Pad apsorbance pratili smo u roku od 3 minuta (5 merenja na po 30 sec.). Specifična aktivnost CAT izražena je jedinicom U/mg proteina.

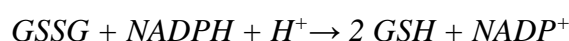
4.7.6. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)

Za određivanje aktivnosti GSH-Px u supernatantu tkiva koristili smo modifikovanu metodu (Paglie i Valentina, 1967). Princip metode koristi osobinu glutation peroksidaze da katališe oksidaciju redukovanog glutationa (GSH) u oksidovani glutation (GSSG), uz redukciju velikog broja molekula hidroperoksida. Oksidovani glutation se zatim ponovo redukuje do GSH uz NADPH (kao donora vodonika), i glutation reduktazu (GR) koja katališe ovu reakciju.

Aktivnost GSH-Px se pratila posredno određivanjem potrošnje NADPH, odnosno oksidacije NADPH uz GR na 340nm. Aktivnost je izražena jedinicom nM NADPH/min/mg proteina.

4.7.7. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)

Glutation reduktaza katališe redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) uz oksidaciju NADPH.



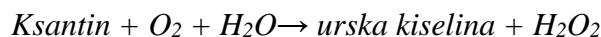
Aktivnost glutation reduktaze je određivana metodom (Glatzle i sar., 1974) Aktivnost GR se pratila preko brzine oksidacije NADPH, čiji je maksimum apsorbance bio na 340 nm. Aktivnost je izražena jedinicom nM NADPH/min/mg proteina.

4.7.8. Određivanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD)

Ksantin oksidaza je određivana praćenjem formiranja urske kiseline na 295 nm po metodi (Terada i sar., 1990).

Princip metode pri određivanju aktivnosti XOD bazira se na reakcijama koje katališe.

Ksantin oksidaza katališe sledeće dve reakcije:



Na osnovu dobijene standardne krive odredili smo aktivnost XOD u uzorcima.

4.7.9. TBARS - indeks lipidne peroksidacije

Indeks lipidne peroksidacije određivali smo metodom (Rehncora i sar., 1980) tako što se najpre tkivo homogenizuje sa Tris-EDTA puferom pH 7.4 u odnosu 1:10. Odmeri se 1.514g Tris (baznog) sa 0.093 g EDTA i rastvara se u 250 ml

Napravi se 0.6% TBA u 0.3 %NaOH.

Homogenizuje se, nakon toga se sonifikuje, pa se uzima 3x5s sa 30s pauze. Uzima se 350 µl sonifikata i dodaje se 116. 5 µl 40% TCA, promućka se na vorteksu. Centrifugira se na 10000 obrtaja 10 min.

- Uzima se 150 µl sonifikata i prebaci se u čistu ependorficu (radi se u duplikatu)
- Dodaje se 150 µl 0.6% TBA i promućka se.
- Inkubira se 10 min na 100°C u vodenom u kupatilu.
- Naliva se 2x125 µl po uzorku (uzorak u duplikatu)
- Meri se apsorbanca na 532 nm

Ekstincioni koeficijent za MDA je $\Delta A / 1.56 \times 10^5 \times R$ (u ovom slučaju 2x).

4.7.10. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH+GSSG)

Određivanje ukupnog glutationa izvodili smo prema postupku (Rahman i sar., 2006) Koncentracija ukupnog GSH u uzorku merili smo koristeći linearnu regresiju da bi se izračunale vrednosti sa standardne krive. Koncentracija je izražena u nm po mg proteina.

4.8. Biohemijske analize krvi

Analize biohemijskih parametara istraživanja rađene su na automatskom analizatoru COBAS INTEGRA 400 plus, (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), metodama komercijalnih laboratorijskih testova proizvođača Roche Diagnostic GmbH (Mannhem,Germany).

4.8.1. Određivanjealanin aminotransferaze (ALT)

Ovaj test se izvodili smo prema preporukama IFCC (Međunarodna federacija za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu), ali bez piridoksal-5'-fosfat. ALT katalizuje reakciju između L-alanina i 2-oksoglutarata. Formirani piruvat se redukuje sa NADH u reakciji koju katalizuje laktat dehidrogenaza (LDH) tako da formira L-laktat i NAD⁺.

L-alanin + 2-oksoglutarat → piruvat + L-glutamat

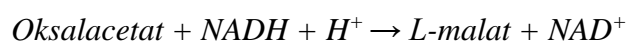
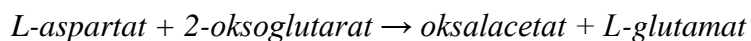
Piruvat + NADH + H⁺ →L- laktat + NAD⁺

Brzina oksidacije NADH direktno je proporcijalna katalitičkoj aktivnosti ALT. Odredili smo merenjem smanjenja apsorbancije na 340 nm.

4.8.2. Određivanje aspartat aminotransferaza (AST)

Ovaj test izvodili smo u skladu sa preporukama IFCC, bez piridoksal-5-fosfata.

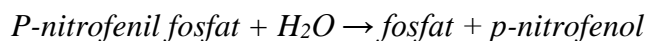
AST u uzorku katalizuje prenošenje amino grupe između L-aspartata i 2-oksoglutarata tako da formira oksalacetat i L-glutamat. Oksalacetat zatim reaguje sa NADH u prisustvu malat dehidrogenaze (MDH), tako da formira NAD⁺.



Brzina oksidacije NADH direktno je proporcijalna katalitičkoj aktivnosti AST, koja je određena merenjem smanjenja apsorpcije na 340 nm.

4.8.3. Određivanje alkalne fosfataze (ALP)

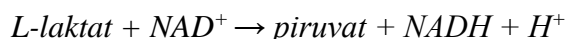
Alkalnu fosfatazu merili smo kolorimetrijskim testom u skladu sa standardizovanom metodom po preporukama IFCC. U prisustvu jona magnezijuma i cinka, p-nitrofenil razlaže se putem fosfataze na fosfat i p-nitrofenol.



Oslobođeni p-nitrofenol direktno je proporcionalan katalitičkoj aktivnosti ALP. Određuje se povećanjem apsorpcije pri 409 nm.

4.8.4. Određivanje laktat dehidrogenaze (LDH)

LDH merena je UV-testom prema preporukama IFCC. Laktat dehidrogenaza katalizuje konverziju L-laktata do piruvata; NAD⁺ se redukuje do NADH u ovom procesu.

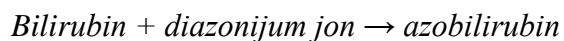


Početna brzina formiranja NADH je direktno proporcionalna katalitičkoj aktivnosti LDH. Odredili smo merenjem povećanja apsorpcije na 340 nm.

4.8.5. Određivanje ukupnog bilirubina

Za merenje koncentracije bilirubina koristili smo diazo metod.

Ukupni bilirubin, u prisustvu pogodnog agensa za rastvaranje, kupluje se diazonijum jonima u veoma kiseljoj sredini (pH 1-2) i formira azobilirubin.



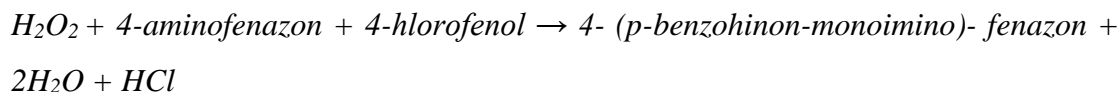
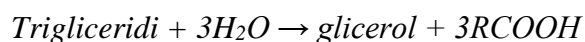
Intenzitet boje nastalog azobilirubina proporcionalan je koncentraciji ukupnog bilirubina meren je fotometrijski.

4.8.6. Određivanje triglicerida (TAG)

Koncentraciju TAG merili smo enzimskim kolorimetrijskim testom

Lipoproteinska lipaza hidrolizuje trigliceride u glicerol.

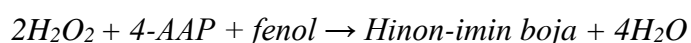
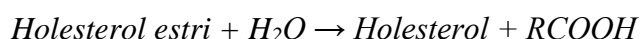
Fosforilacijom glicerola u glicerol-3-fosfat i njegovom oksidacijom pod dejstvom glicerolfosfat oksidaze u dihidroksi aceton fosfat, nastaje vodonik peroksid. Vodonik peroksid reaguje sa 4-aminofenazonom i 4-hlorofenolom pod dejstvom peroksidaze i formira se crveno obojeni 4-benzokinon-monoamino-fenazon čiji je intenzitet obojenosti direktno proporcionalan koncentraciji triglicerida u serumu.



4.8.7. Određivanje HDL- holesterola

HDL holesterol merili smo enzimskim kolorimetrijskim testom.

U prisustvu jona Mg i dekstran sulfata, formiraju se hidrosolubilni kompleksi sa LDL, VLDL i hilomikronima, i oni su rezistentni na dejstvo enzima modifikovanih sa PEG. Koncentracija HDL holesterola odredili smo enzimski, pomoću holesterol esteraze i holesterol oksidaze spojenih sa PEG preko amino grupa. Holesterol estri se razgrađuju kvantitativno na slobodni holesterol i masne kiseline, dejstvom holesterol esteraze. U prisustvu kiseonika, holesterol se oksiduje pod dejstvom holesterol oksidaze na 4-holestenon i vodonik-peroksid.

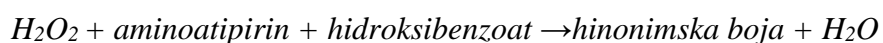
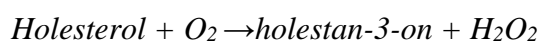


Intenzitet formirane boje direktno je proporcionalan koncentraciji HDL-holesterola. Određeno je merenjem povećanja apsorbancije na 583 nm.

4.8.8. Određivanje ukupnog holesterola

Ukupni holesterol odredili smo CHOD-PAP metodom.

Holesterol se u plazmi (serumu) nalazi uglavnom u obliku holesterol estara. U komercijalnom reagensu za određivanje koncentracije holesterola nalazi se nekoliko enzima koji najpre hidrolizuju estarsku vezu i oslobađaju holesterol, a zatim u nekoliko reakcija dovode do stvaranja obojenog jedinjenja nizom sledećih reakcija: Holesterol esteraza hidrolizuje estre holesterola, slobodan holesterol se oksiduje u holestenon i oslobađa se vodonik peroksid, a zatim vodonik peroksid reaguje 4-amino antipirinom i p-hidroksibenzoatom i daje hinonimsku boju. Intenzitet boje je direktno proporcionalan koncentraciji holesterola odnosno estara holesterola.



4.8.9. Određivanje LDL- holesterola

Koncentraciju LDL-holesterola izračunali smo oduzimanjem koncentracije HDL-holesterola i triacilglicerola od koncentracije ukupnog holesterola.

4.8.10. Određivanje indeksa ateroskleroze

Indeks ateroskleroze određen je računskom metodom kao količnik koncentracija LDL i HDL holesterola (indeks ateroskleroze = LDL holesterol / HDL holesterol).

4.9. Western blot analiza

4.9.1. Priprema tkiva jetre za western blot analizu

Nakon brzog odmrzavanja i merenja mase uzorci jetre su homogenizovani (1:4 = masa tkiva:zapremina homogenizacionog pufera) u 10 mM Tris HCl pH 7.4 pufera (koji sadrži 0.32 M saharoze, 5 mM MgCl₂ i 10 mM PMSF) na 4°C, koristeći Potter-Elvehjem homogenizer. Homogenat je liziran 1% Tritonom X-100 tokom 2 sata (sa čestim vorteksovanjem) u samom puferu i lizat je zatim centrifugiran na 12 000 rpm tokom 15 minuta na 4 °C da bi se dobio supernatant, koji je korišćen kao ukupni ekstrakt ćelija jetre. (Đorđević i sar., 2010)

4.9.1. Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim frakcijama

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je metodom po Loriju (Lowry i saradnici, 1951). Ova metoda se koristi kada je očekivana koncentracija proteina u uzorku u opsegu od 5 g/ml do 50 g/ml. Standard za određivanje koncentracije proteina bio je goveđi serum albumin (BSA), od koga se pripremao stok rastvor koncentracije 50 g/ml.

4.9.2. Separacija proteina metodom SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Nakon određivanja koncentracije proteina u ćelijskim frakcijama, alikvoti uzoraka su pomešani sa denaturišućim puferom prema Lemmliju i kuvani su 5 min. na 100°C (Laemmli, 1970).

Posle kuvanja uzorci su ohlađeni i nanošeni na SDS–poliakrilamidni gel. Proteini su razdvajani na 7.5% gelovima koji su pripremani na aparatu Mini Protein Electrophoresis Cell (Bio-Rad) po modifikovanom Lemlijevom protokolu za gel.

Proteini su razdvajani prema molekularnoj masi. SDS (eng. Sodium dodecil sulphat) je anjonski deterdžent koji se vezuje za proteine, menjajući im izolektričnu tačku. Proteini su razdvajani u puferu za elektroforezu koji sadrži 0.25 M TRIS bazu, 0.192 M glicin i 0.1% SDS, 1.5 h pri konstantnom naponu od 100 V. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za Western blot analizu.

4.9.3. Western blot analiza proteina

Nakon razdvajanja proteina pomoću SDS-PAGE, proteini su prebačeni na polivinilidendifluorid (PVDF) membranu (Immobilon-P membrane, Millipore) korišćenjem blot sistema (Transblot, BioRad). Membrane su potom inkubirane u puferu za blokiranje PBS-u koji sadrži 5% mleko 1 h na sobnoj temperaturi, nakon čega su ostavljane u primarnom antitelu preko noći na 4°C. Za detekciju proteina korišćena su sledeća primarna antitela: Zečije poliklonsko anti- β -aktin antitelo (ab8227, Abcam) je iskorišćeno da se detektuje β -aktin, anti-MnSOD (Stressgen), anti-CuZnSOD (Stressgen), anti-katalaza (Calbiochem), anti-GPx (Santa Cruz Biotechnology), anti-glutation reduktaza (Santa Cruz Biotechnology), anti-NFkB (Santa Cruz Biotechnology) and anti-GR (Santa Cruz 6 Biotechnology) su iskorišćeni da se detektuju MnSOD, CuZnSOD, CAT, GSH-Px, GLR, NFkB and GR. i anti-p53 za p53. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane 3 x 10 min u PBST puferu. Nakon poslednjeg ispiranja membrane su inkubirane sa sekundarnim

antitelima 2 h: Zečijim IgG, HRP-konjugovanim antitelom (poliklonsko) i ECL (od eng. enhanced luminol-based chemiluminescent) mišjim IgG i HRP-konjugovanim antitelom (Amersham). Posle inkubacije sa sekundarnim antitelima, ponovljeno je ispiranje membrane 3 x 10 min u PBST puferu. Blotovi su razvijeni korišćenjem ECL-a, a intenzitet proteinskih traka je analiziran ImageJ softverom.

4.10. Statistička obrada podataka

Statističkom obradom podataka je ispitana značajnost razlika između vrednosti parametara ispitivanih kod različitih grupa. Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti izmerenih parametara između određenih grupa korišćeni su X^2 -test, Kruskal-Wallis-test, one-way ANOVA, two-way ANOVA, three-way ANOVA i post-hok testovi (Tukey-jev test, Duncan Multiple range test i Fishers LSD test). Nivo statističke značajnosti za sve testove je bio $p < 0,05$.

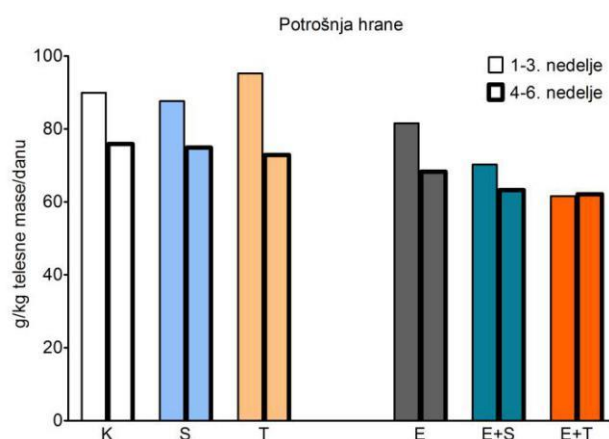
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

U toku ovog istraživanja određivani su pokazatelji patohistoloških promena jetre, relevantni serumski biohemijski parametri za procenu stanja jetre kao i efekti antioksidativne zaštite merenjem aktivnosti enzima i određivanje količine proteina (Western blot) pokazatelja oksidativnog stresa.

5.1. Potrošnja hrane i vode, koncentracija etanola u krvi i butnom mišiću i promena telesne mase po nedeljama

5.1.1. Potrošnja hrane

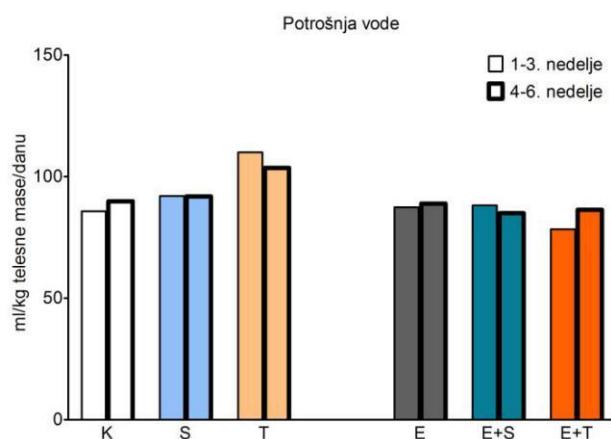
Potrošnja hrane po nedeljama u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 1. Na osnovu grafikona vidimo da je potrošnja hrane veća u ne-etanolskim (K,S,T) i iznosi 95,47 g/kg TT/danu u odnosu na etanolske grupe (E, E+S i E+T) gde je potrošnja 67,82 g/kg TT/danu, takođe vidimo i da je potrošnja hrane opadala u poslednje tri nedelje kod svih grupa životinja i iznosila je 69,52 g/kg TT/danu.



Grafikon 1. Potrošnja hrane (g/kg telesne mase/danu) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.5.2. Potrošnja vode

Potrošnja vode po nedeljama u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 2. Na osnovu grafikona uočavamo da je potrošnja vode gotovo ujednačena (90,52 ml/kg TT) u svim grupama životinja, osim u grupi tretiranoj tikvinim uljem (T) gde je potrošnja vode veća u odnosu na sve ostale grupe i iznosi 106,75 ml/kg TT. Takođe se vidi da je potrošnja vode približno ista u prve i poslednje tri nedelje, s tim što je u prvoj nedelji potrošnja vode bila manja kod etanolskih grupa životinja.

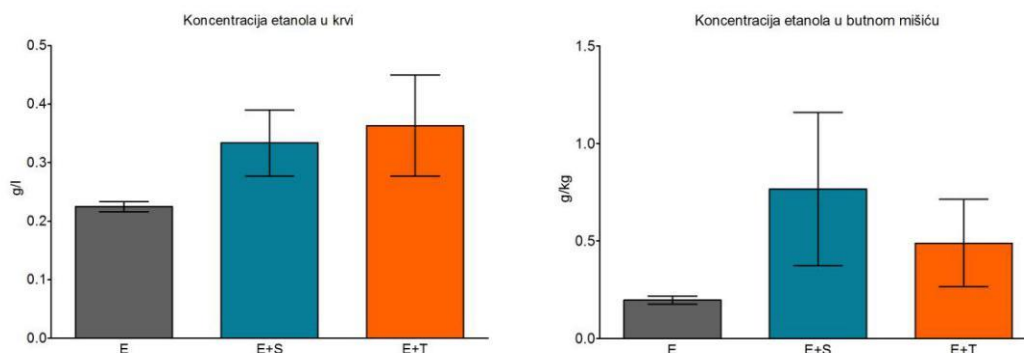


Grafikon 2. Potrošnja vode (mL/kg telesne mase/danu) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol , E+S- etanol i surutka , E+T- etanol i tikvino ulje)

5.5.3. Koncentracija etanola u krvi i butnom mišiću

Koncentracije etanola u krvi i butnom mišiću u grupama životinja koje su tretirane samo etanolom (E) i etanolom u kombinaciji sa surutkom i tikvinim uljem (E+S) i (E+T) prikazane su na grafikonu 3 i 4. Koncentracija etanola u krvi najveća je u grupi koja je tretirana etanolom i tikvinim uljem i iznosi 0,372 g/L (E+T), zatim sledi grupa tretirana etanolom i surutkom čija vrednost iznosi 0,331 g/L (E+S), dok je najmanja koncentracija zabeležena u grupi kojoj je davan samo etanol i iznosi 0,254

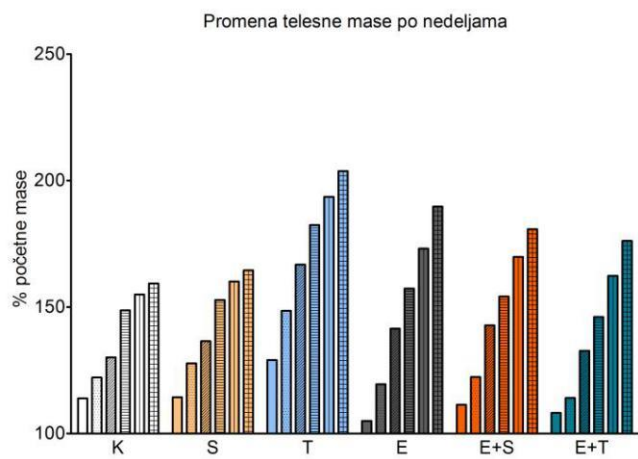
g/L. Koncentracija etanola u butnom mišiću najveća je u grupi tretiranoj etanolom i surutkom (E+S) i iznosi 0,860 g/L, zatim u grupi tretiranoj etanolom i tikvinim uljem (E+T) i iznosi 0,559 g/L, dok je najmanja koncentracija zabeležena u grupi kojoj je davan samo etanol (E) i iznosi 0,256 g/L. Između izmerenih koncentracija etanola u krvi i butnom mišiću ne postoji statistička značajnost.



Grafikoni 3 i 4. Koncentracija etanola u krvi i butnom mišiću (g/l) kod E, E+S i E+T grupe životinja (E-etanol, E+S- etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

5.5.4. Promena telesne mase po nedeljama

Promena telesne mase po nedeljama u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 5. Na osnovu grafikona uočava se da je porast telesne mase zabeležen u svim grupama životinja sa promenom od prve do šeste nedelje trajanja eksperimenta. Najveći porast mase uočen je u grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem i iznosi 103,77 % od početne telesne mase, a potom slede grupe tretirane etanolom (E) (89,73% od početne telesne mase), etanolom i surutkom (E+S) (80,82% početne telesne mase) i etanolom i tikvinim uljem (E+T) (76,16% početne telesne mase).



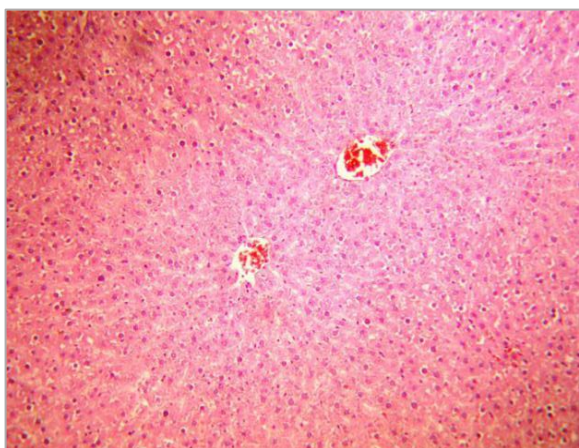
Grafikon 5. Promena telesne mase po nedeljama kod kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.2. Rezultati histopatološke analize jetre

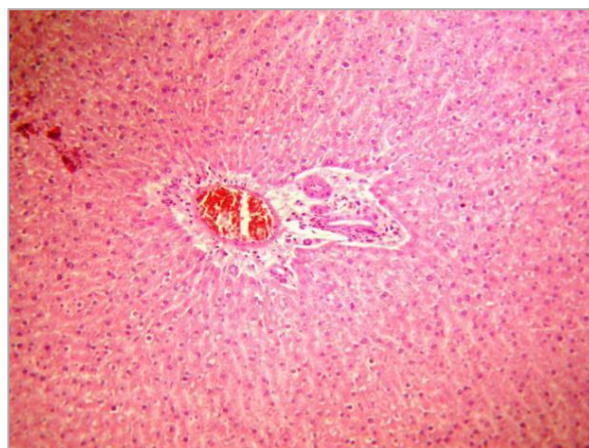
Prilikom istraživanja, u jetri pacova, makroskopski nisu bile primećene promene, a mikroskopski histopatologija jetre pokazala je različite promene u zavisnosti od vrste supstanci kojima su životinje bile tretirane.

5.2.1. Kontrolna grupa životinja

Kontrolnu grupu životinja činile su životinje koje nisu bile tretirane (zdrave). Histopatološki nalaz pokazuje normalnu građu jetre (slike: 1 i 2).



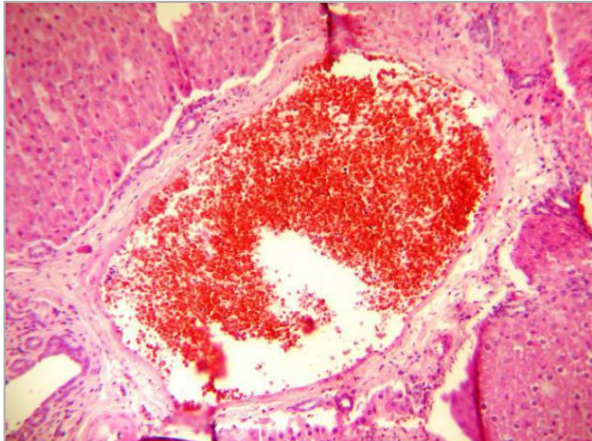
Slika 1. Normalna građa jetre kontrolne grupe; v. centralis u sredini i trabekularni raspored hepatocita (HE, 100x).



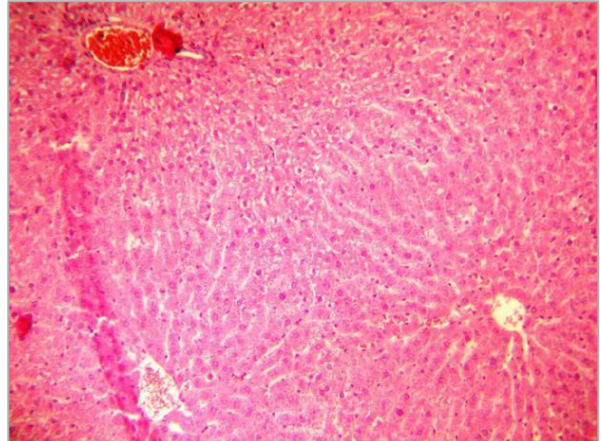
Slika 2. Normalna građa jetre kontrolne grupe; portni prostor (HE, 100x).

5.2.2. Životinje tretirane alkoholom

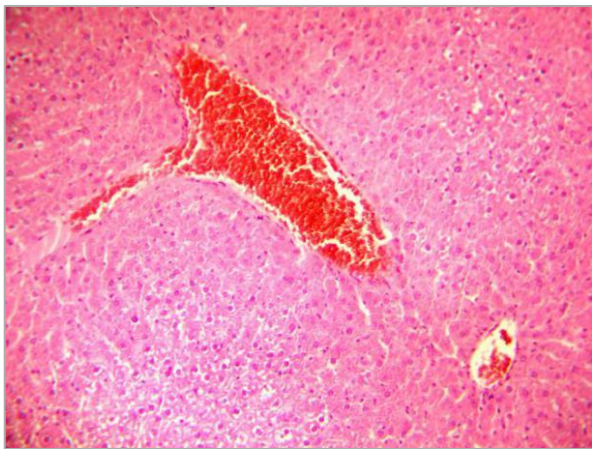
Životinje koje su tretirane alkoholom pokazuju sledeće histopatološke promene: veoma izraženu dilataciju grane v. portae i izraženu do veoma izraženu kongestiju, fokalne nekroze hepatocita sa diskretnim do umerenih masnih promena i sa uočljivom neutrofilnom infiltracijom, umerenu infiltraciju portnog prostora limfocitima i plazmocitima i hiperplaziju Kupferovih ćelija, koja se kreće od umerene do izražene (slike:3-11).



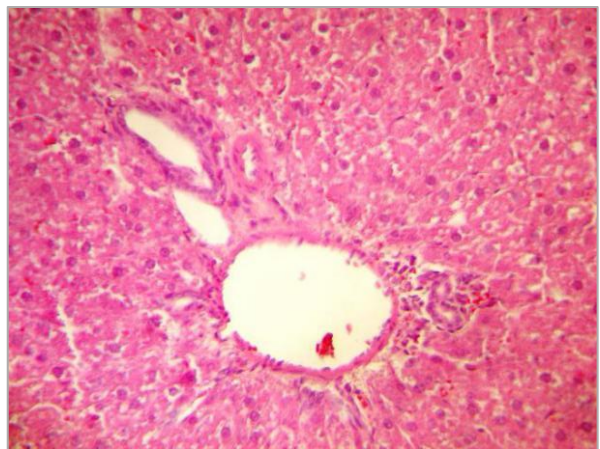
Slika 3. Veoma izražena dilatacija grane v. portae i izražena kongestija; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 100x).



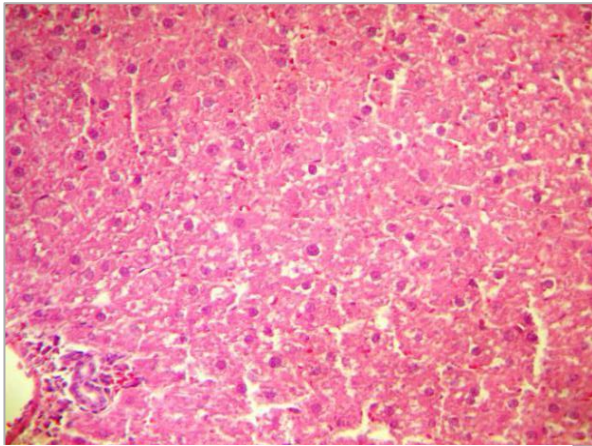
Slika 4. Fokalne nekroze hepatocita i diskretne masne promene; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 100x).



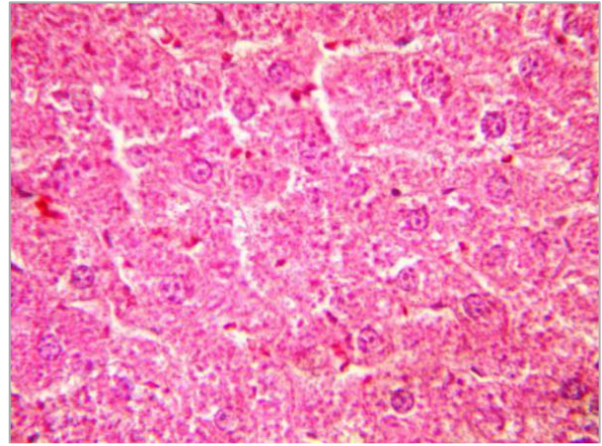
Slika 5. Umerene masne promene i veoma izražena kongestija; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 100x).



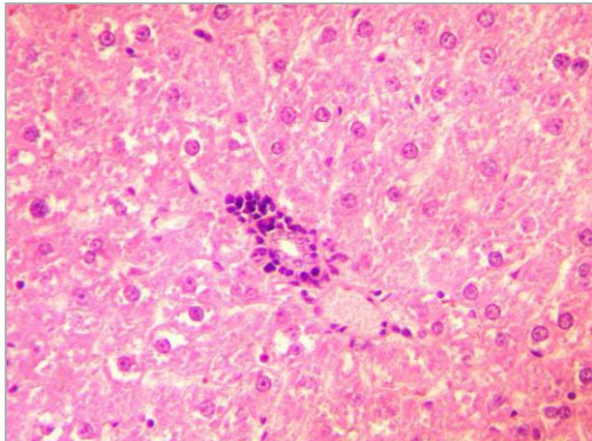
Slika 6. Umerena infiltracija portnog prostora limfocitima i plazmocitima; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 200x).



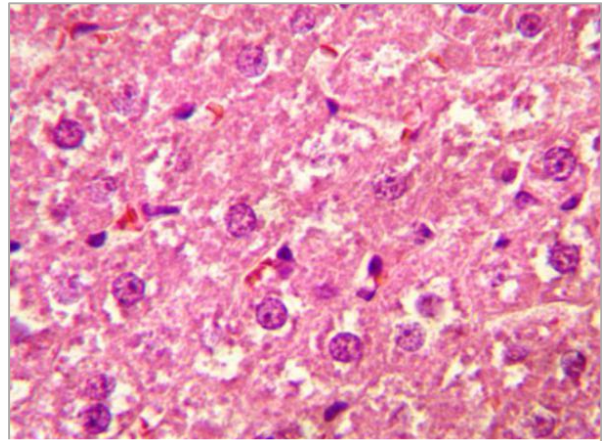
Slika 7. Izražena hiperplazija Kupferovih ćelija; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 200x).



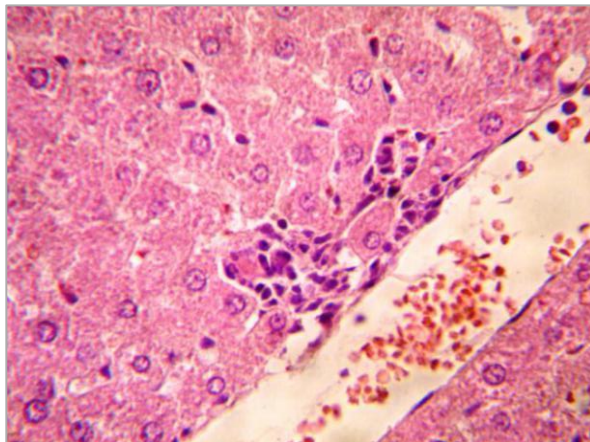
Slika 8. Fokalna nekroza hepatocita i umerena hiperplazija Kupferovih ćelija; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 400x).



Slika 9. Umerena infiltracija portnog prostora limfocitima i plazmocitima; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 200x).



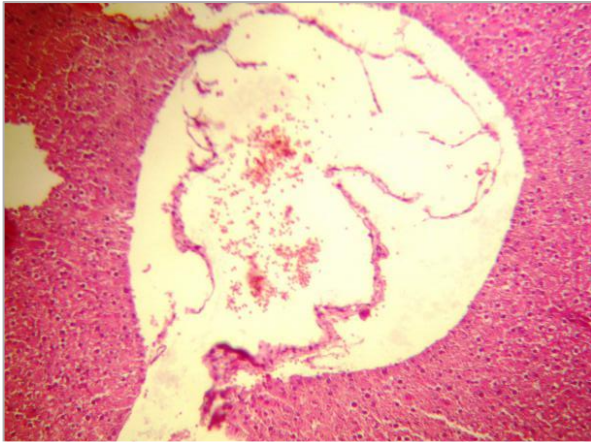
Slika 10. Umerena hiperplazija Kupferovih ćelija; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 400x).



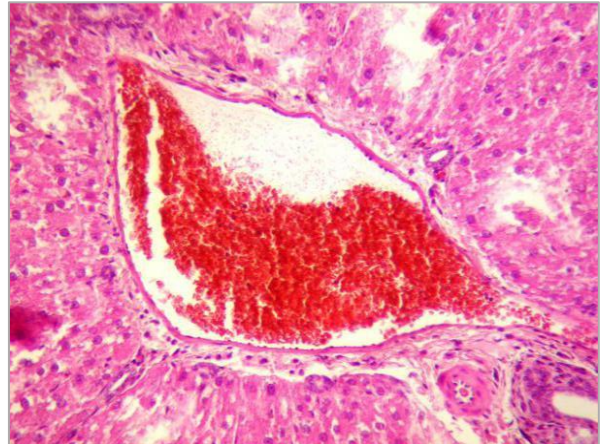
Slika 11. Fokalna nekroza hepatocita sa neutrofilnom infiltracijom; jetra životinje tretirane etanolom (HE, 400x).

5.2.3. Životinje tretirane surutkom

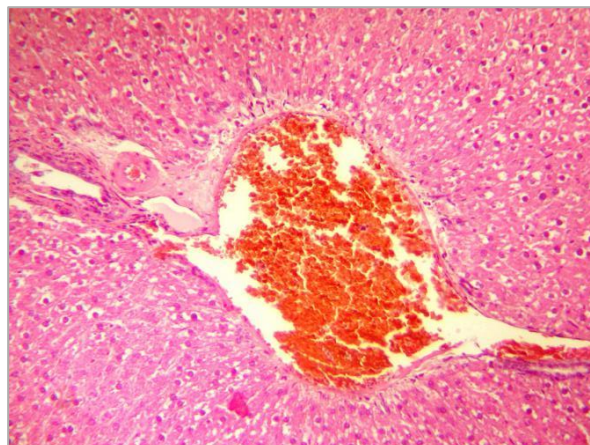
Životinje tretirane surutkom pokazuju izraženu kongestiju grane v. portae, kao i dilataciju centralne vene sa diskretnom kongestijom i diskretan edem hepatocita (slike: 12, 13, 14).



Slika 12. Dilatacija centralne vene sa diskretnom kongestijom i diskretan edem hepatocita; jetra životinje tretirane surutkom (HE, 100).



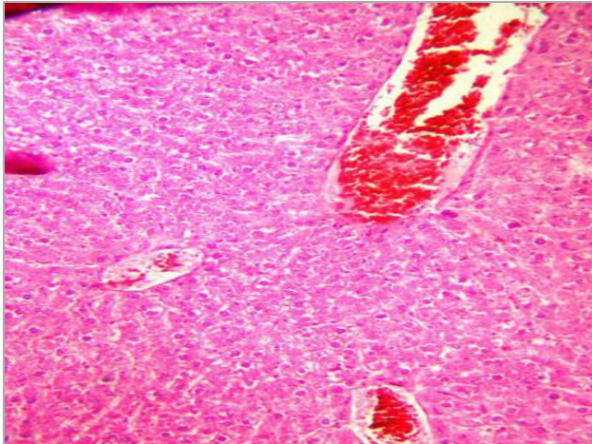
Slika 13. Izražena kongestija grane v. portae; jetra životinje tretirane surutkom (HE, 200x).



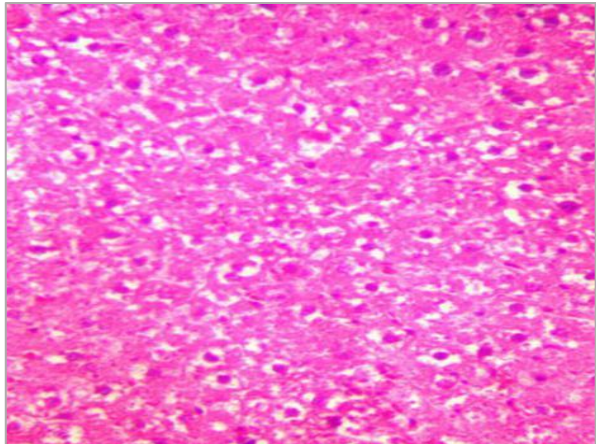
Slika 14. Izražena kongestija grane v. portae i umeren edem hepatocita; jetra životinje tretirane surutkom (HE, 100x).

5.2.4. Životinje tretirane tikvinim uljem

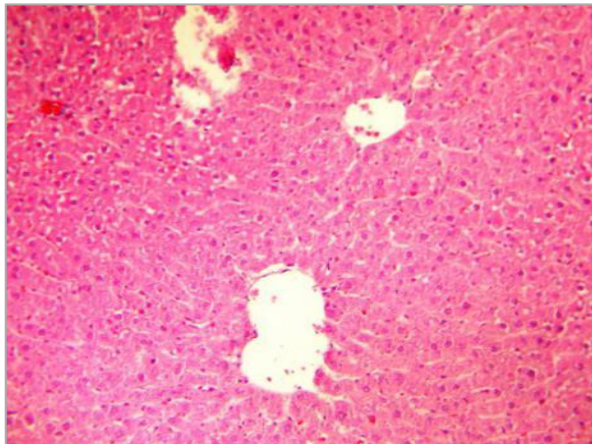
Kod životinja koje su tretirane tikvinim uljem histopatološki se uočava umeren do veoma izražen edem hepatocita. Veoma izražena kongestija centralne vene i grane v. portae i umerena dilatacija centralne vene (slike: 15, 16, 17, 18 i 19).



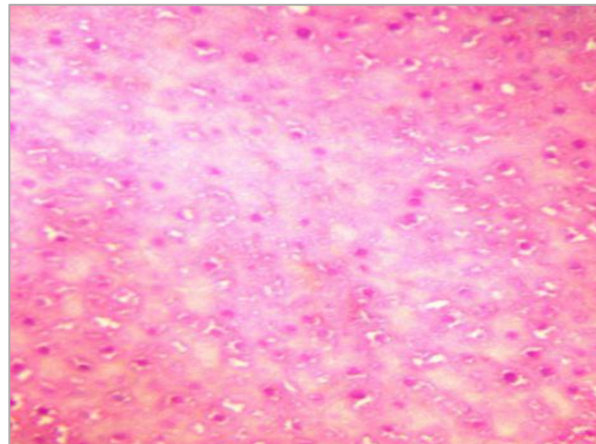
Slika 15. Veoma izražena kongestija centralne vene i grane v. portae; jetra životinje tretirane tikvinim uljem (HE, 100x).



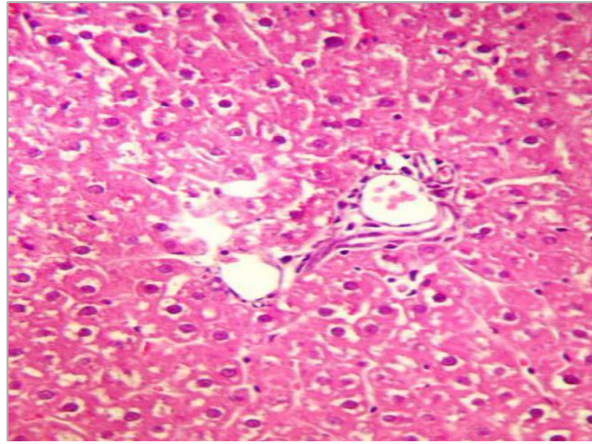
Slika 16. Izražen edem hepatocita; jetra životinje tretirane tikvinim uljem (HE, 200x).



Slika 17. Umerena dilatacija centralne vene; jetra životinje tretirane tikvinim uljem (HE, 100x).



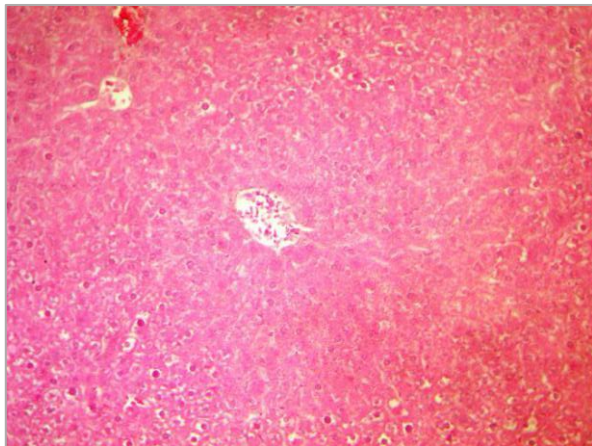
Slika 18. Umeren edem hepatocita; jetra životinje tretirane tikvinim uljem (HE, 200x).



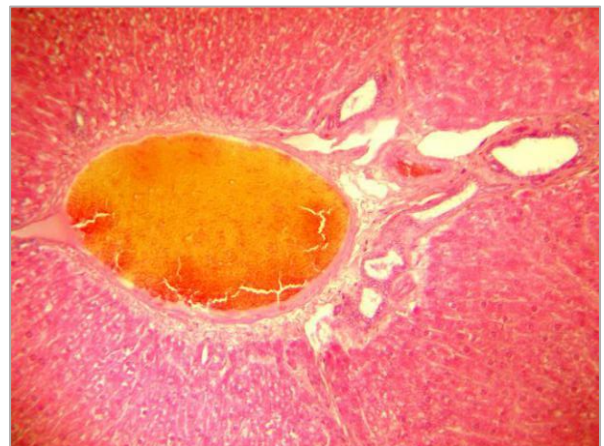
Slika 19. Veoma izražen edem hepatocita; jetra životinje tretirane tikvinim uljem (HE, 200x).

5.2.5. Životinje tretirane alkoholom i surutkom

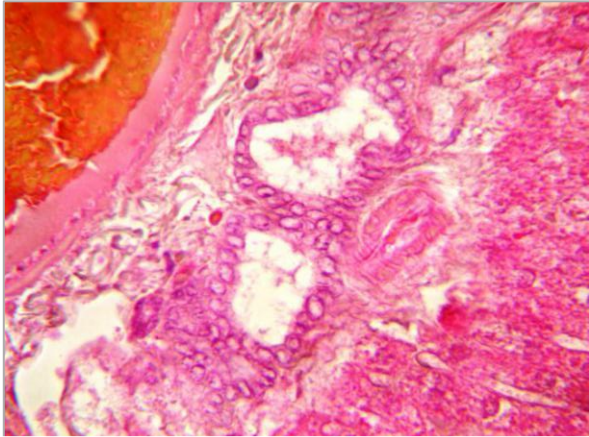
Jetre životinja tretirane alkoholom i surutkom pokazuju fokalnu nekrozu hepatocita u zoni 3 acinusa (oko centralne vene). Novoformirani žučni duktulusi su izraženi. Diskretna inflamacija portnog prostora i diskretna hiperplazija Kupferovih ćelija. Uočava se i umerena dilatacija i kongestija centralne vene (slike: 20-25).



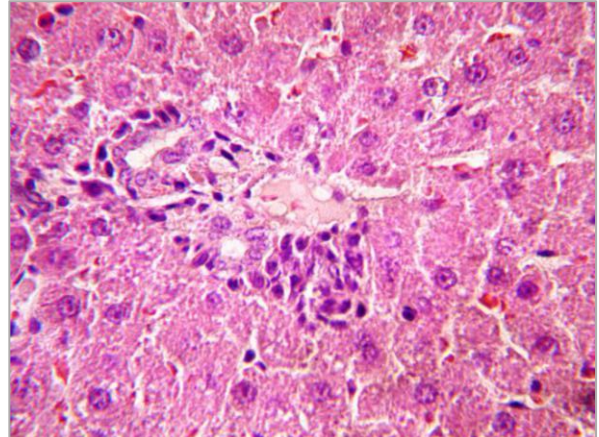
Slika 20. Fokalna nekroza hepatocita u zoni 3 acinusa (oko centralne vene); jetra životinje tretirane etanolom i surutkom (HE, 200x).



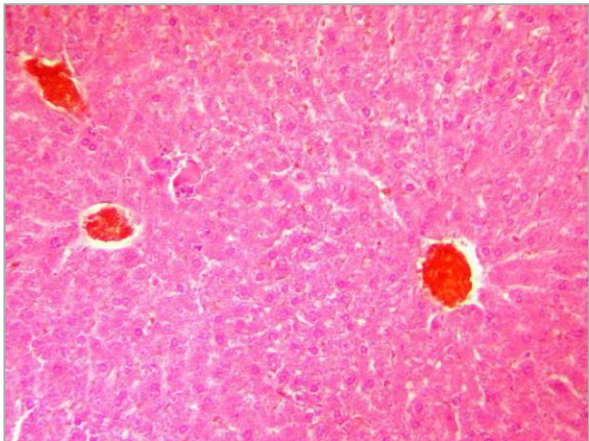
Slika 21. Izraženi novoformirani žučni duktulusi; jetra životinje tretirane etanolom i surutkom (HE, 100x).



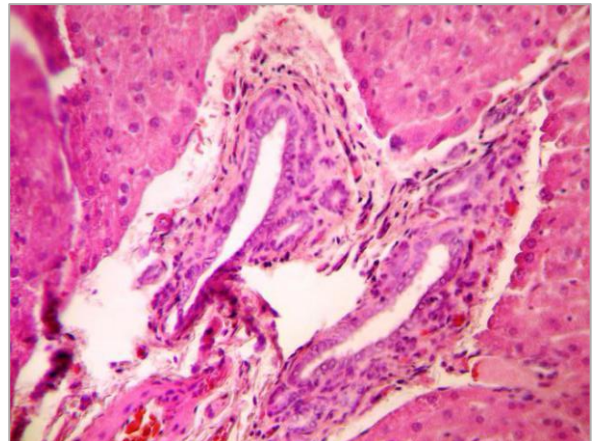
Slika 22. Izraženi novoformirani žučni duktulusi, detalj sa prethodne slike; jetra životinje tretirane etanolom i surutkom (HE, 400x).



Slika 23. Diskretna inflamacija portnog prostora i diskretna hiperplazija Kupferovih ćelija; jetra životinje tretirane etanolom i surutkom (HE, 400x).



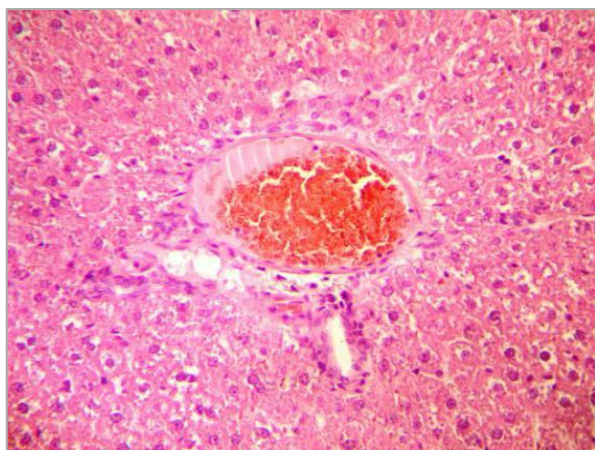
Slika 24. Umerena dilatacija i kongestija centralne vene; jetra životinje tretirane etanolom i surutkom (HE, 100x).



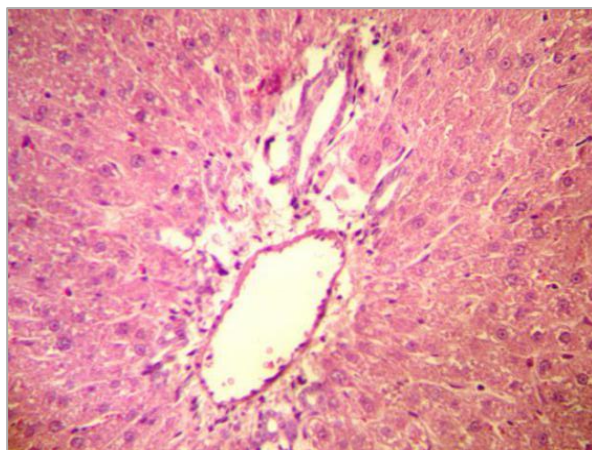
Slika 25. Umereno izraženi novoformirani žučni duktulusi; jetra životinje tretirane etanolom i surutkom (HE, 200x).

5.2.6. Životinje tretirane alkoholom i tikvinim uljem

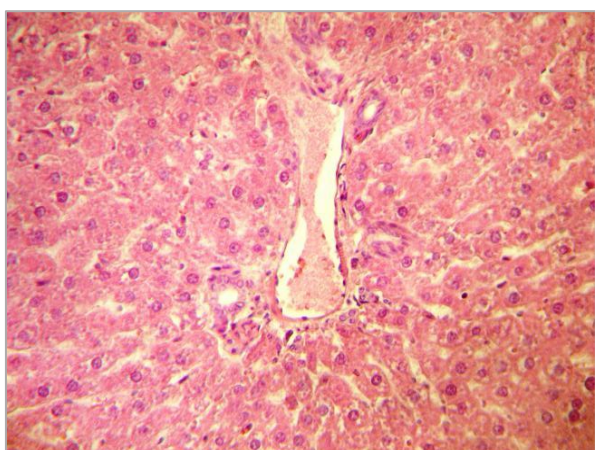
Kod životinja koje su tretirane alkoholom i tikvinim uljem, histopatološki nalaz pokazuje umereno izražene i izražene novoformirane žučni duktuluse, umerenu dilataciju grane v.portae i umerenu do izraženu kongestiju grane v.portae. Fokalno se uočava diskretan edem hepatocita (slike: 26, 27, 28, 29).



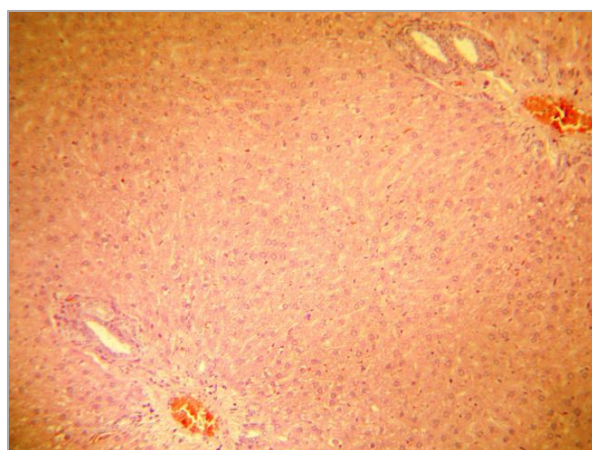
Slika 26. Umerena dilatacija grane v.portae i izražena kongestija, fokalno diskretan edem hepatocita; jetra životinje tretirane etanolom i tikvinim uljem (HE, 200x).



Slika 27. Umerena dilatacija grane v.portae i izražena kongestija, fokalno diskretan edem hepatocita; jetra životinje tretirane etanolom i tikvinim uljem (HE, 200x).



Slika 28. Umereno izraženi novoformirani žučni duktulusi; jetra životinje tretirane etanolom i tikvinim uljem (HE, 200x).



Slika 29. Umerena kongestija grana v. portae i izraženi novoformirani žučni duktulusi; jetra životinje tretirane etanolom i tikvinim uljem (HE, 40x).

5.3. Rezultati statističke obrade histopatoloških nalaza

Radi procene efekata etanola na oštećenje jetre kao i efekata hepatoprotektivnih supstanci surutke i tikvinog ulja određivan je stepen razvoja i povlačenja sledećih histopatoloških promena jetre: kongestija, dilatacija centralne vene, dilatacija grane vene porte, inflamacija portnih prostora, hiperplazija Kupferovih ćelija, novoformirani žučni duktusi, masne hepatocitne promene i edem ćelije.

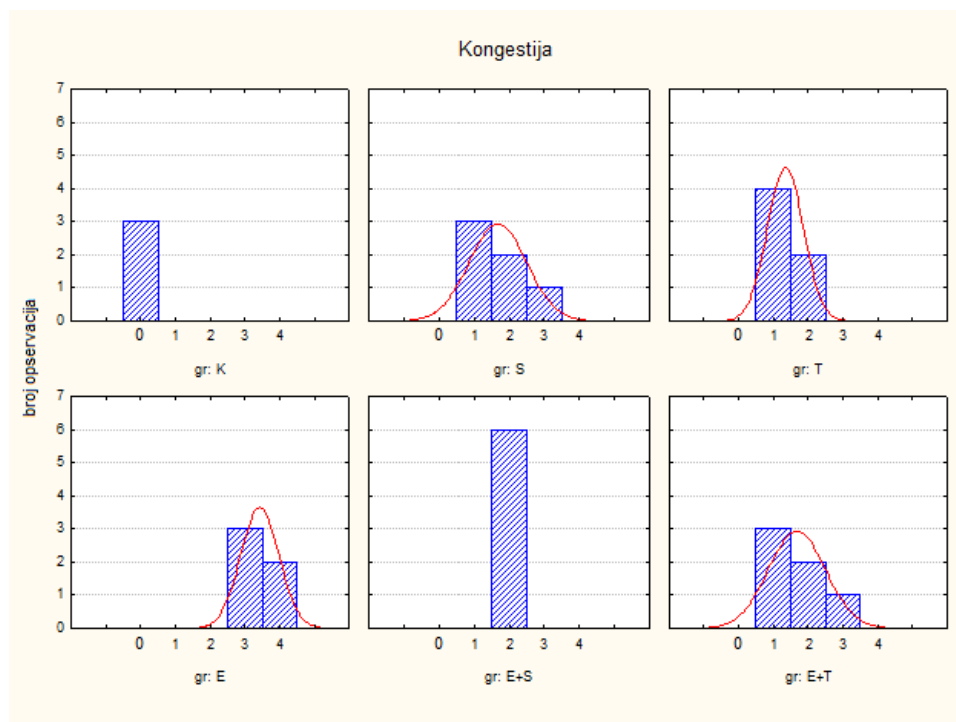
5.3.1. Kongestija

Između grupa životinja tretiranih surutkom, tikvinim uljem i etanolom uočena je visoka statistički značajna razlika ($p=0,001$) kada je u pitanju učestalost postojanja kongestije (Tabela 1), 19,5% životinja je bilo bez patoloških promena, diskretne promene su uočene u 27,8% životinja, umerene u 33,3%, izražene u 13,9% dok su veoma izražene promene uočene kod dve životinje (5,5%). Kongestija je najčešća u etanolskoj (16,6 %) i grupi životinja tretiranoj surutkom (16,6%), međutim u etanolskoj grupi značajno je viši broj životinja kod kojih su patološke promene izražene ili veoma izražene (13,8%) u odnosu na grupu životinja tretiranu surutkom (2,8%) (Tabela 1).

Tabela 1. Nivo kongestije tkiva jetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato-histološka promena jetre	Nivo pato-histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	<i>p</i>
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ ulje		
Kongestija	Bez promene	6 (16,7)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	7 (19,5)	0,001
	Diskretne	0 (0)	3 (8,3)	4 (11,1)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	10 (27,8)	
	Umerene	0 (0)	2 (5,5)	2 (5,5)	0 (0)	6 (16,7)	2 (5,5)	12 (33,3)	
	Izražene	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	1 (2,8)	5 (13,9)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza kongestije u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su i na histogramu 1. Kontrolna grupa ne pokazuje znake kongestije. Grupa životinja tretirana surutkom (S) i grupa tretirana tikvinim uljem (T) pokazuju diskretnu i umerenu kongestiju. Grupa tretirana etanolom i surutkom (E+S) ima umerenu kongestiju slično kao i grupa životinja tretirana etanolom i tikvinim uljem (E+T), za razliku od grupe kojoj je davan etanol (E) gde se uočavaju izražene i veoma izražene promene.



Histogram 1. Kongestija (vrednosti za sve parametre su od 0 - nema promena, 1- diskretne promene, 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

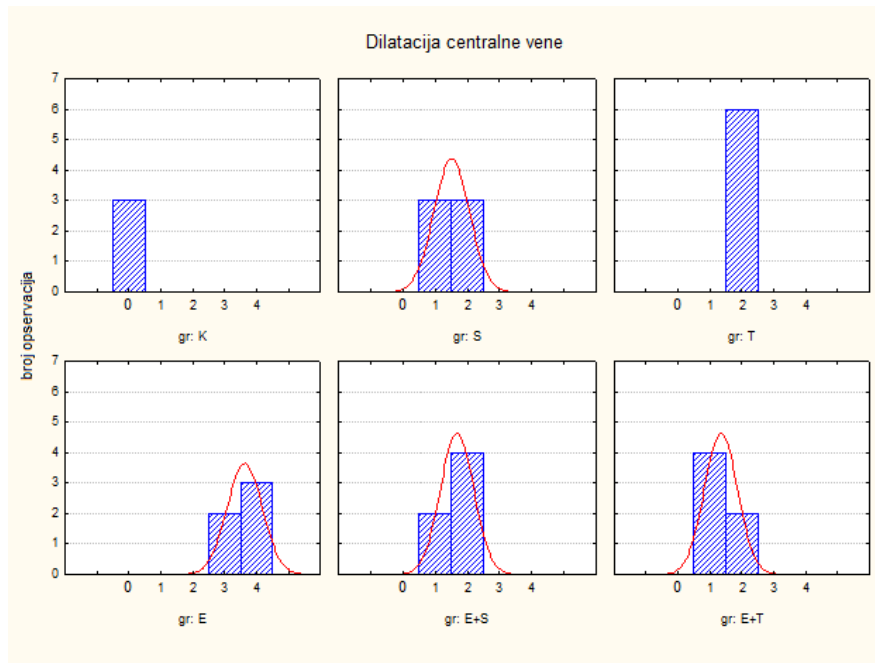
5.3.2. Dilatacija centralne vene

Između različitih grupa životinja postoji visoka statistički značajna razlika ($p=0,001$) kada je u pitanju postojanje dilatacije centralne vene u tkivu jetre pacova. Dilatacija centralne vene je najizraženija u etanolskoj grupi životinja u odnosu na sve ostale grupe gde su kod 8,3% životinja uočene veoma izražene patološke promene a kod 5,6% izražene promene, dok kod ostalih grupa izražene ili veoma izražene promene nisu uočene (tabela 2).

Tabela 2. Nivo dilatacije centralne vene jetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato-histološka promena jetre	Nivo pato-histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	P
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ t. ulje		
Dilatacija centralne vene	Bez promena	6 (16,7)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	7 (19,5)	0,001
	Diskretne	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	4 (11,1)	9 (25)	
	Umerene	0 (0)	3 (8,3)	6 (16,7)	0 (0)	4 (11,1)	2 (5,5)	15 (41,6)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza dilatacije centralne vene u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su i na histogramu 2. Kontrolna grupa ne pokazuje znake dilatacije centralne vene. Grupe životinja tretirane surutkom (S) i tikvinim uljem (T) pokazuju diskretnu i umerenu dilataciju centralne vene. U grupi životinja tretiranoj etanolom i surutkom (E+S), kao i grupi životinja tretiranoj etanolom i tikvinim uljem (E+T) imamo takođe diskretnu i umerenu dilataciju centralne vene, za razliku od grupe životinja kojoj je davan etanol (E) gde se vidi izražena i veoma izražena dilatacija centralne vene.



Histogram 2. Dilatacija centralne vene (vrednosti za sve parametre su od 0 - nema promena 1- diskretne promene, 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

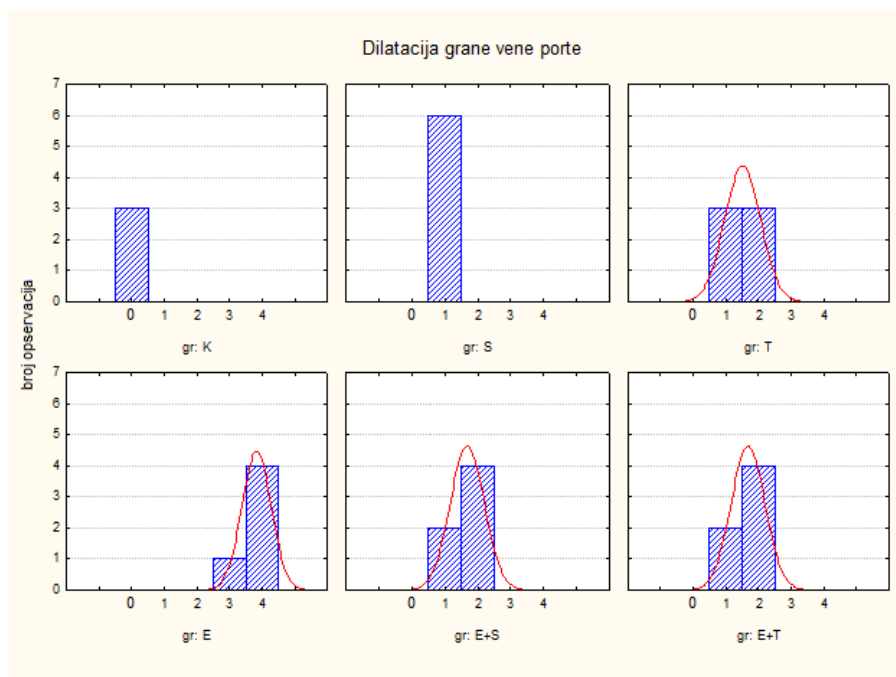
5.3.3. Dilatacija grane vene porte

Izražene ili veoma izražene patološke promene u vidu dilatacije venae portae su uočene u samo 5 životinja (13,9%) od kojih sve pripadaju etanolskoj grupi, što je pokazano postojanjem visoko statistički značajne razlike ($p=0,001$) između grupa životinja kada je u pitanju dilatacija venae portae (Tabela 3).

Tabela 3. Nivo dilatacije dilatacije grane venae portae jetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato- histolo- ška promena jetre	Nivo pato- histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	<i>p</i>
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ t. ulje		
Dilata- cija grane v. portae	Bez promene	6 (16,7)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	7 (19,4)	0,001
	Diskretne	0 (0)	6 (16,7)	3 (8,3)	0 (0)	2 (5,5)	2 (5,5)	13 (36,1)	
	Umerene	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	4 (11,1)	4 (11,1)	11 (30,5)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (11,1)	0 (0)	0 (0)	4 (11,1)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza dilatacije grane vene porte u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S iE+T) prikazani su na histogramu 3. Kontrolna grupa ne pokazuje znake dilatacije grane vene porte. Grupe životinja tretirane surutkom (S) i tikvinim uljem (T) pokazuju diskretnu i umerenu dilataciju grane vene porte. U grupi životinja tretiranoj etanolom i surutkom (E+S), kao i grupi životinja tretiranoj etanolom i tikvinim uljem (E+T) imamo takođe diskretnu i umerenu dilataciju grane vene porte, za razliku od grupe životinja kojoj je davan etanol (E) gde se vidi izražena i veoma izražena dilatacija grane vene porte.



Histogram 3. Dilatacija grane vene porte (vrednosti za sve parametre su od 0 - nema promena 1- diskretne promene 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

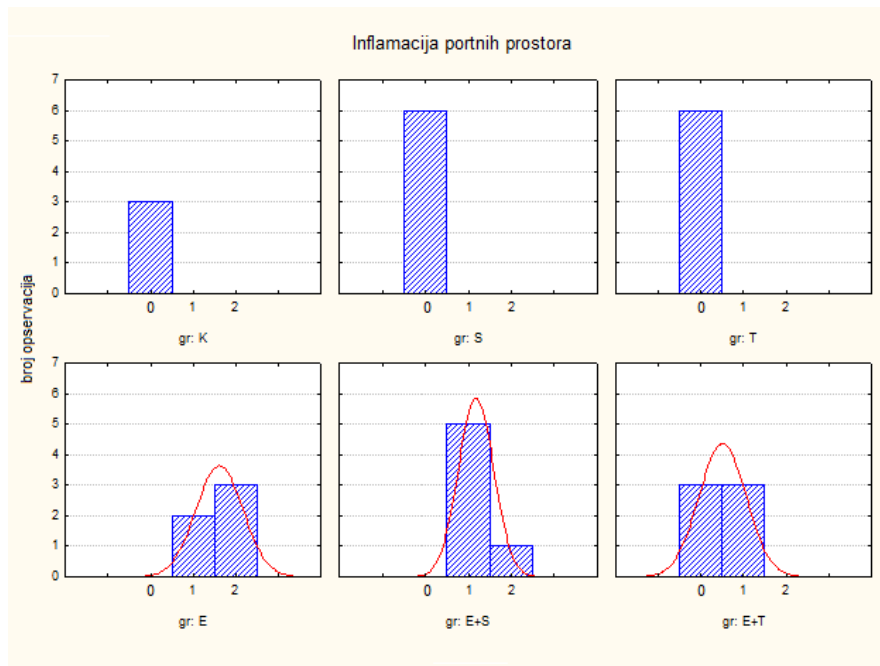
5.3.4. Inflamacija portnih prostora

Inflamacija portnih prostora nije uočena u kontrolnoj grupi i grupama životinja tretiranim surutkom i tikvinim uljem. Najizraženije promene su pronađene u etanolskoj grupi životinja gde je 8,3% njih imalo umerene patološke promene, a 5,5% diskretne promene, umerene promene su uočene još kod samo jedne životinje iz grupe tretirane etanolom i tikvinim uljem, tako da je razlika između etanolske grupe i ostalih grupa statistički visoko značajna ($p=0,001$) kada je u pitanju učestalost inflamacije portnih prostora u tkivu jetre pacova (Tabela 4).

Tabela 4. Nivo inflamacije portnih prostora jetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato-histološka promena jetre	Nivo pato-histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	<i>p</i>
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ ulje		
Inflamacija portnih prostora	Bez promene	6 (16,7)	6 (16,7)	6 (16,7)	1 (2,8)	0 (0)	3 (8,3)	22 (61,1)	0,001
	Diskretne	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	5 (13,9)	3 (8,3)	10 (27,7)	
	Umerene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	1 (2,8)	0 (0)	4 (11,1)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza inflamacije portnih prostora u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su i na histogramu 4. U kontrolnoj netretiranoj grupi, grupi koja je tretirana surutkom (S) i grupi koja je tretirana tikvinim uljem (T) ne postoje znaci inflamacije portnih prostora. Za razliku od ovih grupa, grupe životinja tretirane etanolom (E), etanolom i surutkom (E+S) kao i etanolom i tikvinim uljem (E+T) pokazuju diskretnu i umerenu inflamaciju portnih prostora.



Histogram 4. Inflamacija portnih prostora (vrednosti za sve parametre su od 0 -nema promena, 1- diskretne promene, 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

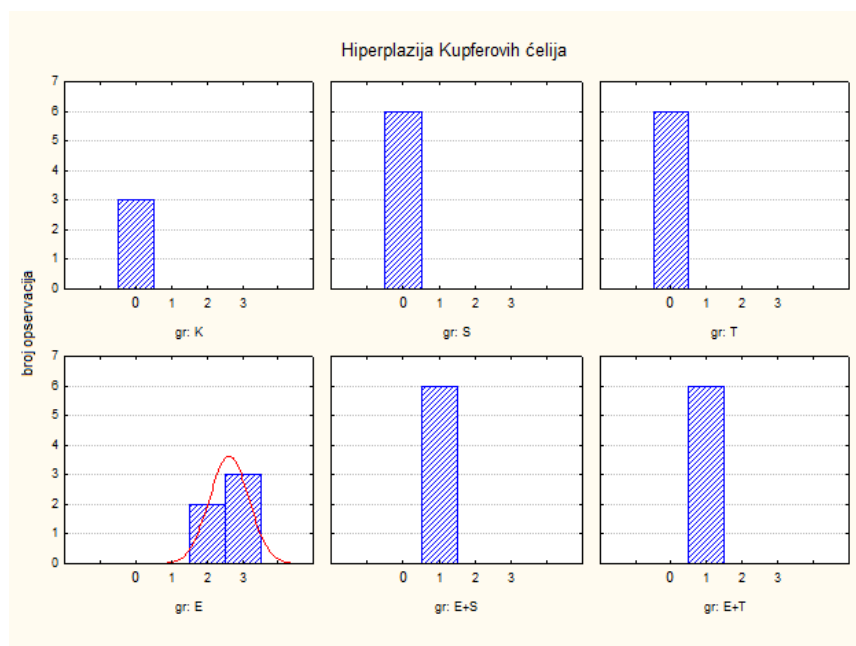
5.3.5. Hiperplazija Kupferovih ćelija

Visoka statistički značajna razlika između grupa životinja je uočena i u pogledu postojanja hiperplazije Kupferovih ćelija ($p=0,001$), pri čemu su patološke promene uočene kod 47,1% od ukupnog broja životinja ali su one najizraženije u etanolskoj grupi. U etanolskoj grupi 5,5% životinja ima umerene patološke promene, dok 8,3% ima izražene promene. Kod ostalih grupa životinja umerene i izražene promene nisu uočene (Tabela 5).

Tabela 5. Nivo hiperplazije Kupferovih ćelijajetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato-histološka promena jetre	Nivo pato-histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	<i>p</i>
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ t. ulje		
Hiperplazija Kupferovih ćelija	Bez promena	6 (16,7)	6 (16,7)	6 (16,7)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	19 (52,8)	0,001
	Diskretne	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (16,7)	6 (16,7)	12 (33,3)	
	Umerene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza hiperplazije Kupferovih ćelija u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na histogramu 5. U kontrolnoj grupi (K), grupi životinja tretiranoj surutkom (S) kao i grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem (T) ne postoji hiperplazija Kupferovih ćelija. Grupa životinja kojoj je davan etanol pokazuje umerenu do izražene hiperplazije Kupferovih ćelija, dok u grupi životinja tretiranih surutkom i etanolom (E+S), kao i tikvinim uljem i etanolom (E+T) vide se samo diskretne promene.



Histogram 5. Hiperplazija Kupferovih ćelija (vrednosti za sve parametre su od 0 -nema promena 1- diskretne promene 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

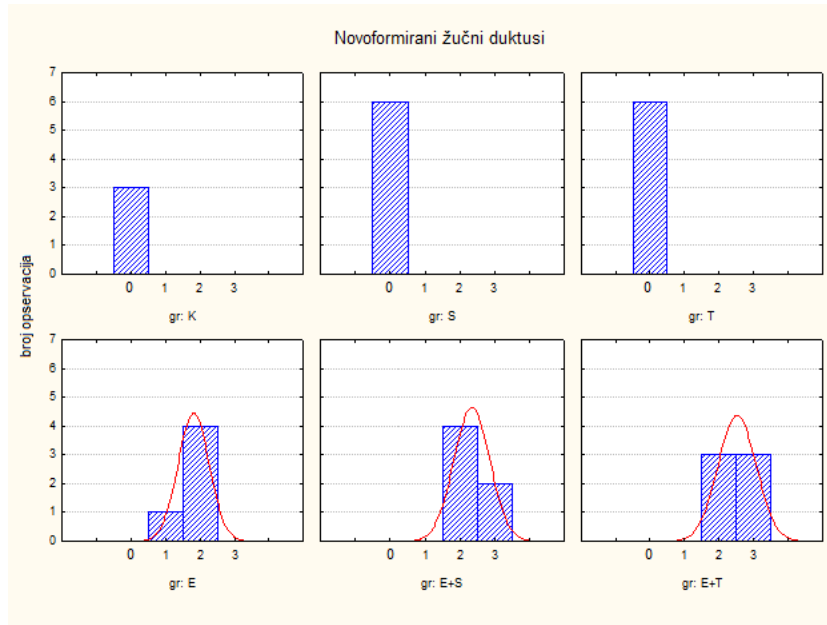
5.3.6. Novoformirani žučni duktulusi

Kada su u pitanju novoformirani žučni duktulusi umerene i izražene promene uočene su u grupama životinja tretiranim etanolom i surutkom (16,6) i etanolom tikvinim uljem (16,6%) dok u kontrolnoj grupi, i grupama životinja tretiranim samostalnom primenom surutke i tikvinog ulja patološke promene nisu uočene (Tabela 6).

Tabela 6. Nivo formiranja novih žučnih duktulusa jetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato-histološka promena jetre	Nivo pato-histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	p
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ ulje		
Novoformirani žučni duktulusi	Bez promene	6 (16,7)	6 (16,7)	6 (16,7)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	19 (52,8)	0,001
	Diskretne	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	
	Umerene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (9,3)	4 (11,1)	3 (8,3)	11 (30,5)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	3 (8,3)	5 (13,9)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza novoformiranih žučnih duktusa u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su i na histogramu 6. Uočava se da ni u kontrolnoj (K) kao ni u grupi tretiranoj surutkom (S) i grupi tretiranoj tikvinim uljem (T) nema pojave novoformiranih žučnih duktusa. U grupi životinja tretiranoj etanolom (E) vidimo diskretnu i umerenu pojavu novoformiranih žučnih duktusa, za razliku od grupa tretiranih surutkom i etanolom (E+S) i tikvinim uljem i etanolom (E+T) gde vidimo od umerene do izražene pojave novoformiranih žučnih duktusa.



Histogram 6. Novoformirani žučni duktusi (vrednosti za sve parametre su od 0 -nema promena 1- diskretne promene 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

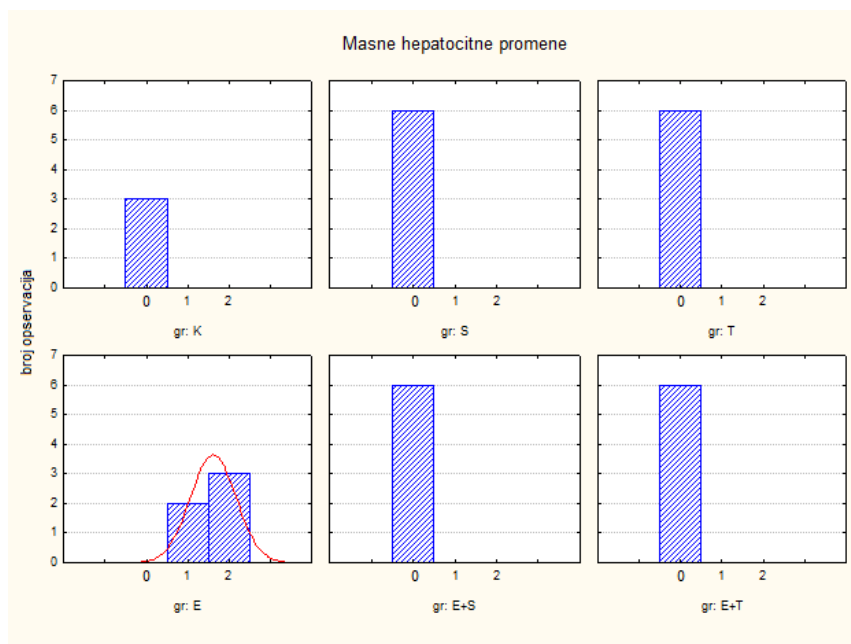
5.3.7. Masne hepatocitne promene

Patološke promene po tipu masnih hepatocitnih promena nisu uočene u kontrolnoj grupi i grupama životinja tretiranim surutkom, tikvinim uljem, etanolom i surutkom, etanolom i tikvinim uljem. Patološke promene su uočene samo u etanolskoj grupi životinja od čega je jedna životinja (2,8%) bez promene, a ostalih 5 (13,8%) imaju diskretne ili umerene masne promene pri čemu je razlika između grupa životinja statistički visoko značajna ($p=0,001$) (tabela 7).

Tabela 7. Nivo masnih promenajetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato- histolo- ška promena jetre	Nivo pato- histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	<i>p</i>
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ t.ulje		
Masne promene na hepatocitima	Bez promene	6 (16,7)	6 (16,7)	6 (16,7)	1 (2,8)	6 (16,7)	6 (16,7)	31 (86,1)	0,001
	Diskretne	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	
	Umerene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza masnih hepatocitnih promena u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su i nahistogramu 7. Kada su u pitanju masne hepatocitne promene nema ih ni u kontrolnoj (K), ni u grupi životinja tretiranoj surutkom (S), grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem (T), grupi životinja tretiranoj surutkom i etanolom (E+S), kao i grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem i etanolom (E+T). Za razliku od njih, grupa životinja tretirana samo etanolom pokazuje diskretne do umerenih masnih hepatocitnih promena.



Histogram 7. Masne hepatocitne promene (vrednosti za sve parametre su od 0 -nema promena 1- diskretne promene 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

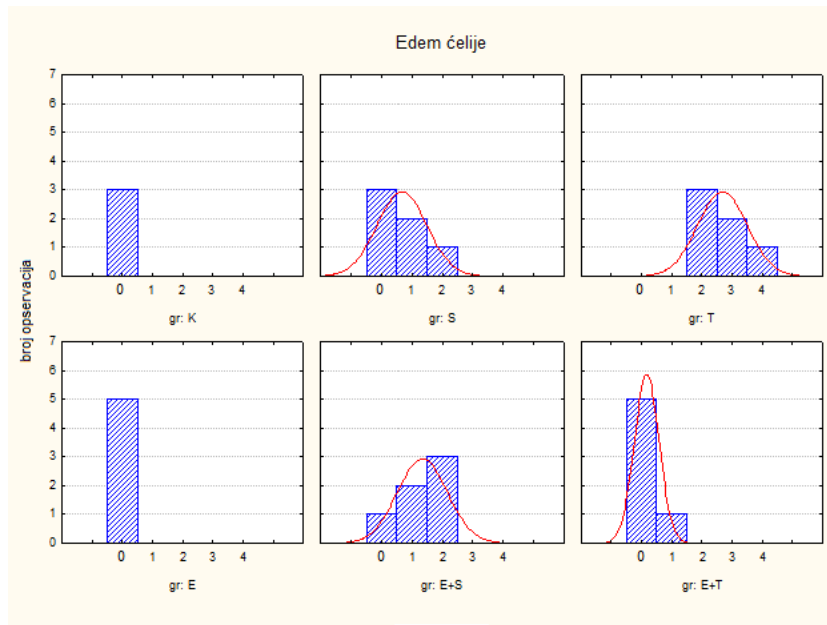
5.3.8. Edem ćelije

Edem hepatocita je uočen u 41,6% ispitivanih životinja, od čega su kod 13,9% životinja patološke promene diskretne, u 19,4% su umerene, u 5,5 % su izražene, dok su kod jedne životinje (2,8%) promene veoma izražene. Edem hepatocita nije uočen u tkivu jetre životinja tretiranih etanolom i u kontrolnoj grupi životinja. Patološke promene u vidu edema hepatocita su najizraženije u grupi životinja tretiranoj samo tikvinim uljem, gde 8,3% životinja ima umerene promene, 5,5% izražene, dok jedna životinja (2,8%) ima veoma izražene promene. Razlika između grupa životinja je visoko statistički značajna ($p=0,001$) (tabela 8).

Tabela 8. Nivo edema hepatocita jetre u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato-histološka promena jetre	Nivo pato-histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	<i>p</i>
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ t:ulje		
Edem hepatocita	Bez promene	6 (16,7)	3 (8,3)	0 (0)	6 (16,7)	1 (2,8)	5 (13,9)	21 (58,3)	0,001
	Diskretne	0 (0)	2 (5,5)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	1 (2,8)	5 (13,9)	
	Umerene	0 (0)	1 (2,8)	3 (8,3)	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	7 (19,4)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,5)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza edema ćelije u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su i na histogramu 8. Edem ćelije se ne vidi ni u kontrolnoj (K) ni u grupi životinja tretiranoj alkoholom (E). Grupe životinja tretirane surutkom (S), surutkom i etanolom (E+S) pokazuju diskretne do umerenih promena. Grupa životinja tretirana etanolom i tikvinim uljem (E+T) pokazuje diskretne promene, za razliku od grupe životinja tretirane samo tikvinim uljem (T) gde imamo od umerenog do veoma izraženog edema ćelija.



Histogram 8. Edem ćelije (vrednosti za sve parametre su od 0 -nema promena 1- diskretne promene 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

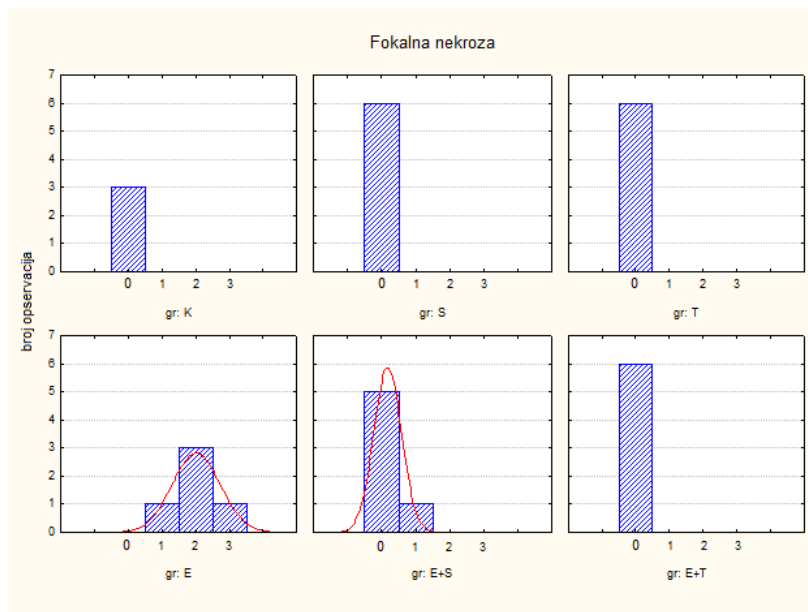
5.3.9. Fokalna nekroza

Rezultati ovog histopatološkog nalaza pokazali su da od ukupnog broja životinja 83,5% nije imalo patološke promene u vidu fokalne nekroze, diskretne promene su uočene u 5,5%, umerene u 8,3%, izražene u 2,8%, dok veoma izražene patološke promene nisu uočene. Od svih grupa životinja diskretne (2,8%), umerene (8,3%) i izražene promene (2,8%) uočene su samo u etanolskoj grupi životinja, dok ovakve promene nisu uočene u ostalim grupama.

Tabela 9. Nivo fokalne nekroze hepatocita u pacova nakon tretmana etanolom, surutkom i tikvinim uljem.

Pato-histološka promena jetre	Nivo pato-histoloških promena	Grupe životinja Broj (%)						Ukupno Broj (%)	P
		Kontrola	Surutka	T. ulje	Etanol	Etanol+ surutka	Etanol+ ulje		
Fokalna nekroza hepatocita	Bez promene	6 (16,7)	6 (16,7)	6 (16,7)	1 (2,8)	5 (13,9)	6 (16,7)	30 (83,5)	0,013
	Diskretne	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	1 (2,3)	0 (0)	2 (5,5)	
	Umerene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	
	Izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	
	Veoma izražene	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Rezultati statističke obrade histopatološkog nalaza fokalne nekroze u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su i na histogramu 9. Fokalna nekroza se ne uočava u kontrolnoj grupi (K), grupi životinja tretiranoj surutkom (S) i grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem (T). U grupi životinja kojoj je davan etanol (E) vidimo diskretne, umerene i izražene promene fokalne nekroze, dok u grupi životinja tretiranoj etanolom i surutkom (E+S) nema promene ili su promene fokalne nekroze diskretne.



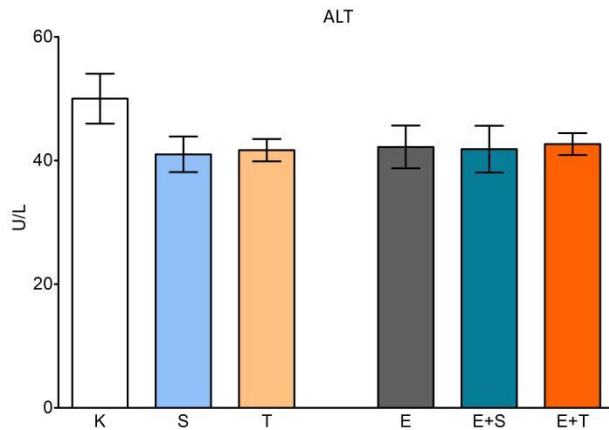
Histogram 9. Fokalna nekroza (vrednosti za sve parametre su od 0 -nema promena 1- diskretne promene 2 - umerene promene, 3 - izražene promene i 4 - veoma izražene promene), grupe životinja (K-kontrola, S-surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S-etanol i surutka, E+T-etanol i tikvino ulje)

5.4. Biohemijski pokazatelji

Za procenu hepatotoksičnosti i efekata ispitivanih hepatoprotektora surutke i tikvinog ulja određivani su sledeći biohemijski pokazatelji: alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), De-Ritisov koeficijent, alkalna fosfataza (ALP), ukupni bilirubin, ukupni holesterol, indeks ateroskleroze, laktat dehidrogenaza (LDH), trigliceridi, LDL- holesterol, i HDL- holesterol.

5.4.1. Alanin aminotransferaza (ALT)

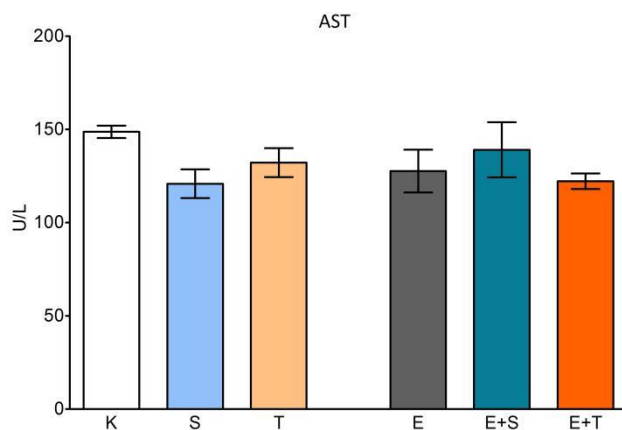
Rezultati merenja koncentracije ALT u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 6. Ne postoji statistički značajna razlika u nivoima enzima između kontrolne i eksperimentalnih grupa.



Grafikon 6. Koncentracija ALT (U/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka,,T-tikvino ulje, E- etanol , E+S- etanol i surutka , E+T- etanol i tikvino ulje)

5.4.2. Aspartat aminotransferaza (AST)

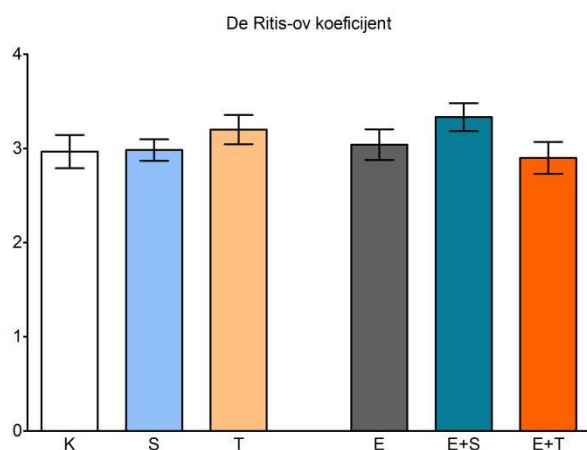
Rezultati merenja koncentracije AST u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 7. Ne postoji statistički značajna razlika u nivoima enzima između kontrolne i eksperimentalnih grupa životinja.



Grafikon 7. Koncentracija AST (U/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka,,T-tikvino ulje, E- etanol , E+S- etanol i surutka , E+T- etanol i tikvino ulje)

5.4.3. De Ritisov koeficijent

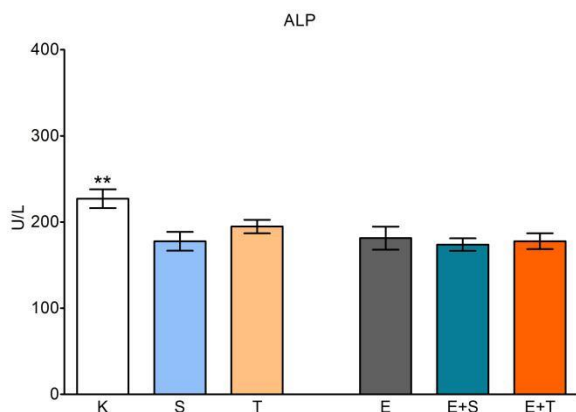
Rezultati merenja De Ritisovog koeficijenta u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 8. Ne postoji statistički značajna razlika u odnosu ovog koeficijenta između kontrolne i eksperimentalnih grupa životinja.



Grafikon 8. De Ritisov koeficijent kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka,,T-tikvino ulje, E- etanol , E+S- etanol i surutka , E+T- etanol i tikvino ulje)

5.4.4. Alkalna fosfataza

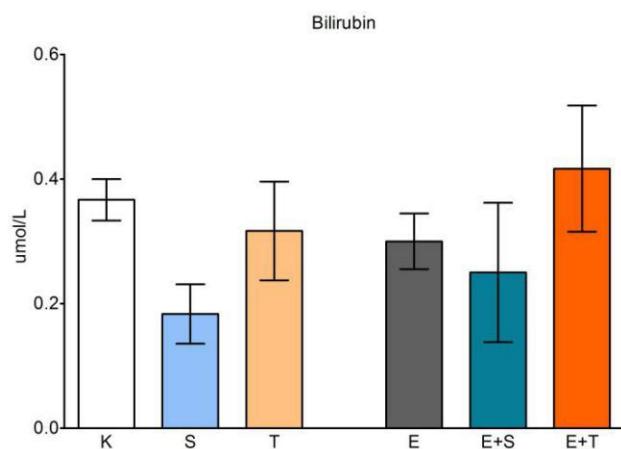
Rezultati merenja koncentracije alkalne fosfataze ALP u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 9. Statistički značajno smanjenje ($p < 0,01$) postoji kod eksperimentalnih grupa životinja (S, T, E, E+S i E+T) u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu životinja (K).



Grafikon 9. Koncentracija ALP (U/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka,,T-tikvino ulje, E- etanol , E+S- etanol i surutka , E+T- etanol i tikvino ulje) ** (p<0,01)

5.4.5. Ukupni bilirubin

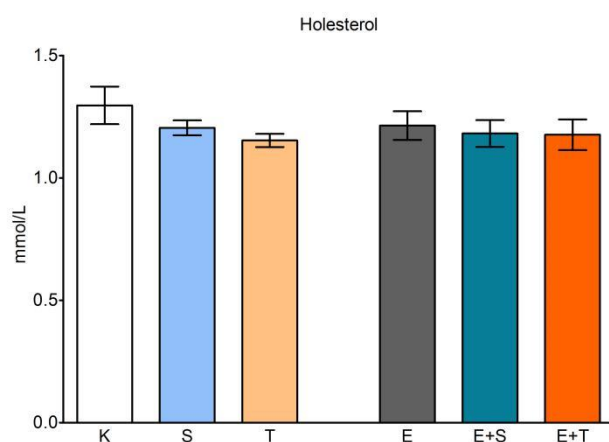
Rezultati merenja koncentracije ukupnog bilirubina u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 10. Ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji bilirubina između kontrolne i eksperimentalnih grupa.



Grafikon 10. Koncentracija bilirubina ($\mu\text{mol/L}$) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka,,T-tikvino ulje, E- etanol , E+S- etanol i surutka , E+T- etanol i tikvino ulje)

5.4.6. Holesterol

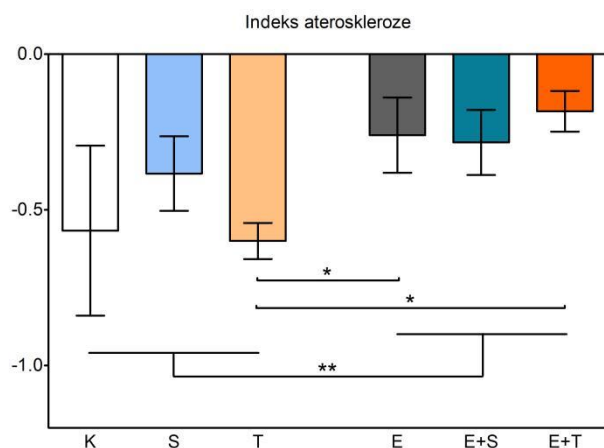
Rezultati merenja koncentracije ukupnog holesterola u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 11. Ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji između kontrolne i eksperimentalnih grupa.



Grafikon 11. Koncentracija holesterola (mmol/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.4.7. Indeks ateroskleroze

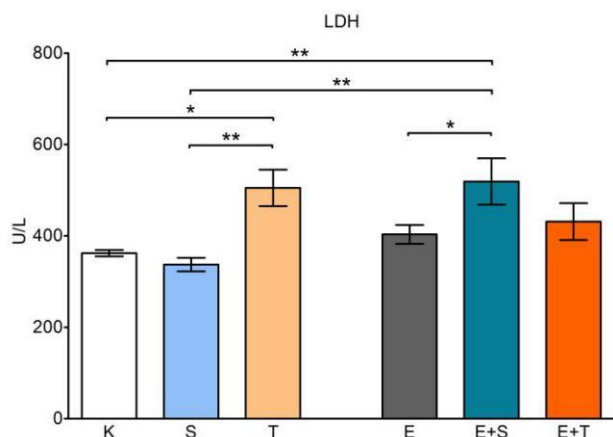
Rezultati merenja indeksa ateroskleroze u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 12. Postoji statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) indeksa ateroskleroze u odnosu između grupe životinja tretirane tikvinim uljem (T) u odnosu na grupe tretirane etanolom (E) i etanolom i tikvinim uljem (E+T). Indeks ateroskleroze je značajno veći ($p < 0,01$) u etanolskim (E, E+S i E+T) nego u ne-etanolskim grupama životinja (K, S i T).



Grafikon 12. Indeks ateroskleroze kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$)

5.4.8. Laktat dehidrogenaza

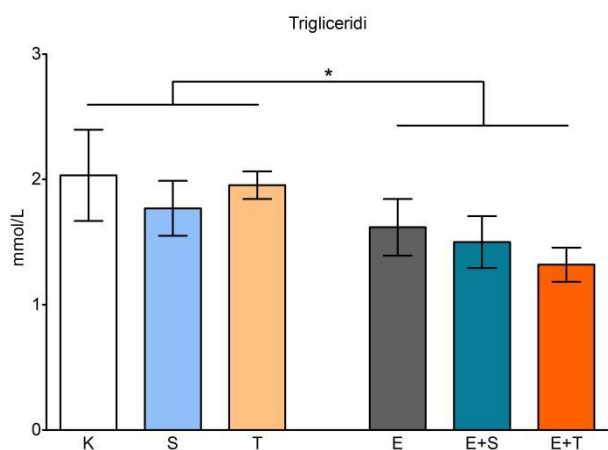
Rezultati merenja koncentracije laktat dehidrogenaze (LDH) u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 13. Postoji statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) nivoa enzima u grupi tretiranoj tikvinim uljem (T) u odnosu na kontrolnu grupu (K) kao i u odnosu na grupu životinja tretiranu surutkom (S). Statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) beležimo i u grupi životinja tretiranoj etanolom i surutkom (E+S) u odnosu na grupu životinja kojoj je davan etanol (E) kao i kod grupe životinja ($p < 0,01$) tretirane etanolom i surutkom (E+S) u odnosu na grupu tretiranu surutkom (S) i kontrolnu netretiranu grupu životinja (K).



Grafikon 13. Koncentracija LDH (U/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$)

5.4.9. Trigliceridi

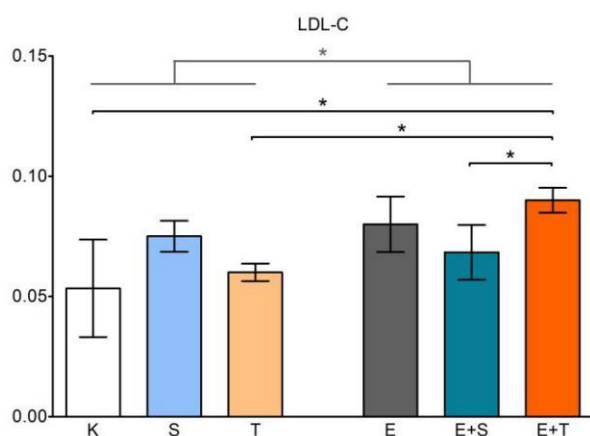
Rezultati merenja koncentracije triglicerida u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 14. Na osnovu grafikona zaključujemo da su koncentracije triglicerida statistički značajno veće ($p < 0,05$) u ne-etanolskim (K, S, i T) nego u etanolskim (E, E+S i E+T) grupama životinja.



Grafikon 14. Koncentracija triglicerida (mmol/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), *($p < 0.05$)

5.4.10. LDL-holesterol

Rezultati merenja koncentracije LDL-holesterola u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 15. Postoji statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) kod grupe životinja tretirane etanolom i tikvinim uljem (E+T) u odnosu na kontrolnu (K), grupu životinja tretiranu tikvinim uljem (T) i grupu tretiranu etanolom i surutkom (E+S). Nivo LDL holesterola je veći ($p < 0,05$) u etanolskim (E, E+S i E+T) nego u ne-etanolskim (K, S i T) grupama.

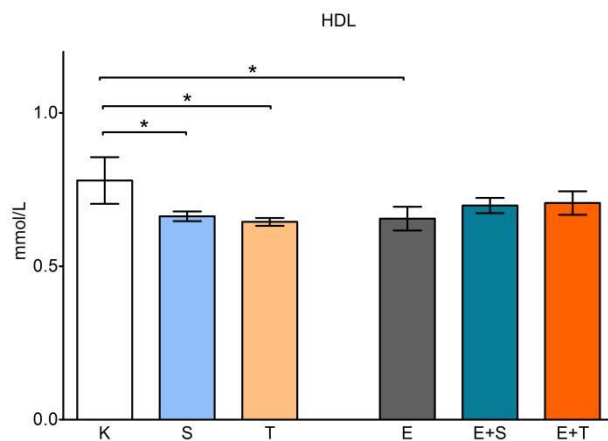


Grafikon 15. Koncentracija LDL holesterola (mmol/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), $*(p < 0,05)$

5.4.11. HDL- holesterol

Rezultati merenja koncentracije HDL-holesterola u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 16. Postoji statistički značajno smanjenje nivoa HDL

($p < 0,05$) između kod grupa životinja tretiranih surutkom (S), tikvinim uljem (T) i etanolom (E) u odnosu na kontrolnu grupu (K).



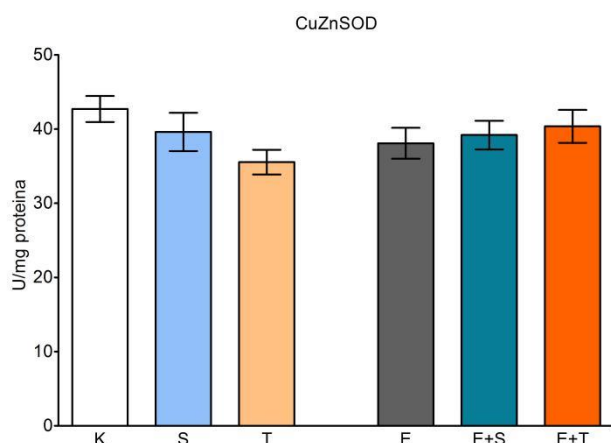
Grafikon 16. Koncentracija HDL (mmol/L) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), $*(p < 0.05)$

5.5. Rezultati izmerenih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Za procenu parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite merena je aktivnost sledećih pokazatelja: bakar-cink superoksid dizmutaza (CuZnSOD), mangan superoksid dizmutaza (MnSOD), katalaza (CAT), glutacion peroksidaza (GSH-Px), glutacion reduktaza (GR), glutacion - s- transferaza (GST), ksantin oksidaza (XOD), ukupni glutacion (GSH) i malondialdehid (MDA).

5.5.1. Aktivnost enzima bakar cink superoksid dizmutaze (CuZnSOD)

Rezultati merenja aktivnosti enzima CuZnSOD u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 17. Primena surutke i tikvinog ulja kod eksperimentalnih grupa životinja nije dovela do statistički značajnih razlika u aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu, nezavisno od toga da li je primena bila u kombinaciji sa etanolom ili bez njega.

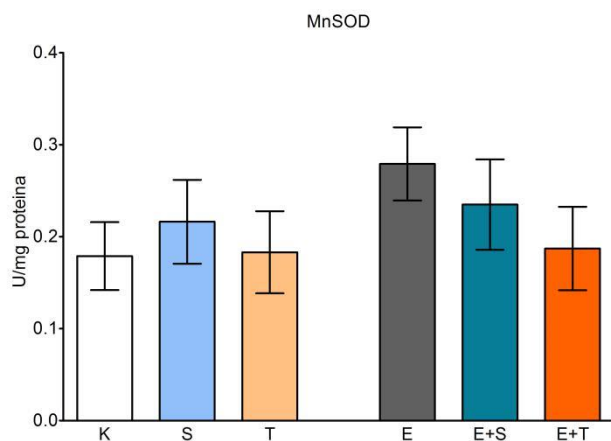


Grafikon 17. Aktivnost enzima CuZnSOD (U/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.5.2. Aktivnost enzima mangan superoksid dizmutaze (MnSOD)

Rezultati merenja aktivnosti enzima MnSOD u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 18. Primena surutke i tikvinog ulja kod eksperimentalnih grupa životinja nije dovela do statistički značajnih promena u aktivnosti ovog enzima

u odnosu kontrolnu grupu, nezavisno od toga da li je primena bila u kombinaciji sa etanolom ili bez njega.

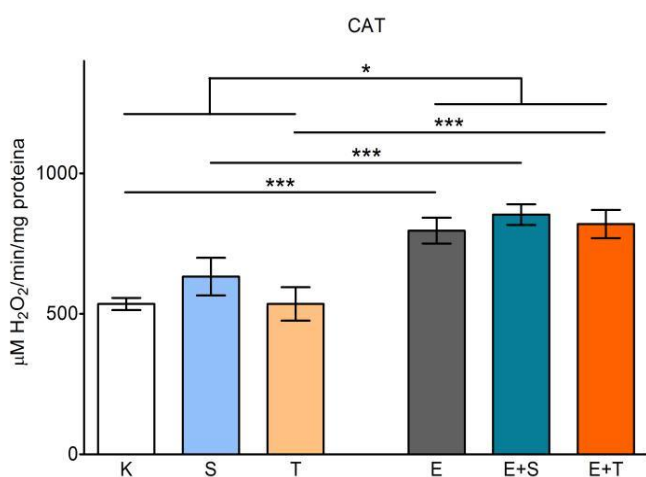


Grafikon 18. Aktivnost enzima MnSOD (U/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.5.3. Aktivnost enzima katalaze (CAT)

Rezultati merenja aktivnosti enzima CAT u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na na grafikonu 19. Samostalna primena surutke (S) u dozi od 2g/kg TT i tikvinog ulja (T) u dozi od 2ml/kg TT intragastričnom sondom tokom šest nedelja nije dovela do promene u nivou aktivnosti enzima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja (K). Sa druge strane postoji statistički značajno povećanje ($p < 0,001$) aktivnosti enzima između grupe životinja tretirane etanolom i surutkom (E+S) u odnosu na grupu životinja kojoj je davana samo surutka, kao i u grupi životinja koja je tretirana etanolom i tikvinim uljem (E+T) u odnosu na grupu životinja kojoj je intragastrično davano tikvino ulje (T) Grupa životinja koja je pila 12% etanolsku vodu (E) tokom šest nedelja se statistički značajno razlikuje ($p < 0,001$) (došlo je do značajnog povećanja aktivnosti enzima) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih

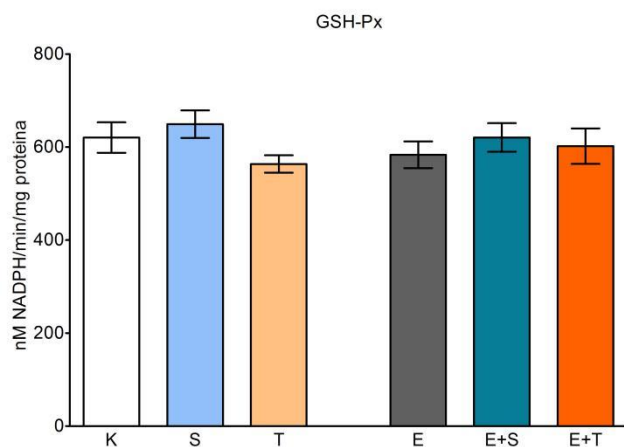
životinja. Kada uporedimo etanolske (E, E+S i E+T) sa ne-etanolskim (K, S i T) grupama, aktivnost enzima je veća ($p < 0,05$) u etanolskim grupama. Međutim, ne postoji statistički značajna razlika između etanolske grupe (E) i etanolske grupe sa primenom surutke (E+S), kao i etanolske grupe (E) i etanolske grupe sa primenom tikvinog ulja (E+T).



Grafikon 19. Aktivnost enzima CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mm}/\text{mg}$ proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T- tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), * ($p < 0.05$), *** ($p < 0,001$)

5.5.4. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px)

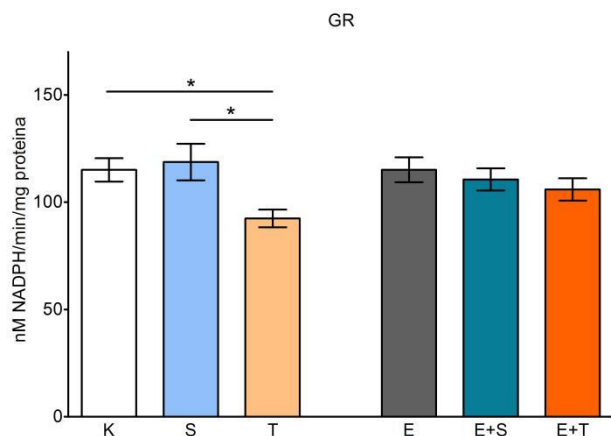
Rezultati merenja aktivnosti enzima GSH-Px u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na nagrafikonu 20. Primena surutke i tikvinog ulja kod eksperimentalnih grupa životinja nije dovela do statistički značajnih promena u aktivnosti ovog enzima u odnosu kontrolnu grupu netretiranih životinja, nezavisno od toga da li je primena bila u kombinaciji sa etanolom ili bez njega.



Grafikon 20. Aktivnost enzima GSH-Px (nMNADPH/mm/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.5.5. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GR)

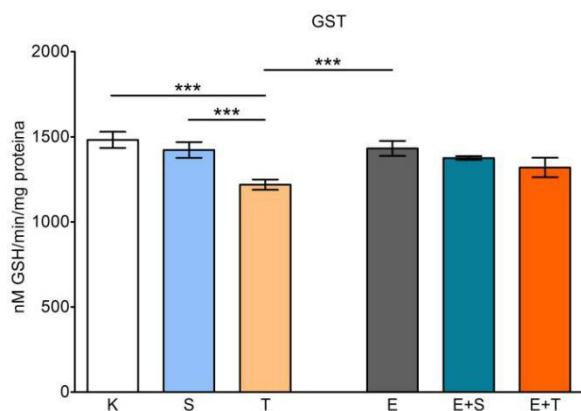
Rezultati merenja aktivnosti enzima GR u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su nana grafikonu 21. U grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem (T) u dozi od 2ml/kg TT tokom 6 nedelja došlo je do statistički značajnog smanjenja ($p < 0,05$) aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu netretiranu (K) i grupu životinja tretiranu surutkom (S) u dozi od 2mg/kg tokom 6 nedelja. Grupe životinja tretirane etanolom (E), etanolom i surutkom (E+S) i etanolom i tikvinim uljem (E+T) nisu pokazale statistički značajnu razliku u promeni aktivnosti enzima u odnosu na ne-etanolske (K, S i T).



Grafikon 21. Aktivnost enzima GR (nMNADPH/min/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol , E+S- etanol i surutka , E+T- etanol i tikvino ulje), * (p<0.05)

5.5.6. Aktivnost enzima glutation - S- transferaze (GST)

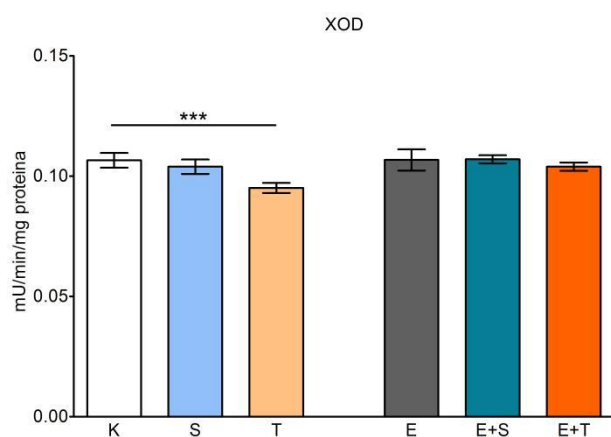
Rezultati merenja aktivnosti enzima GST u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su nana na grafikonu 22. Kod grupe životinja tretirane tikvinim uljem (T) u dozi od 2ml/kg TT tokom šest nedelja došlo je do statistički značajnog smanjenja (p<0,001) aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu (K), grupu životinja tretiranu surutkom (S) kao i grupu životinja koja je konzumirala etanol (E). Između ostalih grupa životinja nije uočena statistički značajna razlika.



Grafikon 22. Aktivnost enzima GST (nMGSH/min/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje) ***($p < 0,001$)

5.5.7. Aktivnost enzima Ksantin oksidaze (XOD)

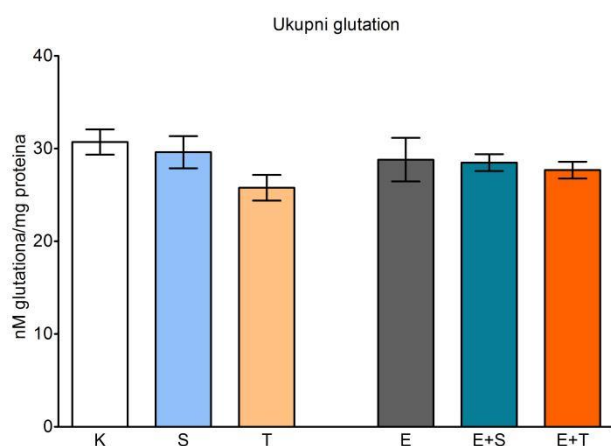
Rezultati merenja aktivnosti enzima XOD u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su nanana grafikonu 23. U grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem (T) u dozi od 2ml/kg TT tokom šest nedelja došlo je do statistički značajnog smanjenja ($p < 0,001$) aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu (K). Grupe životinja tretirane etanolom (E), etanolom i surutkom (E+S) i etanolom i tikvinim uljem (E+T) nisu pokazale statistički značajnu razliku u promeni aktivnosti ovog enzima u odnosu na ne-etanolske grupe životinja (K, S i T). Grupa životinja koja je tretirana surutkom u dozi od 2mg/kg TT tokom šest nedelja nije pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na ostale grupe.



Grafikon 23. Aktivnost enzima XOD (mU/min/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje) ***($p < 0,001$)

5.5.8. Aktivnost ukupnog glutationa (GSH +GSSG)

Rezultati merenja aktivnosti GSH u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 24. Primena surutke i tikvinog ulja kod eksperimentalnih grupa životinja nije dovela do statistički značajnih promena u aktivnosti ovog enzima u odnosu kontrolnu grupu, nezavisno od toga da li je primena bila u kombinaciji sa etanolom ili bez njega.

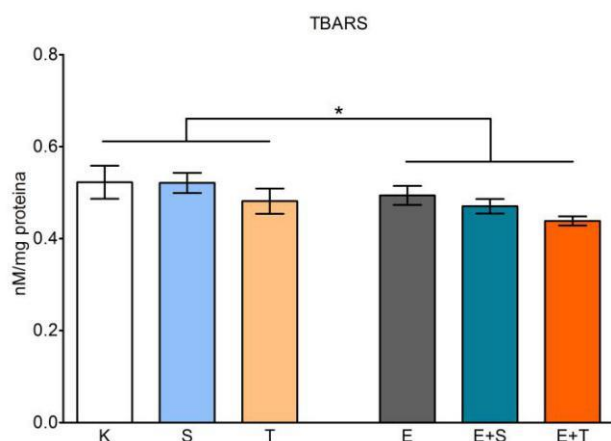


Grafikon 24. Aktivnost ukupnog glutationa (nMglutationa/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.5.9. Aktivnost malondialdehida (MDA)

Rezultati merenja aktivnosti MDA u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su

na grafikonu 25. Koncentracija MDA je veća ($p < 0,05$) u ne-etanolskim (K, S i T) u odnosu na etanolne grupe životinja (E, E+S i E+T).

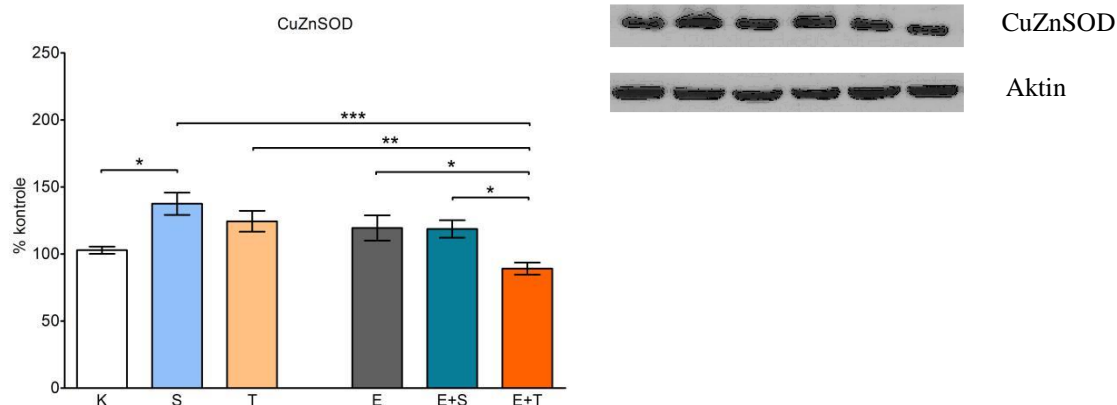


Grafikon 25. Aktivnost MDA (nM/mg proteina) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), * ($p < 0,05$)

5.6. Western blot parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

5.6.1. Western blot CuZnSOD

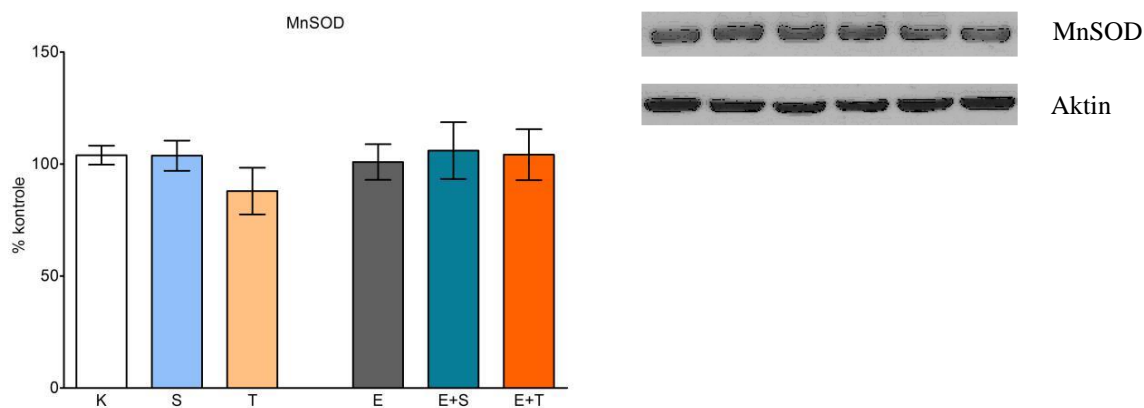
Rezultati merenja western blot nivoa CuZnSOD u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 26. Statistički značajno smanjenje ($p < 0,001$) nivoa enzima postoji u grupi životinja tretirane tikvinim uljem i etanolom (E+T) u odnosu na grupe životinja tretiranih surutkom (S), tikvinim uljem (T) ($p < 0,01$), etanolom (E) ($p < 0,05$) i etanolom i surutkom (E+S) ($p < 0,05$). Statistički značajno povećanje nivoa enzima u grupi tretiranoj surutkom (S) u odnosu na kontrolnu (K) grupu ($p < 0,05$).



Grafikon 26. Western blot CuZnSOD (% kontrolne) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T- tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)

5.6.2. Western blot enzima mangan superoksid dizmutaze MnSOD

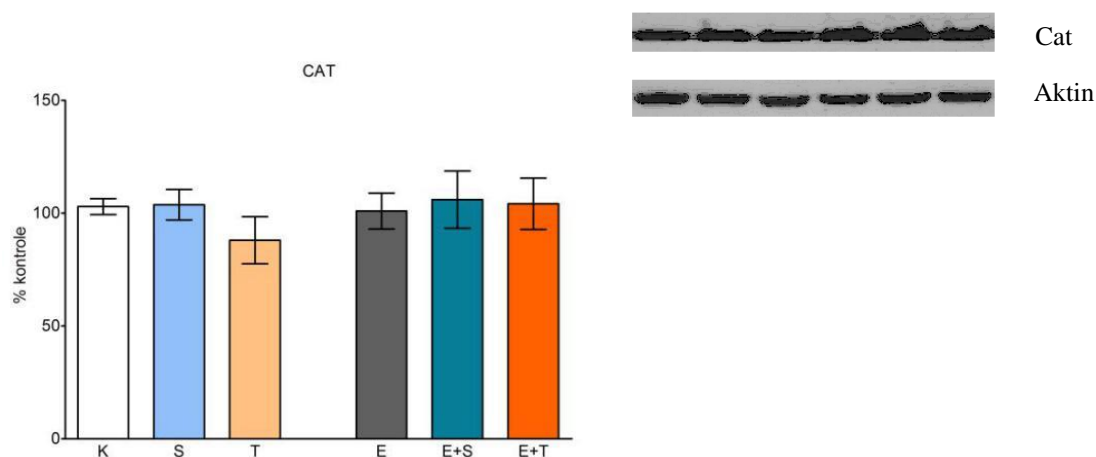
Rezultati merenja western blot nivoa MnSoD u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 27. Ne postoji statistički značajna razlika u nivoima enzima između kontrolne i eksperimentalnih grupa.



Grafikon 27. Western blot MnSOD (% kontrolne) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T- tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.6.3. Western blot enzima katalaze CAT

Rezultati merenja western blot nivoa CAT u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 28. Ne postoji statistički značajna razlika u nivoima enzima između kontrolne i eksperimentalnih grupa životinja.

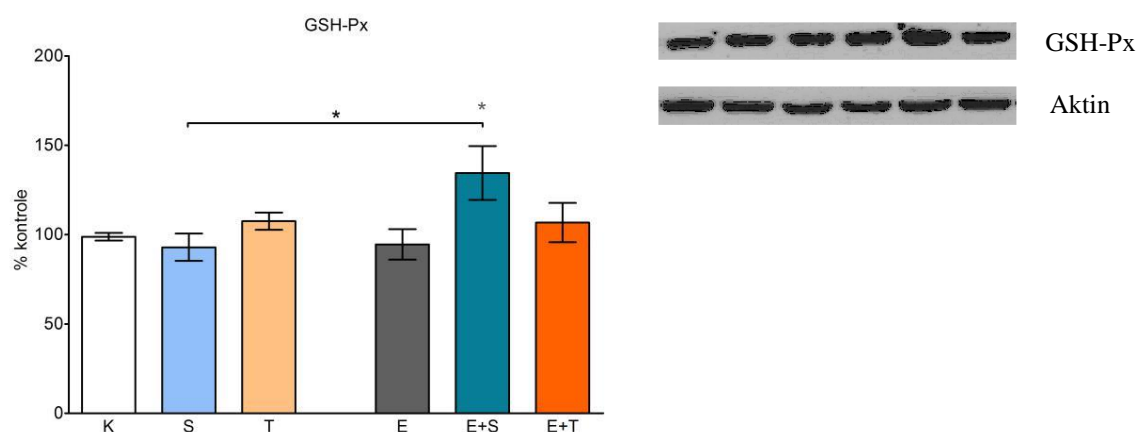


Grafikon 28. Western blot CAT (% kontrola) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje)

5.6.4. Western blot enzima glutation peroksidaze (GSH-Px)

Rezultati merenja western blot nivoa GSHPx u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 29. Grupa životinja tretirana surutkom i etanolom (E+S) je pokazala statistički značajno povećanje nivoa enzima ($p < 0,05$) u odnosu na grupu životinja tretirane samo surutkom (S). Grupa životinja tretirana etanolom i surutkom

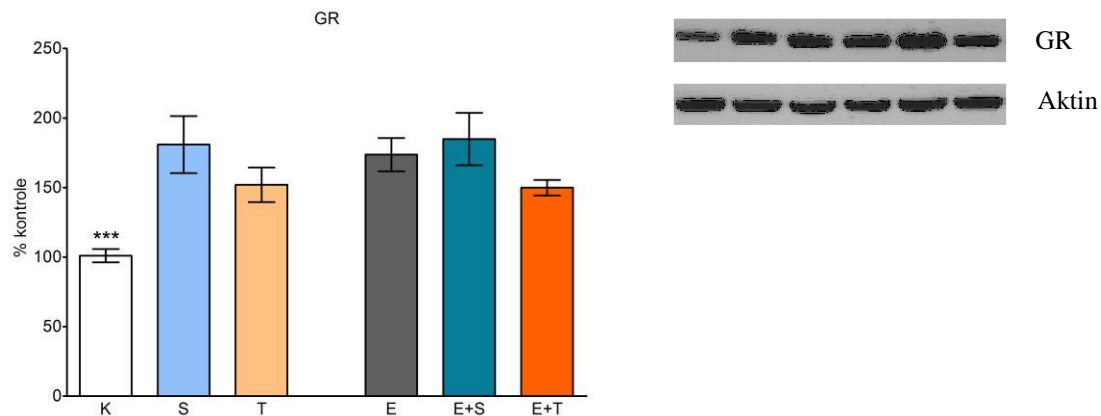
(E+S) pokazuje statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) u odnosu na skoro sve ostale grupe.



Grafikon 29. Western blot GSH-Px (% kontrole) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), $*(p < 0,05)$

5.6.5. Western blot enzima glutation reduktaze (GR)

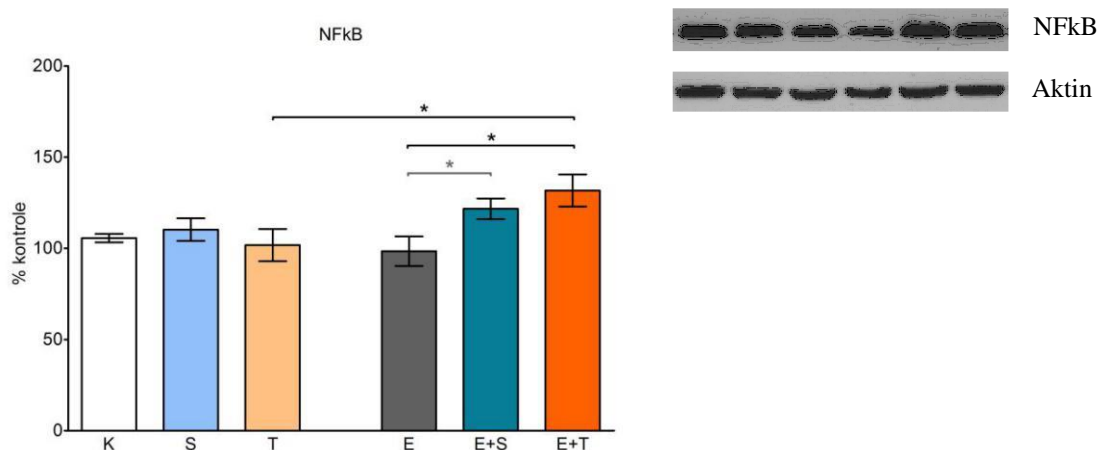
Rezultati merenja western blot nivoa GR u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 30. Statistički značajno povećanje ($p < 0,001$) postoji kod svih eksperimentalnih grupa (S, T, E, E+S i E+T) u odnosu na kontrolnu.



Grafikon 30. Western blot GR (% kontrolne) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), ***($p < 0,001$)

5.6.6. Western blot NFkB

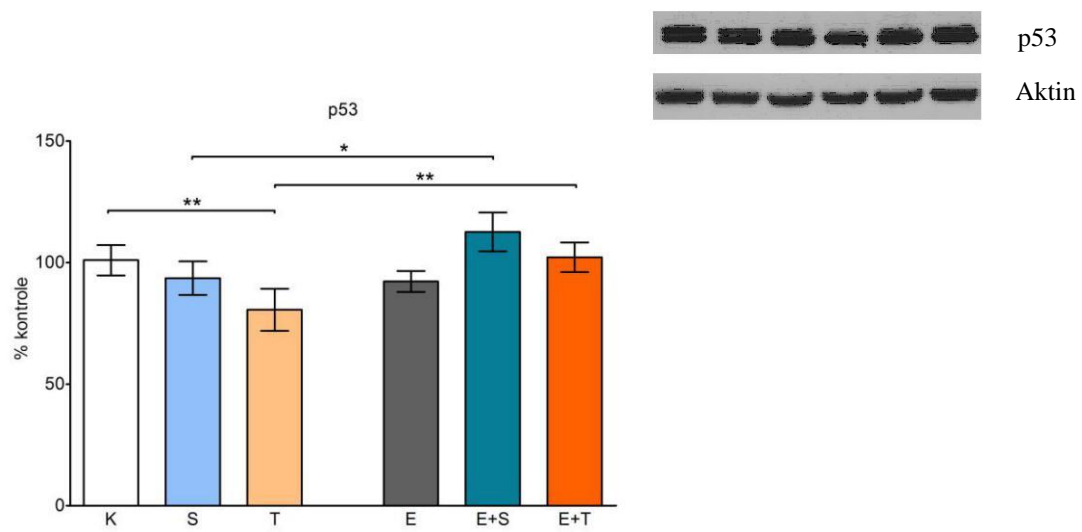
Rezultati merenja western blot nivoa NFkB u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 31. Postoji statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) NFkB kod grupe životinja tretirane etanolom i tikvinim uljem (E+T) u odnosu na grupu životinja tretiranu tikvinim uljem (T) i grupu životinja tretiranu etanolom (E). Statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) ovog pokazatelja inflamacije postoji i kod grupe životinja tretirane etanolom i surutkom (E+S) u odnosu na grupu životinja tretiranu etanolom (E).



Grafikon 31. Western blot NFκB (% kontrolne) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E- etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), *($p < 0.05$)

5.6.7. Western blot p53

Rezultati merenja western blot nivoa p53 u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K) i eksperimentalnim grupama tretiranim surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) prikazani su na grafikonu 32. Postoji statistički značajno smanjenje nivoa p53 ($p < 0,01$) između grupe životinja tretirane tikvinim uljem (T) u odnosu na kontrolnu (K) i grupu životinja tretiranu etanolom i tikvinim uljem (E+T). Grupa životinja tretirana surutkom (S), takođe pokazuje statistički značajno smanjenje nivoa p53 ($p < 0,05$) u odnosu na grupu životinja tretiranu etanolom i surutkom (E+S). Između ostalog, vidi se da je nivo ovog proteina veći kod etanolskih (E+S i E+T) u odnosu na grupe životinja koje su tretirane samo surutkom (S) i tikvinim uljem (T).



Grafikon 32. Western blot p53 (% kontrole) kontrolne (K) i eksperimentalnih grupa (S- surutka, T-tikvino ulje, E-etanol, E+S- etanol i surutka, E+T- etanol i tikvino ulje), *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$)

9. Diskusija

6.1. Histopatološki nalazi

Mnoga naučna istraživanja kao i svakodnevna praksa u medicini zabeležili su da hronično konzumiranje alkohola dovodi do morfoloških i funkcionalnih oštećenja mnogih organa, ali osetljivost na njegovo toksično dejstvo najčešće se vidi u jetri. Efekti navedenog toksičnog dejstva etanola zabeleženi su i u ovoj studiji, a u literaturi je definisan sekvencijalni razvoj patoloških promena koji određuje stanje koje se naziva Alkoholna bolest jetre.

Primena 12% etanola (0,254 g/L u krvi), ad libitum, u vidu vode za piće tokom 6 nedelja dovela je do značajnih patohistoloških promena u jetri tretiranih životinja. Etanol je izazvao statistički značajno izraženu kongestiju, dilataciju centralne vene, dilataciju grane vene porte, hiperplaziju Kupferovih ćelija, masne hepatocitne promene i fokalnu nekrozu hepatocita.

Alkoholna bolest jetre (ALD) ima tri kategorije histopatoloških promena: steatozu, steatohepatitis i steatofibrozu. Sve ove promene mogu nastati pri hroničnom konzumiranju alkohola kao posledica direktnog toksičnog dejstva alkohola i indirekto, preko toksičnih dejstava njegovih metabolita. Oštećenje jetre izazvano etanolom je dozno i vremenski zavisno što znači da do patohistoloških promena kao što je masna jetra dolazi tek kod osoba koje piju više od 60g alkohola po danu duži vremenski period. Prva promena kod hronične zloupotrebe alkohola je steatoza odn. masna jetra. Steatoza podrazumeva nagomilavanje neutralnih masti u hepatocitima. Ona je reverzibilna, najranija i najčešća manifestacija oštećenja jetre alkoholom i u našoj studiji grupa životinja tretirana alkoholom pokazala je promene koje su karakteristične za početnu fazu alkoholne bolesti jetre i to fokalnu nekrozu hepatocita sa diskretnim do umerenih masnih promena, izraženu dilataciju grane vene porte, izraženu do veoma izraženu kongestiju, sa uočljivom neutrofilnom infiltracijom, kao i

umerenu infiltraciju portnog prostora limfocitima i plazmocitima i hiperplaziju Kupferovih ćelija, koja se kreće od umerene do izražene.

U patogenezi steatoze učestvuje nekoliko mehanizama, a svi dovode do viška triglicerida u hepatocitima: povećano dopremanje masnih kiselina u jetru, povišena sinteza masnih kiselina iz acetata, smanjena oksidacija masnih kiselina, povećana retencija triglicerida zbog nedostatka apo proteina koji je neophodan za njihovo izlučivanje iz hepatocita u cirkulaciju (Atanacković, 2010). Alkohol izaziva masnu promenu jetre preko pomenutih mehanizama oštećujući mitohondrijalne i mikrozomalne funkcije. Akumulacija masti u početku se manifestuje pojavom malih masnih vakuola oko jedra. To predstavlja mikrovezikularnu promenu. Ove vakuole se vremenom spajaju u jednu veliku masnu vakuolu koja potiskuje jedro na periferiju ćelije, pa hepatocit liči na masnu ćeliju (Atanacković, 2010). Hepatociti životinja u našoj studiji razvili su umerene masne promene tokom ekspozicije alkoholu.

Steatohepatitis je histološki obrazac koji može da se vidi kod hroničnih konzumenata alkohola i može biti prouzrokovan direktnim dejstvom alkohola ili višestrukim nealkoholnim etiološkim faktorima (nealkoholni steatohepatitis). Steatohepatitis karakterišu inflamacija parenhima, oštećenje hepatocita i fibroza. Budući da fibroza nije prisutna u jetrama pacova tretiranih alkoholom u našoj studiji, govorimo o oštećenjima koja nisu progresivna i pripadaju početnoj fazi alkoholne bolesti jetre sa histološkim pokazateljima steatoze i inflamacije.

Alkoholna ciroza je treći stadijum alkoholne bolesti jetre i predstavlja ireverzibilnu difuznu fibronodulusnu transformaciju jetre. Karakteriše se uniformnim regenerativnim nodulusima parenhima od kojih je većina promena manja od 3 mm (Atanacković, 2010). U našem istraživanju, histopatološki znaci ciroze nisu uočeni.

Nalazi iz naše studije slažu se sa prethodnim istraživanjima u literaturi gde su slične promene zabeležili i drugi autori. U studiji (Dahiru i Obidoa 2008) hronična konzumacija alkohola (40% v/v 1ml/100g per os u trajanju od 6 nedelja kod pacova dovela do izražene nekroze hepatocita agregaciju mononuklearnih ćelija, masnu

degeneraciju u centralnim i srednjim zonama koja je karakteristična za oštećenje jetre. U navedenoj studiji morfološke promene jetre izražene su i predstavljaju tipične promene koje definišu manifestnu formu alkoholne bolesti jetre. U našoj studiji, histopatološki nalazi su u grupi tretiranoj alkoholom pokazali promene koje su blaže u odnosu na navedenu studiju, pa možemo zaključiti da je razlog ove razlike primenjena doza tj. procenat etanola koja bez obzira na isto trajanje eksperimenta u našoj studiji značajno manja. Unos alkohola kod životinja u našem istraživanju iznosio je 3,12 ml odn. 2,46g alkohola/danu. Takođe je bitno napomenuti da je procenat alkohola u našoj studiji u grupama životinja koja su tretirane alkoholom najmanji u odnosu na eksperimentalne grupe drugih autora, u kojima doduše često nedostaju izmerene koncentracije alkohola u krvi tretiranih životinja. Koncentracija etanola u krvi eksperimentalnih životinja u našoj studiji bila je najveća u grupi koja je tretirana etanolom i tikvinim uljem (E+T) (0,372 g/L), zatim sledi grupa tretirana etanolom i surutkom (E+S) (0,331 g/L), dok je najmanja koncentracija zabeležena u grupi kojoj je davan samo etanol (E) (0,254 g/L). Koncentracija etanola u butnom mišiću bila je najveća je u grupi tretiranoj etanolom i surutkom (E+S) (0,860 g/kg), zatim u grupi tretiranoj etanolom i tikvinim uljem (E+T) (0,559 g/kg), dok je najmanja koncentracija zabeležena u grupi kojoj je davan samo etanol (E) (0,256 g/kg).

Dakle, navedene koncentracije alkohola u krvi i butnom mišiću i primenjena doza od 2,46g/danu u hroničnoj primeni tokom šest nedelja dovele su do razvoja promena koje su karakteristične za početnu fazu alkoholne bolesti jetre odn. steatoze, ali ne i do progresivnijih formi alkoholne bolesti jetre.

Posmatrajući grupe životinja koje su pored etanola i redovne ishrane, dobijale istovremeno i surutku ili tikvino ulje, vidimo da je oralna primena surutke u dozi od 2g/kg/dan (E+S) i tikvinog ulja u dozi od 2 mL/kg/dan TT (E+T) kod alkoholisanih životinja u toku 6 nedelja smanjila kongestiju, dilataciju centralne vene, dilataciju grane vene porte, hiperplaziju Kupferovih ćelija, masne hepatocitne promene i fokalnu nekrozu hepatocita. Na osnovu ovih rezultata surutka i tikvino ulje delovali su protektivno na promene koje izaziva alkohol u toku hronične ekspozicije. Grupe

životinja koje su tretirane samostalno surutkom (S) i samostalno tikvinim uljem (T) imale su diskretne i umerene promene poput blage kongestije, dilatacije grane vene porte, dilatacije centralne vene, ali nisu imale promene poput inflamacije portnih prostora, hiperplazije Kupferovih ćelija, masne hepatocitne promene i fokalnu nekrozu hepatocita. Rezultati kombinovane primene etanola i surutke i etanola i tikvinog ulja dakle, pokazali su hepatoprotektivna dejstva surutke i tikvinog ulja na navedene histopatološke promene i na osnovu takvog nalaza primećujemo da surutka i tikvino ulje pri istovremenoj primeni dovode do sprečavanja oštećenja koje je alkohol izazvao samostalno primenjem. Hepatoprotektivni efekti surutke i tikvinog ulja u našoj studiji slažu se sa hepatoprotektivnim nalazima iz literature drugih autora.

U mnogim prethodnim studijama ispitivan je efekat surutke i tikvinog ulja u cilju saniranja i regeneracije oštećenja koja su izazivana toksičnim dejstvom etanola i drugih toksičnih agenasa.

U jednoj takvoj naučnoj studiji na miševima (Zhao i sar., 2014), hepatoprotektivni efekti proteina surutke pokazani kod hroničnog tretmana etanolom. Surutka je u toj studiji dovela do regresije histopatoloških promena kao što su penasta degeneracija i edem hepatocita, prethodno izazvanih alkoholnim oštećenjem. Kao mehanizmi kojim surutka dovodi do poboljšanja histopatološkog nalaza navode se uticaji proteina surutke na smanjenje produkcije slobodnih radikala indukovanih nakon ekspozicije etanolu kao i aktivacija regenerativnih procesa.

Protektivni efekti izolata proteina surutke (WPI), alfa-laktalbumina (α -LA) i beta-laktoglobulina (β -LG) pokazani su i na oštećenju jetre pacova kojima je hepatotoksičnost indukovana oralno primenom paracetamola (500 mg/kg) i alkohola (5ml/kg) tokom dve i četiri nedelje (Eliwa, 2014). Alkohol i Paracetamol su u toj studiji doveli do narušavanja arhitektonike hepaticnih ćelija i hepaticnih lobulusa i doveli do deponovanja kolagena u formi debelih fibroznih septi, kongestije vene centralis i degeneracije hepatocita. Rezultati navedene studije pokazali su da WPI-A, α -LA i β -LG mogu da obezbede tretman kod paracetamolom i alkoholom

indukovanog oksidativnog stresa. U toj studiji takođe je zaključeno da oksidativni stres ne samo što može da pogorša neke aspekte etanolom indukovanih oštećenja, nego potencijalno promovšući imuni odgovor može imati ulogu u održavanju hronične inflamacije koja je važna za razvoj fibroze. Tretman WPI-A, α -LA i β -LG značajno je redukovala histološke alteracije indukovane paracetamolom i alkoholom u čemu se ogleda njihova antioksidantna aktivnost.

Hepatoprotektivni efekti surutke pokazani su i u mnogim istraživanjima, gde oštećenja jetre nisu izazvana dejstvom alkohola već drugim hepatotoksičnim agensima. Jedna takva studija (Eldenshary, 2015) pokazala je da proteini surutke u dozi od (100, 200 mg/kg, p.o.) tokom 30 dana imaju značajan uticaj na reverziju histopatoloških promena izazvanih istovremenom primenom ugljenik-tetrahlorida (CCl_4) i fluvastatina koji su prethodno doveli do vakuolarne degeneracije hepatocita, fokalne ćelijske infiltracije, kompletno narušene arhitektonike tkiva jetre, aberacije molekula DNK, i fibroze.

Protektivno dejstvo proteina surutke pokazano je i u studiji na pacovima (Kume i sar., 2006) kod kojih je galaktozaminom izazvan razvoj fibroze jetre. Galaktozamin je u ovoj studiji doveo do fokalne nekroze, pojave Kauncilmanovih telašaca, proliferacije Kupferovih ćelija, ali i drugih inflamatornih ćelija kao što su neutrofili i limfociti. Primena surutke u ovoj studiji dovela je do usporenja razvoja portalne fibroze, proliferacije bilijarnih duktusa i invazije mononuklearnih ćelija.

Publikacije o dejstvu surutke na akutna oštećenja jetre ukazala su takođe na njena protektivna dejstva. U jednoj takvoj studiji (Oryan i sar., 2011) gde je hepatotoksičnost indukovana akutnom primenom dimetilnitrozaminom (DMN), proteini surutke doveli su do supresije razvoja histopatoloških promena kao što su hemoragija, nekroza, hiperemija centralne vene oštećenje endotelnih ćelija, teleangiektazije i infiltracije parenhima inflamatornim ćelijama.

U literaturi postoji ne tako veliki broj studija koje su se bavile ispitivanjem hepatoprotektivnih efekata tikvinog ulja. Tikvino ulje iz semena (*Curcubita pepo* L.)

je bogat izvor nezasićenih masnih kiselina, antioksidanasa, vlakana i ima anti-aterogeni i hepatoprotektivni efekat (Makni i sar., 2008). Poznato je da se tikva kao biljka koristi u medicini. U mnogim zemljama tikva se tradicionalno koristi u lečenju dijabetesa kao i u terapiji protiv parazitarne oboljenja. S obzirom da je bogato linoleinskom, oleinskom kiselinom i tokoferolom, ulje tikvinog semena se koristi kao dodatak raznim dijetama, a njegova podobnost je iskorišćena i u industrijskoj primeni (Stevenson i sar., 2007). U tikvinom ulju je pronađeno dosta biološki aktivnih sastojaka kao što su steroli, peptidi, polisaharidi i para-amino benzoeva kiselina (Gossell-Williams i sar., 2008). Glavni sastojci tikvinog ulja su: omega 6 esencijalna masna kiselina, fitosteroli, i antioksidansi kao što su karetinoidi, vitamin A i vitamin E (Murkovic i sar., 1996). Linoleinska kiselina koja se nalazi u ulju tikvinog semena ima značajan uticaj na fluidnost membrane čime poboljšava osmozu i olakšava razmenu gasova intra i ekstracelularno (Lovejoy, 2002). Pored nezasićenih, tikvino ulje sadrži i zasićene masne kiseline kao što su palmitinska i stearinska (Kulaitiene i sar., 2007). Prethodno navedene supstance u sastavu tikvinog ulja imaju antiinflamatorni efekat i kao takve smanjuju inflamaciju pokrenutu alkoholom i njegovim metabolitima čime potenciraju regenerativnu sposobnost oštećene jetre.

U studiji (Seif Abou Sayed, 2014), norveškim pacovima (*rattus Norvegicus*) kojima je prethodno izazvano oštećenje etanolom, primenjeno je tikvino ulje sa ciljem ispitivanja njegovih protektivnih efekata na jetru. Pacovi su bili podeljeni u četiri grupe: kontrolna netretirana kojima je davana samo destilovana voda u toku četiri nedelje, druga grupa dobijala je 10% etanol u pijaćoj vodi, treća grupa dobijala je 50 mg/kg TT tikvinog ulja tri puta nedeljno tokom tri nedelje i 10% etanol tri puta nedeljno tokom prve dve nedelje. Histopatološki, portni prostorijetre pacova koji su tretirani alkoholom pokazali suizraženu dilataciju i kongestiju portne vene kao i u našem eksperimentu, zajedno sa periduktalnom fibrozom oko bilijarnih kanala koja u našoj studiji nije prisutna. Takođe je došlo do pojave masnih promena u svim hepatocitima pacova tretiranih 10% alkoholomkoje se nisu razlikovale u odnosu na grupu pacova koji su prethodno tretirani tikvinim uljem, za razliku od našeg

istraživanja gde je tikvino ulje dovelo do sprečavanja promena koje je alkohol izazvao samostalno primenjen i time pokazalo svoje hepatoprotektivno dejstvo. Kao što možemo da vidimo na osnovu prethodne studije, histopatološki nalazi pacova prethodno tretiranih tikvinim uljem u dozi od 50 mg/kg TT tri puta nedeljno u toku tri nedelje ne razlikuju se od grupe kojoj je izazvano oštećenje 10% alkoholom. Sa druge strane, tikvino ulje pokazalo je hepatoprotektivan efekat u studiji (Sayed Abdel Aal, 2014) na albino pacovima gde je oštećenje izazvano imunosupresivnim lekom, azatioprinom. Naime, u toj studiji životinje su bile podeljene u četiri grupe: kontrolnu netretiranu grupu, grupu kojoj je samostalno davano tikvino ulje u dozi od (4mL/dan), grupu kojoj je dat azatioprin u dozi od (15mg/dan) i grupu koja je istovremeno tretirana azatioprinom i tikvinim uljem (4 mL/15mg/dan). Eksperiment je trajao četiri nedelje. Histopatološki nalazi u grupi tretiranoj tikvinim uljem nisu pokazali razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa tretirana azatioprinom pokazala je strukturne promene u histološkoj slici jetre sa piknotičnim jedrima u hepatocitima pomerenih na periferiju citoplazme, zatim dilatirane centralne vene, portalne prostore sa dilatiranim krvnim sudovima okruženih inflamatornim ćelijama. Grupa gde je kombinovano primenjen azatioprin sa tikvinim uljem pokazala je da je tikvino ulje poboljšalo histološki izgled jetre koji je nakon njegove primene vratio normalnu arhitektoniku, smanjenje inflamatornih ćelija u portnom prostoru i sinusoidima, uprkos postojanju pojedinih delova gde je bila prisutna kongestija i nekoliko vakuolisanih hepatocita sa piknotičnim jedrima.

Rezultati u našem istraživanju slažu se sa protektivnim efektima tikvinog ulja navedenih u prethodnoj studiji.

Što se tiče promena u jetri po tipu edema ćelija, ovakve promene nisu viđene ni u kontrolnoj (K) ni u grupi životinja tretiranoj alkoholom (E). Grupe životinja tretirane samo surutkom (S), surutkom i etanolom (E+S) i tikvinim uljem i etanolom (E+T) imale su samo diskretne do umerenih promena, a grupa životinja tretirana tikvinim uljem (T) pokazuje umeren do veoma izražen edem ćelija. Ovaj edem možemo objasniti kao posledicu nakupljanja proteina u hepatocitima intracelularno i

posledično povećanje osmotskog pritiska koje je dovelo do nakupljanja vode odnosno nastanka edema ćelije. Linoleinska kiselina, u velikom procentu zastupljena u tikvinom ulju, dovodi do povećanja intra i ekstracelularne razmene, pa bi nakupljanje ovih proteina odnosno edem hepatocita mogao da se objasni uticajem linoleinske kiseline na osmotsku aktivnost hepatocita, s obzirom na to da je navedena histopatološka promena izražena u grupi životinja tretiranoj samostalnom primenom tikvinog ulja.

Novoformirani žučni duktusi, nisu viđeni ni u kontrolnoj netretiranoj grupi životinja (K), niti u grupama tretiranih surutkom (S) i tikvinim uljem (T). U grupi životinja tretiranoj 12% etanolom (0,254 g/L u krvi) (E) viđene su diskretne i umerene pojave novoformiranih žučnih duktusa, dok su grupe tretirane surutkom i etanolom (E+S) i tikvinim uljem i etanolom (E+T) imale umerenu i izraženu pojavu novoformiranih žučnih duktusa. Kako novoformirani žučni duktusi predstavljaju kompenzatorne mehanizmeu toku regeneracije oštećenih hepatocita sugerišemo da je primena surutke u dozi od 2g/kg TT i tikvinog ulja u dozi od 2 mL/kg TT tokom 6 nedelja pokazala hepatoprotektivan efekat.

Porast telesne mase zabeležen je u svim grupama životinja sa promenom od prve do šeste nedelje trajanja eksperimenta. Najveći porast mase uočen je u grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem, a potom slede grupe tretirane etanolom (E), etanolom i surutkom (E+S) i etanolom i tikvinim uljem (E+T). Kontrolna (K) i grupa tretirana surutkom (S) imaju najmanju promenu telesne mase od svih grupa. Potrošnja hrane bila je veća u ne-etanolskim (K,S,T) u odnosu na etanolske grupe (E, E+S i E+T) pri čemu je potrošnja hrane opadala u poslednje tri nedelje kod svih grupa životinja. Na osnovu ovih nalaza možemo da pretpostavimo da je hronična konzumacija alkohola u eksperimentalnim grupama smanjila potrebu životinja za uobičajenom dnevnom ishranom koja je postojala tokom prve tri nedelje eksperimenta. Alkohol je verovatno svojom kalorijskom vrednošću kompenzovao potrebe za hranom pa su shodno tome životinje manje uzimale redovne svakodnevne obroke, a pritom je telesna masa bila povećana u etanolskim grupama u odnosu na kontrolu.

Na osnovu histopatoloških nalaza i na osnovu poređenja sa prethodnim studijama, primena tikvinog ulja i surutke dovela je do hepatoprotektivnih efekata pri kombinovanoj primeni sa etanolom. Ovakvi nalazi pokazuju da pored protektivnih efekata koje surutka i tikvino ulje imaju nakon prethodno izazvanog oštećenja etanolom, zabeleženih u prethodnim studijama, protektivni potencijal surutke i tikvinog ulja ostvaruje se i pri njihovoj kombinovanoj primeni sa etanolom i time se ostvaruje sprečavanje razvoja histopatoloških oštećenja koje alkohol izaziva pri hroničnoj primeni.

6.2. Biohemijski pokazatelji funkcije jetre

Funkciono ispitivanje jetre zasniva na ispitivanju mnogobrojnih promena biohemijskih parametara koji prate oboljenja jetre i žučnih puteva. Pri tome, polazi se od činjenice da jetra ima ključnu ulogu u brojnim intermedijarnim metaboličkim procesima, kao što su npr. sinteza ugljenih hidrata, lipida i brojnih proteina. Jetra pored toga prihvata i skladišti materije koje se apsorbuju iz digestivnog trakta, ali i vrši detoksikaciju(biotransformaciju) tih materija preko metaboličke konverzije uključujući mnogobrojne enzime u tim procesima. Budući da povećanje nivoa enzima i poremećaji u lipidnom profilu jetre predstavljaju markere oštećenja jetre, u ovom istraživanju određivani su parametri jetrine funkcije čije su promene u literaturi bile zastupljene prilikom hronične ekspozicije etanolu kao i prilikom tretmana surutkom i tikvinim uljem.

U ovom radu, u grupi životinja tretiranoj 12% etanolom (0,254 g/L u krvi) tokom 6 nedelja (E) nisu uočeni statistički značajna povećanja ispitivanih biohemijskih pokazatelja: alanin aminotferaza (ALT), aspartat aminotferaza (AST), de Ritisov koeficijent, i bilirubin. U ostalim grupama (S, T, E+S i E+T) takođe nije došlo do statistički značajnih promena u vrednostima navedenih biohemijskih

parametara. Aminotransferaze katalizuju prenošenje amino-grupe (NH₂) sa jedne amino-kiseline na drugu ketonsku kiselinu. U slučaju oštećenja hepatocita aminotransferaze prelaze u krv i zato se mogu smatrati vrlo osetljivim indeksom nekroze jetrinih ćelija, odnosno, specifičnim parametrom hepatocelularnog oštećenja. Koncentracije aminotransferaza u krvi predstavljaju značajan marker hronične ekspozicije etanolu. Studije u humanoj populaciji pokazale su da je povećanje nivoa aminotransferaza u plazmi u vezi sa sadržajem gvožđa u organizmu, telesnom masom i količinom unosa alkohola (Whitfield i sar., 2001, Alatalo i sar., 2008; Liangpunsakul i sar., 2010) pri čemu je studija (Liangpunsakul i sar., 2010) ukazala na beznačajnost testova za određivanje nivoa aminotransferaza ukoliko je unos alkohola manji od dva pića dnevno ili malo više od dva pića dnevno. Unosi alkohola veći od navedene količine dovode do povećanja aktivnosti aminotransferaza. Akutna ekspozicija alkoholu ne dovodi do značajnih promena aktivnosti aminotransferaza, uključujući izlaganje i niskim i visokim dozama pokazala je studija na pacovima (Li i sar., 2004). Hronična ekspozicija alkoholu međutim, povećava nivo ALT u plazmi, bez promene nivoa AST (Hakucho i sar., 2013). U prethodnim publikacijama na pacovima, tretman 35% alkoholom doveo je do povećanja aminotransferaza (Bourogaa E. i sar. 2013; Kasdallah-Grissa i sar., 2008). S obzirom na to da šestonedeljna doza 12% alkohola (0,254g/L) u našem istraživanju nije izazvala značajno povećanje navedenih biohemijskih parametara kao i njihovog odnosa koji predstavlja De Ritisov koeficijent, dobijeni rezultat navedenih pokazatelja ide u prilog nižoj primenjenoj dozi alkohola kao i nižoj koncentraciji alkohola u tretmanu.

Bilirubin, takođe bitan parametar u proceni oštećenja jetre, je raspadni proizvod hemoglobina, a najveći deo (oko 80 %) nastaje razgradnjom hema iz hemoglobina oštećenih eritrocita u ćelijama retkuloendotelnog sistema. Manji deo oslobađa se raspadom mioglobina, citohroma i peroksidaze. Ukupni bilirubin u serumu čine tri frakcije: nekonjugovani ili indirektni bilirubin, konjugovani ili direktni i delta bilirubin. Metabolizam bilirubina zavisi od aktivnosti mikrozomalne UDP-glukuronil transferaze koja je važna za njegovu konjugaciju, kao i od

dostupnosti UDP- glukuronil kiseline i njenog prekursora UDP-glukoze (Sato, i sar., 1985). Hronična konzumacija etanola dovodi do povećanja aktivnosti UDP glukuronil transferaze zabeleženo je u studijama (Ideo i sar., 1971; Yost i sar., 1983). Međutim, formiranje glukuronid konjugata zavisi od kontinuirane produkcije UDP-glukuronske kiseline i može biti inhibirano povećanjem odnosa NADH/NAD⁺ prilikom oksidacije etanola (Lieber, 1985). Budući da bilirubin nije povišen pri ekspoziciji etanolu u našoj studiji, smanjenje produkcije UDP-glukuronske kiseline tokom oksidacije etanola može biti razlog takvog nalaza.

Kao dijagnostički bitan enzim u proceni stanja jetrine funkcije i oštećenja važna je procena nivoa alkalne fosfataze. Alkalna fosfataza je enzim koji transportuje metabolite kroz ćelijsku membranu. Bolesti kostiju i jetre su najčešći uzroci patološkog povećanja nivoa ALP-a, iako ALP može poticati i iz ostalih tkiva, kao što su placenta, bubrezi, intestinalni trakt ili leukocita (Fishman i sar., 1990). Treći trimestar graviditeta i rast i razvoj su povezani sa izolovanim povećanjem nivoa ALP-a u serumu (Dufour i sar., 2000).

Alkalna fosfataza je u našoj studiji značajno smanjena u grupi pacova koji su konzumirali alkohol u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu, ali je smanjena i u ostalim grupama u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Snižena vrednost ALP-a viđa se u deficitu magnezijuma, jer je on potreban za aktivaciju ovog enzima. U studiji na ženjkama pacova, dijeta sa deficitom magnezijuma dovela je do smanjenja nivoa ALP u krvi (Heaton, 1965). Razlog smanjenja nivoa alkalne fosfataze u grupi pacova koja je konzumirala alkohol u našoj studiji možda može biti i smanjena motorna aktivnost pacova kao posledica sedirajućeg dejstva alkohola na centralni nervni sistem, s obzirom na to da postoji jedna studija (Ashizawa i sar., 1998) sprovedena na neutreniranim muškarcima kod kojih nakon prekida treniranja dolazi do pada aktivnosti ALP. Razlog smanjenja u ostalim grupama životinja kod kojih etanol nije primenjen ostaje nepoznat.

Laktat dehidrogenaza je enzim prisutan u različitim količinama u citoplazmi svih ćelija. Povišena aktivnost LDH u serumu uočava se u mnogim patološkim stanjima, pa nema veliku dijagnostičku i diferencijalno dijagnostičku vrednost (LDH nije specifičan za jedan organ). Laktat dehidrogenaza je u našoj studiji statistički značajno povećana u grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem u odnosu na kontrolnu grupu životinja i grupu tretiranu samostalnom primenom surutke kao i u grupi životinja tretiranoj etanolom i surutkom (E+S) u odnosu na grupu životinja tretiranu etanolom (E) surutkom (S) i kontrolnu netretiranu grupu životinja (K). 12 % etanol (0,254 g/L u krvi) tokom šest nedelja u našem istraživanju nije doveo do statistički značajnog povećanja enzima laktat dehidrogenaze. Nalazi iz jedne prethodne studije (Sieg i Seitz 1987) u kojoj je primenjen alkohol u koncentraciji od 6,6% vol/vol takođe ukazuju na nezabeleženo povećanje LDH. Na osnovu ovakvog literaturnog podatka, možemo da primetimo da je primenjena doza i procenat etanola u našoj studiji verovatan razlog zbog čega nije došlo do povećanja LDH. Sa druge strane, primena surutke i etanola i tikvinog ulja samostalno, dovela je do značajnog povećanja vrednosti ovog enzima. Budući da su pojedini autori u svojim istraživanjima pronašli da je aktivnost LDH 1, LDH 2 i LDH3 povećana kod pacova tretiranih visokim procentom skroba, navodi se da narušavanje nutritivnog statusa može dovesti do povećanja ovog enzima (Markert, 1975). Laktat dehidrogenaza je enzim sa ulogom u reakciji pretvaranja laktata u piruvat. Za ovu reakciju je potreban NADH. Mehanizam kojim surutka u kombinaciji sa etanolom i tikvino ulje samostalno dovode do povećanja aktivnosti ovog enzima može biti remećenje odnosa NAD/NADH tokom njihovog metabolizma, pa je kao posledica toga moguće da aktivnost ovog enzima bude veća. Iako kombinovana primena surutke i etanola dovode do povećanja LDH, histopatološki nalazi u ovoj studiji pokazali su neosporne protektivne efekte surutke pri istovremenoj primeni sa alkoholom.

Kako se u literaturi (Gupta i Figueredo 2014; Ojeda i sar. 2008) navode promene lipidnog profila tokom hronične konzumacije alkohola i alkoholne bolesti jetre, u ovoj studiji određivali smo vrednosti pokazatelja lipidnog statusa u serumu

kao i uticaj samostalne primene tikvinog ulja, surutke kao i kombinovane primene tikvinog ulja i surutke sa etanolom na nivoe lipida.

Nivoi ukupnog holesterola se statistički ne razlikuje među grupama. Prethodne studije (Brien i sar., 2011) u humanoj populaciji pokazale su da alkohol ne dovodi do povećanja ukupnog holesterola što je potvrđeno i u našoj studiji. Istovremena primena alkohola i surutke i alkohola i tikvinog ulja takođe nisu dovele do promena u koncentracijama holesterola.

Kada su u pitanju trigliceridi, u našem istraživanju zabeleženo je statistički značajno povećanje koncentracije triglicerida u ne-etanolskim u odnosu na etanolske grupe životinja odn. u grupama tretiranim samostalnom primenom surutke i tikvinog ulja u odnosu na grupu tretiranom etanolom, etanolom i surutkom i etanolom i tikvinim uljem. Prethodne studije (Brien i sar., 2011) u humanoj populaciji pokazale su da alkohol ne dovodi do povećanja triglicerida, osim kada su doze veće od 60 g/alkohola po danu. Masne kiseline i holesterol nastaju razlaganjem masti unetih hranom, apsorbujući se u intestinalnim ćelijama mukoze u kojima se re-esterifikuju do triglicerida i holesterol estara. Zajedno sa fosfolipidima, apolipoproteinima Apo AI i Apo B izlučuju se iz ćelija u limfni sistem kao hilomikroni, koji zatim preko grudnog voda ulaze u sistemsku cirkulaciju. Ovaj metabolički put označen je kao egzogeni lipidni put. Endogeni lipidni put počinje u jetri, koja je glavni izvor endogenih lipida. Trigliceridi se sintetišu iz glicerola i masnih kiselina, koji u jetru dospevaju iz depoa masti ili se sintetišu iz glukoze (Vodič za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja, 2011). U našoj studiji samostalna primena tikvinog ulja i surutke dovele su do povećanja triglicerida i razlog tog povećanja može biti upravo visoka nutritivna vrednost surutke i tikvinog ulja, a budući da je potrošnja hrane u toku ovog istraživanja bila najveća u ne-etanolskim grupama odn. u kontrolnoj i grupama životinja koje su samostalno tretirane tikvinim uljem i surutkom velika je mogućnost da je razlog tog povećanja upravo povećan kalorijski unos.

Za razliku od triglicerida nivo LDL-holesterola je statistički značajno veći u etanolskim nego u ne-etanolskim grupama životinja. Indeks ateroskleroze koji predstavlja količnik između LDL i HDL takođe je povišen u etanolskim u odnosu na ne-etatolske grupe. Statistički značajno povećanje LDL-holesterola postoji u grupi životinja tretiranoj etanolom i tikvinim uljem u odnosu na kontrolnu grupu životinja, grupu tretiranoj tikvinim uljem i grupi tretiranoj etanolom i surutkom. Može se reći da je kombinovana primena 12% etanola i tikvinog ulja u dozi od 2 mL/kg TT tokom 6 nedelja dovela do povećanja LDL-holesterola u odnosu na sve tretirane grupe osim grupe tretirane etanolom. Pojedine prethodne studije pokazale su povećanje LDL holesterola pri hroničnoj konzumaciji alkohola (Baraona i Lieber, 1970). Naime, konzumacija etanola dovodi do povećanja dostupnosti masnih kiselina u jetri i samim tim veću mogućnost za njihovo deponovanje u jetri kao i povećano oslobađanje putem lipoproteina. Endoplazmatski retikulum je mesto gde se vrše reakcije lipidne esterifikacije i produkcije lipoproteina. Moguće je da proliferacija glatkog endoplazmatskog retikuluma indukovana etanolom igra važnu ulogu u povećanju kapaciteta jetre za produkcijom lipoproteina navodi se u pojedinim publikacijama (Iseri i sar., 1966; Lane i Lieber, 1966; Rubin i Lieber, 1967).

Tikvino ulje međutim, istovremeno primenjeno sa etanolom takođe dovodi do povećanja LDL holesterola. Budući da u literaturi nema mnogo studija koje su se bavile protektivnim efektima tikvinog ulja kod alkoholom izazvanog oštećenja jetre, a naročito nema dovoljno literaturnih podataka o uticaju tikvinog ulja na lipidni profil pri istovremenoj primeni sa etanolom, ostaje pitanje na koji način sastojci tikvinog ulja dovode do povećanja LDL-holesterola i indeksa ateroskleroze. Pojedine studije (Nanji i sar. 1989; Nanji i French, 1989) su pokazale da kombinacije pojedinih supstanci i etanola dovode do razvoja alkoholne bolesti jetre što je pokazano kombinovanom primenom etanola i kukuruznog ulja bogatog linoleinskom kiselinom (Nanji i sar. 1989). Navodi se takođe da povećani unos polinezasićenih kiselina u kombinaciji sa alkoholom pospešuje oksidativni stres. Budući da postoje takvi podaci u literaturi moguće je da pojedini sastojci tikvinog ulja pri istovremenoj primeni sa

alkoholom nekom vrstom interakcije dovode do poremećaja metabolizma i povećanja ove klase lipoproteina. Iako alkohol i tikvino ulje istovremeno primenjeni dovode do povećanja LDL holesterola i indeksa ateroskleroze, neosporno je da njihova kombinacija ima hepatoprotektivne efekte koji su potvrđeni histopatološkim nalazima u ovoj studiji

Nivo HDL holesterola, statistički je značajno smanjen u grupama životinja tretiranih surutkom, tikvinim uljem i etanolom u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Konzumiranje 12% (0,254 g/L u krvi) etanola tokom 6 nedelja kao i samostalni tretman surutkom u dozi od 2g/kg TT i samostalni tretman tikvinim uljem u dozi od 2 ml/kg TT doveli su dakle do pada nivoa HDL-holesterola u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu životinja. Kombinovana primena surutke i etanola i tikvinog ulja i etanola u istim dozama i trajanju nije pak dovela do promena u nivou HDL-holesterola. HDL- holesterol ima glavnu ulogu u putu reverznog transporta holesterola, odnosno procesu uklanjanja holesterola iz perifernih tkiva. U ovom procesu, nascentni HDL koji se stvara u jetri i tankom crevu apsorbuje slobodan holesterol iz perifernih tkiva (čak i iz makrofaga) i prevodi ga u holesterol-estar radi skladištenja unutar HDL-a u toku transporta (Vodič za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja 2011). Iako su studije (Gupta i Figueredo, 2014; De Oliviera i sar., 2000) pokazale kardioprotektivno dejstvo etanola u humanoј populaciji tako što je nakon hronične konzumacije alkohola došlo do povećanja HDL holesterola, u našem istraživanju etanol je doveo do smanjenja HDL holesterola kao i samostalna primena tikvinog ulja i surutke. Razlog ovog smanjenja pri ekspoziciji etanolu može biti pad aktivnosti enzima lecitin-holesterol aciltransferaze (LCAT) usled izloženosti etanolu (Sabesin i sar., 1977). Razlog smanjenja kod samostalne primene tikvinog ulja i surutke može biti uticaj pojedinih sastojaka iz surutke i tikvinog ulja. Budući da su prethodne studije (Blum i sar., 1977; Schonfeldi sar., 1976) zabeležile smanjenje HDL holesterola pri dijeti visokim količinama ugljenih hidrata kod alkoholičara nameće se mogućnost da pojedine nutritivne komponente iz sastava surutke i tikvinog ulja utiču na smanjenje HDL- holesterola. Seme tikve, sadrži veliku količinu lipida (oko 35%),

proteina (oko 38%), alfa-tokoferola (3mg/100g) i ugljenih hidrata (oko 37%) (Younis i sar., 2000). S obzirom na to da je u tikvinom ulju linoleinska masna kiselina zastupljena u većem procentu (oko 47%) u odnosu na ostale masne kiseline, palmitinsku, stearinsku i oleinsku, moguće je da je veći unos linoleinske kiseline doveo do smanjenja HDL holesterola u ovom istraživanju. Prethodne studije u humanoj populaciji (Grundy, 1975) pokazale su da povećan unos linoleinske kiseline dovodi do smanjenja HDL holesterola, pa je samim tim moguće da je linoleinska kiselina iz tikvinog ulja dovela do smanjenja nivoa HDL holesterola u grupi životinja tretiranih samostalnom primenom tikvinog ulja.

Iako su prethodne studije (Gregerson i sar., 2013; El-Desouky 2017) o uticaju surutke na nivo HDL holesterola pokazale da surutka ima pozitivan uticaj na lipidni profil i da dovodi do povećanja HDL-holesterola, studija (Sautier i sar. 1983) je pokazala da primena surutke dovodi do smanjenja HDL holesterola što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja. Naime, u toj studiji se navodi da uticaj pojedinih aminokselina u sastavu proteina može uticati na nivo lipoproteina u krvi.

Kako iz prethodnih istraživanja vidimo da uticaji pojedinih komponenti iz sastava protektivnih namirnica kao što su tikvino ulje i surutka mogu imati uticaj na aktivnost pojedinih enzima i ostalih biohemijskih parametara za procenu stanja jetre na takav način da dovedu do ne tako, u publikacijama često zastupljenih rezultata, postavlja se pitanje da li se pojedine supstance kada se primenjuju samostalno kao preventivni protektori zaista imaju protektivna dejstva, koja je količina zaista protektivna i koliko vremena bi trebalo da se primenjuju. Kada je u pitanju istovremena primena hepatoprotektora i etanola, iako su pojedini nalazi iz ovog istraživanja pokazali da istovremena primena surutke sa etanolom dovodi do povećanja potencijala za razvoj ateroskleroze, neosporno je da njihova istovremena primena dovodi do značajnih hepatoprotektivnih efekata na morfološke pokazatelje hepatocelularnog oštećenja što je potvrđeno histopatološkim nalazima u ovom istraživanju.

6.3. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

U literaturi se navode mehanizmi putem kojih etanol dovodi do oksidativnog stresa i oni uključuju promene redoks stanja, stvaranje reaktivnih produkata acetaldehida, oštećenje mitohondrija, direktne efekte na biološke membrane usled hidrofobnosti etanola, etanolom indukovanu hipoksiju, efekat na imunološki sistem, indukciju CYP2E1, mobilizaciju Fe, efekat na enzime antioksidativnog stresa i glutation (Dey i Cederbaum, 2006). Sa druge strane u literaturi su zabeleženi podaci protektivnih efekata surutke i tikvinog ulja, pokazani u različitim studijama (Zhao i sar., 2014; Seif Abou Sayed, 2014)

U ovom radu izmerena aktivnost enzima CuZnSOD i MnSOD pokazala je da između kontrolne netretirane grupe životinja (K) i eksperimentalnih grupa tretiranih surutkom, tikvinim uljem, alkoholom, alkoholom i surutkom i alkoholom i tikvinim uljem (S, T, E, E+S i E+T) nema statistički značajnih razlika. Uloga ova dva navedena enzima zajedno sa selen zavisnom glutation peroksidazom i katalazom je da čine glavni zaštitni sistem odbrane od kiseoničnih slobodnih radikala. Ovi antioksidantni enzimi katalitički metabolišu slobodne radikale u manje toksična ili netoksična jedinjenja. Superoksid dizmutaze prevode superoksid anjon radikal u vodonik peroksid, a vodonik peroksid se uz delovanje GPX ili katalaze prevodi u vodu. S obzirom na to da SOD redukuje superoksid anjon radikal u vodonik peroksid koji može biti preveden u veoma toksičan $\text{OH}\cdot$. veoma je važno da antioksidantni enzimi deluju sinhronizovano, tj. da GPX i katalaza deluju zajedno sa SOD i razlože stvoreni vodonik peroksid (Simić, 2010). Etanol na više načina dovodi do povećanog stvaranja superoksid anjon radikala koji je prva karika u lancu oksidativnog stresa. Enzimski sistemi, kao što su citohrom P4502E1-zavisni mikrozomski monooksigenazni sistem, citosolni flavoenzimi (ksantin-oksidaza i aldehid-oksidaza) i

enzimi mitohondrijskog respiratornog lanca predstavljaju znacajan izvor superoksidnog anjona i vodonik peroksida u hepatocitima u akutnoj i hroničnoj intoksikaciji alkoholom (Albano, 2002; Das i Vasudevan, 2007).

Slobodni radikali koji nastaju u metaboličkim reakcijama etanola dovode do oštećenja mikrozomalnih struktura. Hidroksil radikali, nastali u Fentonovoj reakciji između Fe i H_2O_2 su oksidišući agensi koji etanol oksiduju do 1-hidroksietil radikala. (Lu i Cederbaum, 2008). Tokom oksidacije etanola stvaraju se i 2-hidroksietil radikal i etoksil radikal, dok oksidacijom acetaldehida nastaje acetil radikal (Nordmann, 1992). Povećan odnos NADH/NAD⁺ usled ekspozicije etanolu takođe doprinosi generisanju superoksidnog anjona povećavajući protok elektrona u respiratornom lancu.

Iako se nakon hronične ekspozicije etanolu u rezultatima očekivao nalaz smanjenja aktivnosti superoksid dizmutaza, neki autori su publikovali i porast aktivnosti superoksid dizmutaza nakon tretmana etanolom, i ovakvi bi se nalazi mogli dovesti u vezu sa razlikama u primenjenoj dozi i vremenu ekspozicije (Das i Vasudevan, 2005). Pojedina istraživanja pokazala su da je aktivnost mangan superoksid dizmutaze (Mn-SOD) povećana kod eksperimentalnih životinja nakon akutne i hronične primene etanola (Koch i sar., 2004) kao i da prekomerna ekspresija Mn-SOD-e sprečava oštećenje jetre kod pacova tretiranih alkoholom (Kanbagli i sar., 2002). Studija na modelu svinje, pokazala je smanjenu aktivnost CuZnSOD-a i GPX-a, kao i povećanu aktivnost Mn-SOD-a nakon primene alkohola (Zindenberg-Cherr, i sar 1990; Zindenberg-Cherr i sar., 1991). Postoje i studije koje su pokazale odsustvo aktivnosti CuZnSOD, katalaze i glutation peroksidaze u hroničnom tretmanu alkoholom (Rouach, i sar 1997 i Polavarapu, 1998)

Pacovi generalno imaju brži metabolizam i ekcesivno piju (samo kada su žedni), tako da koncentracije etanola u krvi u toku dana variraju više nego kod ljudi nakon primene iste količine, ali se kod hronične upotrebe indukuju mikrozomalni enzimi u jetri, pa se metabolizam alkohola i kod ljudi ubrzava. U prvoj nedelji

primene alkohola, kada su životinje najmanje pile, kod pojedinih životinja su izmerene koncentracije etanola od 1.45 g/L, dok je nakon šeste nedelje kod te iste životinje izmereno 0,512 g/L u krvi, odnosno 0,629 g/L u butnom mišiću. Da li i kod životinja postoji indukcija i kolika je eventualno ona bila ne možemo reći jer to prevazilazi obim ovog istraživanja. Svakako bi bilo zanimljivo metabolički proceniti kroz neko novo istraživanje ovaj odnos. Koncentracija etanola u krvi pacova od 0,254 g/L, nakon primene 12% etanola u vidu alkoholisane vode "ad libitum" očigledno nije dovela do povećane produkcije RKV-a iz mitohondrija pa je aktivnost superoksid dizmutaza neznačajno promenjena, a produkcija superoksidnih anjona je najverovatnije locirana u citosolu hepatocita i pokrenuta metabolizmom etanola putem P450IIE1 u mikrozomima, te citosolnom aldehid oksidazom ili aktivacijom Kupferovih ćelija koje oslobađaju prostaglandin E2, što izaziva povećanje metaboličke aktivnosti hepatocita i veću potrošnju kiseonika. Moguće je i da koncentracija od 0,254 g/L u krvi pacova u vremenu ekspozicije od šest nedelja bila nedovoljna da iscrpi aktivnost MnSOD i CuZnSOD kao i to da je povećana produkcija vodonik peroksida blokirala ova dva enzima, budući da superoksid anjon može inaktivirati CAT, a H₂O₂ Cu/Zn SOD (Nordmann, 1992), a ne treba zaboraviti ni adaptacione mehanizme. Tretman samostalnom primene surutke u našem istraživanju pokazao je povećanje ekspresije CuZnSOD, bez promene aktivnosti što bi moglo da bude posledica posttranslacionih modifikacija, budući da postoji literaturni podatak o neslaganju aktivnosti i ekspresiji enzima CuZnSOD gde se posttranslacione modifikacije navode kao razlog takve pojave (Furukawa i O halloran, 2006).

Ekspresija MnSOD u skladu je sa odsustvom promene aktivnosti pokazala je Western blot analiza.

Povećana aktivnost katalaze u ovom istraživanju uočena je u grupi životinja koja je tretirana 12% etanolom (E) (0,254 g/L u krvi) tokom šest nedelja (prosečna koncentracija odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja. Samostalna primena surutke (S) u dozi od 2g/kg TT i tikvinog ulja (T) u dozi od 2ml/kg TT intragastričnom sondom tokom šest nedelja nije dovela do promene u nivou aktivnosti

enzima u odnosu na kontrolnu grupu netretiranih zdravih životinja (K). Sa druge strane postoji statistički značajno povećanje aktivnosti enzima u grupi životinja kojoj je intragastrično davana surutka i etanol (E+S) u odnosu na grupu životinja kojoj je davana surutka (S) kao i u grupi životinja kojoj je intragastrično davano tikvino ulje i etanol (E+T) u odnosu na grupu kojoj je davano tikvino ulje (T). Glavna funkcija katalaze je razgradnja vodonik peroksida do vode i molekuskog kiseonika. Naročito je efikasna kada postoji visoka koncentracija vodonik peroksida, jer u niskim koncentracijama vodonik peroksida, glutation peroksidaza GPX preuzima glavnu ulogu u njegovoj razgradnji, posedujući veći afinitet za vodonik peroksid (Simić, 2010). Aktivnost katalaze je u našem istraživanju povećana u etanolskim grupama životinja u odnosu na neetanolne što ukazuje na to da etanol verovatno povećavajući nivo vodonik peroksida posredno dovodi do povećanja aktivnosti enzima katalaze. Alkohol najverovatnije dovodi do povećanja vodonik peroksida u citoplazmi i aktivira katalazu, a s obzirom na to da je aktivnost MnSOD nepromenjena, vodonik peroksid najverovatnije ne potiče iz mitohondrija nego iz sistema metabolizma alkohola citosolnog porekla i aktivacije mikrozomalnih enzima. Prethodne studije su pokazale da je aktivnost katalaze povećana pri tretmanu nižim koncentracijama alkohola, a da je smanjena pri većim primenjenim dozama alkohola (Vasudevan i Das 2005) i takvi nalazi sugerišu da je aktivnost katalaze u jetri promenljiva. (Husain i sar., 2001; Husain i sar. 1997) . Katalaza je inače smanjena u ne-etanolskim grupama u odnosu na etanolne, pa nam ovakav rezultat govori o protektivnom dejstvu surutke i tikvinog ulja, jer se povećanje aktivnosti katalaze u etanolskim grupama ne pripisuje oksidativnom stresu mitohondrijalnog porekla nego mikrozomalnim “turnover”-om vodonik peroksida koji je verovatno citoplazmatskog porekla iz sistema metabolizma alkohola. Posmatrajući rezultate western blot analize katalaze uočava se da ekspresija proteina nije povećana bez obzira na povećanje aktivnosti navedenog enzima.

Primena surutke i tikvinog ulja kod eksperimentalnih grupa životinja nije dovela do statistički značajnih promena u aktivnosti GSH-Px u odnosu na kontrolnu grupu netretiranih životinja, nezavisno od toga da li je primena bila u kombinaciji sa

etanolom ili bez njega. GSH-Px je enzim čija je uloga ključna u odbrani od slobodnih radikala i njegova funkcija je prevođenje vodonik peroksida u vodu i redukovanje hidroperoksida u odgovarajuće alkohole. Glutation peroksidaza razgrađuje vodonik peroksid kada je vodonik peroksid u niskim koncentracijama s obzirom na to da poseduje veći afinitet u odnosu na katalazu. Kako je u rezultatima ovog istraživanja aktivnost katalaze povišena pri samostalnom tretmanu etanolom i etanolom u kombinaciji sa surutkom i tikvinim uljem, a nivo GSH-Px nema statistički značajnih povećanja i smanjenja među grupama, možemo da pretpostavimo je citosolna produkcija vodonik peroksida visoka. Pojedine studije su pak pokazale i odsustvo efekta (Nordmann, 1992) ili smanjenje aktivnosti GSH-Px (Das i Vasudevan, 2005) u jetri pacova nakon ekspozicije etanolu. U studiji (Polavarapu i sar., 1998) moguće objašnjenje za smanjenu aktivnost GSH-Px navodi se inaktivacija GSHPx nakon izloženosti potentnim oksidantima, koji nastaju u lipidnoj peroksidaciji.

Iako nije uočena promena aktivnosti GSH-px, ekspresija GSH-px pokazala je povećanje u grupi životinja tretiranoj etanolom i surutkom. Ovakav rezultat ukazuje na činjenicu da promena aktivnosti enzima nije uslovljena isključivo njegovom povećanom ekspresijom, odnosno da njegovu aktivnost ne određuje samo povećanje njegove količine već dodatno i prisustvo ili odsustvo pojedinih kofaktora koji omogućavaju njegovu funkciju. Slični rezultati pokazani su i u studiji na pacovima (Jackson i sar., 2010.) gde izmerena aktivnost MnSOD, CuZnSOD i katalaze u mišićima nije praćena istovetnom promenom ekspresije navedenih enzima što ukazuje da promena aktivnosti enzima ne mora da bude praćena promenom u sintezi tog enzima.

Kada je u pitanju glutacion reduktaza (GR) u našoj studiji, u grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem (T) u dozi od 2ml/kg TT tokom 6 nedelja došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu netretiranu (K) i grupu životinja tretiranu surutkom (S) u dozi od 2g/kg tokom 6 nedelja. Grupe životinja tretirane etanolom (E), etanolom i surutkom (E+S) i etanolom i tikvinim uljem (E+T) nisu pokazale statistički značajnu razliku u promeni

aktivnosti enzima u odnosu na ne-etanolske (K, S i T). Glutation reduktaza je enzim koji održava glutacion u redukovanoj formi tako što ga regeneriše iz oksidovanog oblika u redukovani. U ovom radu, samostalna primena tikvinog ulja dovela je do smanjenja ovog parametra, međutim analiza ekspresije GR pokazala je povećanje sadržaja GR u svim eksperimentalnim grupama. Ovakav nalaz nam ukazuje da aktivnost enzima ne zavisi isključivo od nivoa ekspresije već da aktivnost mogu da menjaju i drugi faktori koji se aktiviraju primenom surutke, tikvinog ulja, etanola i njihovim kombinovanim tretmanom.

Skoro identični efekat u ovom istraživanju primena tikvinog ulja izazvala je i na aktivnost enzima GST u grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem (T) u dozi od 2ml/kg TT tokom šest nedelja gde je došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu (K), grupu životinja tretiranu surutkom (S) kao i grupu životinja koja je konzumirala etanol (E). Između ostalih grupa životinja nije uočena statistički značajna razlika. Glutation S transferaza katalizuje reakciju konjugacije redukovano glutaciona sa različitim molekulima, deluje kao vezujući protein za različite supstance i kovalentno vezuje neke pesticide, kancerogene i potencijalno toksične supstance. Očigledno je da je u našem istraživanju tikvino ulje u samostalnoj primeni dovelo do smanjenja aktivnosti i GR i GST u odnosu na kontrolnu i ostale eksperimentalne grupe. Nizak nivo GR ukazuje da je "turnover" glutaciona i odnosa oksidovani-redukovani glutacion snižen kod samostalne primene tikvinog ulja, a nizak nivo GST pri samostalnoj primeni tikvinog ulja nam ukazuje na to da je tikvino ulje preuzelo na sebe jedan deo verovatno lipofilnog vezivanja ksenobiotika i smanjenja pritiska koji GST ima, jer GST upravo preko mikrozomalnih enzima i oksigenacije supstrata vrši konjugovanje. Ovakav rezultat nam ukazuje na potentnost sastojaka tikvinog ulja u detoksikaciji i preuzimanju funkcije antioksidativnih enzima preko svojih antioksidativnih komponenti i samim tim nam ukazuje na njegov protektivan efekat.

Aktivnost ukupnog glutaciona se značajno nije menjala po grupama. Glutation kao enzimski tripeptid se u ćelijama nalazi pretežno tiol u redukovanom obliku (GSH),

a u manjoj količini kao disulfid-oksidovani oblik (GSSG). Pored svojih mnogobrojnih funkcija u ćeliji, glutacion učestvuje u zaštiti od kiseoničnih slobodnih radikala i njihovih reaktivnih intermedijera (Punchad i Kelli, 1996). Iako se alkoholom indukovano oštećenje jetre dovodi u vezu sa smanjenjem antioksidativne zaštite u jetri, naročito nivoa GSH (Tsukamoto, 2001; Bai i Cederbaum, 2006), efekti etanola na nivo GSH su promenljivog karaktera i variraju od smanjenja, porasta do neizmenjenog sadržaja pokazala su istraživanja (Dey i Cederbaum, 2006; Cederbaum, 1989). Bez obzira na to što mnoge studije ukazuju na smanjenje sadržaja GSH u jetri nakon ekspozicije etanolu, mehanizmi koji do toga dovode su i dalje nepoznati, a kao mogući navode se: a) stvaranje adukta između acetaldehida i GSH b) povećana oksidacija glutaciona usled stvaranja RKV (u nekim studijama nije zabeležen ni porast sadržaja GSSG, ni GSSG/GSH odnosa; c) smanjeno stvaranje glutaciona i povećano otpremanje glutaciona iz jetre (Shaw, 1989).

U rezultatima ovog istraživanja u grupi koja je tretirana tikvinim uljem, nije došlo do povećanja GSH, iako je GST smanjen. Razlog ove pojave može biti već pomenuta pojava, najverovatnije, potentnog antioksidativnog efekta tikvinog ulja odn. njegovih sastojaka među kojima je i vitamin E, u literaturi već dobro poznati i efikasni antioksidans koji verovatno kompenzuje efekte glutaciona i zbog toga ne izaziva njegovo povećanje.

Merenja aktivnosti XOD u našem istraživanju su pokazala da je došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti ovog enzima u grupi životinja tretiranoj tikvinim uljem u odnosu na kontrolnu i ostale eksperimentalne grupe životinja.

Aktivost ksantin oksidaze u ovom istraživanju smanjena je u grupi tretiranoj tikvinim uljem. Grupe životinja tretirane etanolom (E), etanolom i surutkom (E+S) i etanolom i tikvinim uljem (E+T) nisu pokazale statistički značajnu razliku u promeni aktivnosti ovog enzima u odnosu na ne-etanolne grupe životinja (K, S i T). Ksantin oksidaza učestvuje u oksidaciji širokog spektra endogenih (purina) i egzogenih (etanol) supstrata, međutim uloga ovog enzima je i da služi kao izvor oksidišućih agenasa kao

što su vodonik peroksid i superoksid anjon radikal (Parks i Granger, 1986). U našem istraživanju ovaj enzim, sa dvostrukom ulogom prooksidansa i antioksidansa, smanjio je svoju aktivnost samo u grupi životinja koja je tretirana samostalnom primenom tikvinog ulja. Kombinovana primena surutke i etanola i tikvinog ulja i etanola nisu dovele do promene aktivnosti ovog enzima. Ovakvi rezultati nam ukazuju da je ciklus purinskih nukleotida i njihov "turnover" smanjen i znači da je sačuvan integritet i membrane i svih purinskih nukleotida, tako da je jedan od izvora citosolne ksantin oksidaze, koja produkuje superoksid anjon smanjen i posledično nema pritiska koji je posredovan superoksidnim anjonom i povećanjem peroksida poreklom od ksantin oksidaze. Smanjenje XOD u grupi koja je tretirana samostalnom primenom tikvinog ulja nam ukazuje na manju izloženost ksenobioticima odn. da je moguće da tikvino ulje na nekom drugom nivou koji nije oksidativni preuzima metaboličku regulaciju i ima antioksidativni efekat.

Kada je u pitanju malondialdehid, njegova aktivnost je smanjena u etanolskim u odnosu na ne-etanolne grupe. Malondialdehid je glavni pokazatelj da je došlo do lipidne peroksidacije. MDA se lako detektuje u krvi/plazmi i koristi se kao marker oksidativnog stresa. U našem istraživanju u grupama životinja koje su tretirane etanolom bilo samostalno ili u kombinaciji sa surutkom i tikvinim uljem došlo je do smanjenja aktivnosti MDA. S obzirom na to da alkohol nije doveo do povećanja MDA već je zabeleženo smanjenje njegove aktivnosti, to može da ukaže da je metabolizam alkohola skoncentrisan u citoplazmi i da nema povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta mitohondrijalnog porekla, već postoji samo mikrozomalni pritisak stvaranja vodonik peroksida. Sa druge strane, iako neočekivan rezultat, ukazuje nam na to da je sistem antioksidativne odbrane doznno i vremenski zavisano, što je i zabeleženo u prethodnim studijama (Vasudevan i Das 2005). Kako je aktivnost u našem istraživanju ispitivana tek nakon tretmana, nismo mogli da ispratimo promene ovih enzima nakon nekoliko podeljenih vremenskih opsega, gde bismo možda mogli da vidimo da li i na koji način variraju aktivnosti pojedinih parametara.

Kada je u pitanju ekspresija p53 u našem istraživanju, saamostalna primena tikvinog ulja u dozi od 2ml/kg TT tokom 6 nedelja dovela je do statistički značajnog smanjenja p53 u odnosu kontrolnu netretiranu grupu i u odnosu na grupu koja je istovremeno tretirana etanolom i tikvinim uljem. Samostalna primena surutke dovela je takođe do smanjenja p53 u odnosu na grupu životinja kojoj su istovremeno davani alkohol i surutka. Analizom rezultata uočava se da je ekspresija p53 povećana u etanolskim (E), (E+S) i (E+T) u odnosu na ne-etanolske grupe životinja.

Postoje literaturni podaci da p53 ima centralnu ulogu u patogenezi alkoholne i nealkoholne masne jetre. U studijama na pacovima, pri hroničnoj konzumaciji alkohola zabeležena je povećana zastupljenost mRNK, acetilacije i transkripcione aktivnosti p53 (Lieber, 2008). Značaj p53 i njegovog antioksidantnog i prooksidantnog niza p66^{shc} u alkoholnoj bolesti jetre naglašava činjenica da genetska mutacija p53 i p66^{shc} značajno smanjuje etanolom indukovano hepatocelularno oštećenje i oksidativni stres (Pani i sar., 2004; Koch i sar., 2008). Ključna uloga p53 u patogenezi alkoholne bolesti jetre objašnjena je i nedavnim istraživanjem gde je osetljivost jetre na oštećenje izazvano alkoholom povezano sa razlikama u aktivaciji p53 i odgovarajućim nishodnim regulacijama u signalnim kaskadama koje regulišu apoptozu, oksidativni stres, insulinsku signalizaciju i metabolizam masnih kiselina (Derdak i sar., 2011).

Osim u alkoholnoj bolesti jetre, p53 je viđen kao važan činilac i u nastanku nealkoholne steatoze jetre (Yahagi i sar., 2004). Apoptoza hepatocita posredovana aktivacijom p53 uočena je u studiji miševa koji su bili na visokoprocentnoj masnoj dijeti (Farell i sar., 2009). Takođe, postoji pozitivna korelacija između stepena steatoze i ekspresije p53 u humanim jetrama sa steatozom (Panasiuk i sar., 2006). Na osnovu ovakvih nalaza, aktivacija p53 može biti važan metabolički događaj u patogenezi masne jetre bez obzira na etiologiju, što olakšava ne samo apoptozu i oksidativni stres već generiše i abnormalnosti jetre kao što su kao steatoza i pospešuje insulinsku rezistenciju koja dodatno doprinosi razvoju masne jetre. Kada je u pitanju uloga p53 u steatozi jetre, nedavno je primećeno da p53 reguliše transkripciju

miRNK34a kao svog direktnog nishodnog cilja (Hermeking, 2007; Lee i sar., 2010). Pokazano je da je miRNK34a aktivirana u eksperimentima na miševima koji su bili na dijeti visokim procentom masti kao i kod pacijenata sa metaboličkim sindromom i nealkoholnim steatohepatitisom (Cheung i sar., 2008). Dokazano je takođe da miRNK34a suprimira ekspresiju informacionog regulatora 2 homologa (SIRT1) u jetri (Lee i sar., 2010) koji ima centralnu ulogu u regulisanju metabolizma masnih kiselina, sprečavajući akumulaciju ektopične masti olakšavajući oksidaciju masnih kiselina i sprečavajući sintezu de novo masnih kiselina. Shodno tome, mutacija specifična za hepatocitni SIRT1 dovodi do hepatične steatoze i inflamacije u studiji na miševima koji su bili izloženi visokim procentima masti (Purushotham i sar., 2009). P53, dakle, ima važnu ulogu u pokretanju početnih mehanizama koji dovode do razvoja alkoholne bolesti jetre, kao i nealkoholnih promena kao što su nealkoholni steatohepatitis. Na osnovu prethodnih studija možemo da uočimo da surutka i tikvino ulje imaju hepatoprotektivan efekat kada se primenjuju samostalno s obzirom na činjenicu da u našem istraživanju pokazuju smanjenje ekspresije p53 u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Sa druge strane, povećanje ovog proteina postoji u grupama izloženim alkoholom i kombinovanom primenom alkohola sa tikvinim uljem i surutkom. Povećanje u grupi tretiranoj alkoholom je u skladu sa histopatološkim nalazima koji ukazuju na razvoj masne jetre, međutim histopatološke promene u grupama koje su tretirane kombinovanom primenom alkohola i surutke i alkohola i tikvinog ulja nisu ukazali na povećanje steatoze odn. povećano deponovanje masti u hepatocitima, već na regresiju steatotičnih promena bez obzira na činjenicu da je ekspresija p53 u tim grupama povećana. Na osnovu ovakvih nalaza možemo da sugerišemo da surutka i tikvino ulje kada se primenjuju u kombinaciji sa alkoholom utiču hepatoprotektivno na način koji verovatno nije regulisan ekspresijom proapoptotskog proteina, p53. Međutim sugerišemo i to da je protektivni i reparatorni efekat sigurno veći ukoliko se ne primenjuju u istovremenoj kombinaciji sa etanolom.

Činjenica da je primenjena količina 12% alkohola tokom 6 nedelja (0,254 g/L) bila nedovoljna da indukuje u literaturi zabeležene poraste ili smanjenja parametara

oksidativnog stresa, nismo mogli da vidimo prave antioksidativne uticaje surutke i tikvinog ulja zabeležene u literaturi (Zhao i sar., 2014; Ahmed i sar., 2009) Takvi rezultati definitivno ukazuju da je oksidativni stres dozno i vremeniski zavisian prilikom njegove indukcije etanolom. Međutim, dobijeni rezultati mogli bi da budu u vezi sa ekspresijom transkripcionog faktora NFkB, čija ekspresija u ovom istraživanju nije povećana u grupi tretiranoj etanolom u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Naime, povećana ekspresija NFkB indukuje se povećanim oksidativnim stresom prethodno izazvanog toksičnim dejstvom etanola (Nanji i sar., 2003) odnosno povećanom produkcijom H₂O₂ (Oliviera-Marques i sar., 2009). Mnogobrojna istraživanja potvrđuju da ekspresija NFkB u Kupferovim ćelijama dovodi do razvoja alkoholne bolesti jetre (Lieber, 1994; Lin i sar., 1997; Nanji i Zakim, 1996; Uesegi i sar., 2001). Alkoholno oštećenje jetre uzrokovano je pored lipidne peroksidacije i indukcijom multiplih NFkB zavisnih gena uključujući TNF-alfa, IL-12, MCP-1, MIP 2, COX-2 i iNOS. (Dinchuk i sar., 1995; Nanji i sar., 2001; Nanji i sar., 1999; Nanji i sar., 1997; Nanji i sar., 1996; Uesegi i sar., 2001). Budući da je ekspresija NFkB u grupi životinja tretiranih etanolom nepromenjena u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu, na osnovu western blot nalaza NFkB i na osnovu rezultata koje imamo o parametrima oksidativnog stresa nameće se mogućnost da je primenjena doza etanola produkovala nedovoljno izraženi oksidativni stres koji nije doveo do velikog pritiska antioksidativne odbrane i nije izazvao poremećaje u aktivnosti pojedinih parametara. Sa druge strane, ekspresija NFkB u grupama životinja tretiranih etanolom i surutkom i etanolom i tikvinim uljem povećana je u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Iako je NFkB ključni medijator u inflamatornom odgovoru Kupferovih ćelija, prethodne studije su pokazale da ovaj medijator funkcioniše i kao faktor preživljavanja hepatocita u određenim stanjima kao što je regeneracija jetre (Yamamoto i Gaynor 2001). Ova pojava potvrđena i znacima regeneracije u histopatološkim nalazima životinja koji su tretirani kombinovanom primenom etanola i surutke i etanola i tikvinog ulja u našoj studiji.

Na osnovu ovakvih podataka, možemo da sugerišemo citoprotektivne i regenerativne efekte tikvinog ulja i surutke pokrenute povećanom ekspresijom transkripcionog faktora NF κ B sa dualnom prirodom induktora i supresora u procesu apoptoze koji je u ovom istraživanju verovatno uticao na regenerativne procese bez obzira na povećanje ekspresije proapoptotskog proteina p53 koji u našem istraživanju nije dominirao svojim potencijalom u procesima oštećenja jetre.

7. Zaključci

Sprovedena studija imala je za cilj da proceni da li tikvino ulje i surutka deluju hepatoprotektivno na oštećenje jetrinog tkiva izazvanog primenom 12% etanolom u trajanju od 6 nedelja. Za procenu oštećenja i hepatoprotektivnih efekata određivane su patohistološke promene na jetri, biohemijski pokazatelji oštećenja jetre i parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Primena 12% etanola u obliku alkoholisane vode za piće "ad libitum" tokom 6 nedelja dovodi do statistički značajnih promena:

A. Patohistološke promene: patohistološka oštećenja tkiva jetre, etanol izaziva: kongestiju, dilataciju centralne vene, dilataciju venae portae, inflamaciju portnih prostora, hiperplaziju Kupferovih ćelija, masne hepatocitne promene i fokalnu nekrozu.

B. Biohemijski pokazatelji oštećenja jetre: etanol povećava vrednost LDL - holesterola i indeks ateroskleroze, a smanjuje HDL - holesterol i ALP (alkalnu fosfatazu).

C. Parametari oksidativnog stresa u jetri:

- **Aktivnost enzima:** etanol povećava aktivnost CAT katalaze.

- **Ekspresija specifičnih proteina određenih WB:** Etanol primenjen samostalno dovodi do povećanja ekspresije glutation reduktaze (GR), a u kombinaciji sa surutkom i tikvinim uljem smanjuje ekspresiju enzima CuZnSOD, povećava ekspresiju GR i povećava ekspresiju specifičnog proteina NFkB. Etanolske grupe generalno povećavaju ekspresiju specifičnog proteina p53 u odnosu na neetanolske.

2. Primena surutke u dozi od 2g/kgTT tokom 6 nedelja dovodi do statistički značajnih promena:

A. Patohistološke promene: protektivnog delovanja na razvoj patohistoloških promena u tkivu jetre izazvanih istovremenom primenom 12% etanola u obliku alkoholisane vode za piće, tako što smanjuje: kongestiju, dilataciju centralne vene, dilataciju venae portae, hiperplaziju Kupferovih ćelija, masne hepatocitne promene, sprečava inflamaciju portnih prostora i fokalnu nekrozu, i pospešuje pojavu novoformiranih žučnih duktulusa.

B. Biohemijski pokazatelji stanja jetre: surutka u kombinaciji sa etanolom povećava vrednost laktat dehidrogenaze (LDH), a samostalno primenjena snižava vrednost alkalne fosfataze (ALP).

C. Parametri oksidativnog stresa u jetri:

- **Aktivnost enzima:** u kombinaciji sa etanolom surutka dovodi do povećanja aktivnosti katalaze (CAT) u odnosu na životinje netretirane etanolom.

- **Ekspresija specifičnih proteina određenih WB:** U samostalnoj primeni surutka povećava ekspresiju enzima bakar cink superoksid dismutase (CuZnSOD) - a i glutation reduktaze (GR), a u kombinaciji sa etanolom surutka dovodi do povećane ekspresije enzima glutation peroksidaze (GSHPx), glutation reduktaze (GR) i specifičnog jedarskog proteina NFkB,

3. Primena tikvinog ulja u dozi od 2mL/kg TT tokom 6 nedelja dovodi do statistički značajnih promena:

A. Patohistološke promene: protektivnog delovanja na razvoj patohistoloških promena u tkivu jetre izazvanih istovremenom primenom 12%, tako što smanjuje: kongestiju, dilataciju centralne vene, dilataciju venae portae, hiperplaziju Kupferovih ćelija, masne hepatocitne promene, sprečava inflamaciju portnih prostora i fokalnu nekrozu, i pospešuje pojavu novoformiranih žučnih duktulusa. Samostalna primena tikvinog ulja pospešuje edem hepatocita, ali to ne utiče na regenerativne procese.

B. Promene biohemijskih pokazatelja stanja jetre: Kombinacija tikvinog ulja i etanola povećava vrednost LDL-holesterola i indeksa ateroskleroze, a smanjenjuje HDL - holesterol i ALP-a.

C. Promena parametara oksidativnog stresa u jetri:

- **Aktivnost enzima:** tikvino ulje u samostalnoj hroničnoj primeni smanjuje aktivnost sledećih enzima: glutation - S- transferaze (GST), glutation reduktaze (GR) i ksantin oksidaze (XOD).

- **Ekspresija ukupne količine specifičnih proteina određenih WB:** samostalna primena tikvinog ulja dovodi do povećanja ekspresije glutation reduktaze (GR) i smanjenja ekspresije specifičnog tumor supresor proteina p53. U kombinaciji sa etanolom tikvino ulje dovodi do smanjenja ekspresije enzima CuZnSOD, povećanja ekspresije glutation reduktaze (GR) i povećanja ekspresije p 53 i nuklearnog faktora beta (NFkB).

4. Primenjena količina etanola nije izazvala klasičan oksidativni stres. Povećana aktivnost CAT (katalaze), ukazuje na to da etanol u niskim i stalno prisutnim koncentracijama verovatno povećavajući nivo vodonik peroksida u citoplazmi aktivira katalazu. S obzirom na to da su aktivnosti MnSOD i CuZnSOD nepromenjene, vodonik peroksid najverovatnije ne potiče iz mitohondrija nego iz sistema metabolizma alkohola citosolnog porekla i aktivacije mikrozomalnih enzima. U ovim procesima verovatno značajnu ulogu imaju i kofaktori jer aktivnost enzima i njihova ekspresija nisu u korelaciji sa ekspresijom glutation reduktaze i CuZnSOD, verovatno kao posledica posttranslacionih modifikacija

Međutim primena etanola je dovela do značajnih histopatoloških promena u tkivu jetre i promena u biohemijskim parametrima koji signaliziraju oštećenje jetrinih funkcija, kao i dualno indukovanje induktora i supresora u procesu apoptoze, u transkripciji DNK - NFkB koji funkcioniše i kao faktor preživljavanja hepatocita u određenim stanjima kao što su regeneracija jetre; te možemo sugerisati protektivne i regenerativne efekte tikvinog ulja i surutke koje je u skladu sa znacima regeneracije u histopatološkim nalazima životinja koje su tretiranih etanolom.

8. Literatura

Adachi, Y.; Bradford, B. U.; Gao, W.; Bojes, H. K.; Thurman, R. G. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994; 20:453–460.

Adachi, Y.; Moore, L. E.; Bradford, B. U.; Gao, W.; Thurman, R. G. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 1995; 108:218–224.

Adams PC, Agnew S. Alcoholism in hereditary hemochromatosis revisited: prevalence and clinical consequences among homozygous sibs. *Hepatology* 1996;23:724–727.

Ahmed HH, Abdel-Rahman M, Ali RS, Abdel Moniem AE. Protective effect of Ginkgo biloba extract and pumpkin seed oil against neurotoxicity of rotenone in adult male rats. *J Appl Sci Res* 2009;5(6):622-35.

Al-Jumaily E F. Khaleel F M. Comparative Levels of liver enzymes in patients with various liver disorders. *Current Res. Jr. Biological Sc*, 2012;4(5): 638-642.

Alatalo PI, Koivisto HM, Hietala JP, Puukka KS, Bloigu R, Niemela OJ. Effect of moderate alcohol consumption on liver enzymes increases with increasing body mass index. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88:1097-1103.

Albano, E., 2002. Free-radicals and alcohol-induced liver injury. In: Sherman, C.D.I.N., Preedy, V.R., Watson, R.R. (Eds.), *Ethanol and Liver*. Taylor and Francis, London, pp. 153–190.

Albano E, Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc. Nutr. Soc*. 2006; 65(3):278-90.

Albano E, Clot P, Morimoto M, Tomasi A, Ingelman-Sundberg M, French SW. Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology* 1996;23:155–163.

Albano E. Free radicals and alcohol-induced liver injury. In: Sherman COIN. Preedy YR. Watson RR, eds. *Ethanol and the liver*. London: Taylor and Francis: 2002. p.153-90.

Alcoholic liver disease: morphological manifestations. Review by an international group. *Lancet* 1981;1:707-711.

Anciaux ML, Pelletier AG, Attali P, Meduri B, Liguory C, Etienne JP. Prospective study of clinical and biochemical features of symptomatic choledocolithiasis. *Dig Dis Sci* 1986;31:449-53.

Andjelković M., van Camp J., Trawka A., Verhe R. Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2010; 111: 208-217.

Apte M, Pirola R, Wilson J. New insights into alcoholic pancreatitis and pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;(3):51–6.

Arteel GE, Iimuro Y, Yin M, Raleigh JA, Thurman RG. Chronic enteral ethanol treatment causes hypoxia in rat liver tissue in vivo. *Hepatology* 1997;25:920–926.

Ashizawa N, Ouchi G, Fujimura R, Yoshida Y, Tokuyama K, Suzuki M. Effects of a single bout of resistance exercise on calcium and bone metabolism in untrained young males. *Calcif Tissue Int.* 1998; 62(2):104-8.

Atanacković M. Patologija. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu. 2010.

Bai J, Cederbaum AI. Overexpression of CYP2E1 in mitochondria sensitizes HepG2 cell to the toxicity caused by depletion of glutathione. *J Biol. Chem.* 2006; 281:5128-5136.

Bailey, S.M., Cunningham, C.C. Contribution of mitochondria to oxidative stress as associated with alcoholic liver disease. *Free Radical Biology & Medicine* 2002;32 (1): 11–16.

Baldwin, A. S. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14:649–681.

Baraona, E., and C. S. Lieber. 1970. Effects of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat. *J. Clin. Invest.* 49: 769-778.

Bardag-Gorce F, Yuan QX, Li J, French BA, Fang C, Ingelman-Sundberg M, French SW. The effect of ethanol-induced cytochrome p4502E1 on the inhibition of proteasome activity by alcohol. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:23–29.

Baskaran M, Periyasamy L, Rajagopalan R. Effect of *Phyllanthus niruri* on alcohol and polyunsaturated fatty acid induced oxidative stress in Liver. *Int J Pharm Pharm Sci* 2010;2(4):58-62.

Becker U, Deis A, Sorensen T I, Gronbaek M, Borch-Johnsen K, Muller C F, et al. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. *HEPATOLOGY* 1996;23:1025-1029.

Becker U, Gronbaek M, Johansen D, Sorensen T I. Lower risk for alcohol-induced cirrhosis in wine drinkers. *HEPATOLOGY* 2002;35:868-875.

Beckman, J.S., Crow, J.P., Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochemical Society Transactions* 1993; 21 (2):330-334.

Beier JI, McClain CJ. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol Chem.* 2010; 391:1249-64.

Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, et al. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut* 1997;41:845-850.

Benedetti A, Parent ME, Siemiatycki J. Lifetime consumption of alcoholic beverages and risk for 13 types of cancer in men: results from a case-control study in Montreal. *Cancer Detect Prev.* 2009;32:352-62.

Berk PD, Noyer C. Clinical chemistry and physiology of bilirubin. *Semin Liver Dis* 1994; 4(4):346-55.

Beutler TM, Eaton DL. Glutathion-S-transferases: amino acid sequence comparison classification and phylogenetic relationship. *Environ. Carcino. Ecotox. Revs.* 1992;10: 181-203.

Bjorck L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotrophic bacteria in milk. *J Dairy Res* 1978;45:109-118.

Blum CB, Levy RI, Eisenberg ,et al: High density lipoprotein metabolism in man. *J Clin Invest* 60:795, 1977

Bounous G, Kongshavn PA. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J Nutr.* 1985; 115:1403-1408.

Bounous G, Kongshavn PA. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. *J Nutr.* 1982; 112: 1747-1755.

Bourogaa E, Nciri R, Mezghani-Jarraya R, Racaud-Sultan C, Damak M, El Feki A. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Hammada scoparia* against ethanol-induced liver injury in rats. *J Physiol Biochem.* 2013;69(2):227-37.

Boé DM, Vandivier RW, Burnham EL, Moss M. Alcohol abuse and pulmonary disease. *J Leukoc Biol.* 2009;86:1097–04.

Bradbury MW: Lipid metabolism and liver inflammation I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G194–198.

Bradford, B. U. Misra, U. K. Thurman, R. G. Kupffer cells are required for the swift increase in alcohol metabolism. *Res. Com-mun. Subst. Abuse* 1993; 14:1–6.

Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ et al. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *Br Med J.* 2011; 342:d636.

Brown K. Alcohol hepatotoxicity:a genotypic predisposition? *Am J Gastroenterol* 1992;87:677-678.

Brown LA, Cook RT, Jerrells TR, Kolls JK, Nagy LE, Szabo G, Wands JR, Kovacs EJ. Acute and chronic abuse modulate immunity. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Sep; 30(9):1624-31

Bujanda L. The effects of alcohol consumption upon the gastro-intestinal tract. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3374–3382.

Bukelić J. *Socijalna psihijatrija*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 2004, Beograd.

Burkitt HG, Young B, Heath JW. *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.

Cederbaum, A.I., Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol and Alcoholism* 1991 :291–296.

Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1539–1543.

Celli R. Zhang X. Pathology of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2014; 2: 103–109.

Chen J, Ishac EJ, Dent P, Kunos G, Gao B. Effects of ethanol on mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. *Biochem J.* 1998;334:669–676.

Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW et al., Sanyal AJ Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*. 2008 ; 48(6):1810-20

Choudhry M A, Chaudry IH. Alcohol, burn injury, and the intestine. *J Emerg Trauma Shock*. 2008;1:81-7.

Christoffersen P, Nielsen K. Histological changes in human liver biopsies from chronic alcoholics. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1972;80:557-565.

Cohen JA, Kaplan MM. The SGOT/SGPT ratio — an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1979;24(11):835-8.

Cotgreave I.A., Moldeus P. and Orrenius S., Host biochemical defence mechanism against prooxidants, *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 28: 189-212, 1988.

Crabb DW. Pathogenesis of alcoholic liver disease: newer mechanism so finjury. *Keio J Med* 1999;48:184-188.

Crawford JM. Histologic findings in alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2012;16:699-716.

Crawford JM: Histologic findings in alcoholic liver disease. *Clinics in liver disease* 2012;16:699-716.

Cunningham C. C., Bailey S. M., Ethanol consumption and liver Mitochondria function. *Biological Signals and Receptors* 2001;10(3-4): 271-282.

Dahiru D. and Obidoa O. Evaluation of the Antioxidant Effects of Ziziphus Mauritiana Lam. Leaf Extracts Against Chronic Ethanol-Induced Hepatotoxicity in Rat Liver. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2008; 5(1): 39-45

Dandona P., Aljada A., Bandyopadhyay A., Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes *Trends Immunol*. 2004;25(1):4-7.

Dargel R., Lipid peroxidation-a common pathogenic mechanisms?, *Exp Toxicol Pathol*, 44: 169-181, 1991.

Das, S.K., Nayak, P., Vasudevan, D.M., Consequences of ethanol consumption. *Journal of Indian Society of Toxicology* 2005; 1(1):1-10.

Das K.S. Vasudevan M.D. Effect of ethanol on liver antioxidant defense systems: A dose dependent study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2005; 20 (1): 80-84

Das SK, Vasudevan DM. Effect of ethanol on liver antioxidant defense systems: a dose dependent study. *Ind J Clin Biochem.* 2005; 20(1):80-84.

Das SK, Vasudevan OM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* 2007;81:177-87.

Day C P, Bassendine M F. Genetic predisposition to alcoholic liver disease. *Gut* 1992;33:1444-1447.

Deaciuc IV, Fortunato F, D'Souza NB, Hill DB, Schmidt J, Lee EY, McClain CJ. Modulation of caspase-3 activity and Fas ligand mRNA expression in rat liver cells in vivo by alcohol and lipo-polysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:349-356.

Degos F. Hepatitis C and alcohol. *J Hepatol.* 1999;31(1):113-118.

Dekant W., Toxicology of chlorofluorocarbon replacements, *Environ Health Perspect*, 1996; 104 (1): 75-83.

Della Corte E., Stirpe F., The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme, *Biol Chem J.* 1972; 126: 739-745.

De Oliveira E Silva ER1, Foster D, McGee Harper M, Seidman CE, Smith JD, Breslow JL, Brinton EA. Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation.* 2000 ;102(19):2347-52.

Derdak Z, Lang CH, Villegas KA, Tong M, Mark NM, de la Monte SM, Wands JR. Activation of p53 enhances apoptosis and insulin resistance in a rat model of alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2011 Jan; 54(1):164-72.

Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology.* 2006; 43(2):63-74.

Dey A, Cederbaum I A, Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology.* 2006; 43:63-74

Diehl AM, Potter J, Boitnott J, Van Duyn MA, Herlong HF, Mezey E. Relationship between pyridoxal 5'-phosphate deficiency and aminotransferase levels in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1984;86(4):632-6.

Di Luzio NR. A mechanism of the acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. *Lab Invest* 1966;15:50-63.

Dimitrijević I. Bolesti zavisnosti. KIZ Centar, 2004, Beograd.

Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnson JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniac P, and Trzaskos JM. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase-2. *Nature* 1995; 378: 406–409.

Donohue TM, Jr.: Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J Gastroenterol* 2007;13:4974–4978.

Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000;46(12):2027-49.

Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000;46(12):2027-49.

El-Desouky WI, Mahmoud AH, Abbas MM. Antioxidant potential and hypolipidemic effect of whey protein against gamma irradiation induced damages in rats. *Appl Radiat Isot.* 2017;129:103-107.

Eldenshary S. E. Effect of whey protein against fluvastatin and carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats *Der Pharmacia Lettre*, 2015; 7 (11):9-23.

Eliwa. A. H. Evaluation of the therapeutic effect of whey proteins on the hepatotoxicity induced by paracetamol and alcohol co-administration in rats. *IJPRBS*, 2014; 3(2): 295-314.

Eraslan G, Kanbur M, Aslan Ö, Karabacak M. The antioxidant effects of pumpkin seed oil on subacute aflatoxin poisoning in mice. *Environ Toxicol.* 2013; 28(12):681-8.

Farrell GC, Larter CZ, Hou JY, Zhang RH, Yeh MM, Williams J et al..Apoptosis in experimental NASH is associated with p53 activation and TRAIL receptor expression. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24(3):443-52.

Fernandez-Solà J, Preedy VR, Lang CH, Gonzalez-Reimers E, Arno M, Lin JCI et al. Molecular and Cellular Events in Alcohol-Induced Muscle Disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31:1953–62.

Feverly J, Blanckaert N. What can we learn from analysis of serum bilirubin. *J Hepatol* 1986;2(1):113-21.

Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000, 408, 239–247.

Fishman WH. Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress. *Clin Biochem* 1990;23(2):99-104.

Forston WC, Tedesco FJ, Stames EC, Shaw CT. Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease. *J Clin Gastroenterol* 1985;7(6):502-5.

Fridovich I., Superoxide radical and superoxide dismutases, *Ann Rev Biochem*, 1995; 64: 97-112.

Friedman SL: Hepatic fibrosis – overview. *Toxicology* 2008;254:120–129.

Furukawa Y1, O'Halloran TV. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(5-6):847-67.

Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition*. 2011;27(5):582-9.

Galambos J T. Natural history of alcoholic hepatitis. 3. Histological changes. *Gastroenterology* 1972;63:1026-1035.

Garcia-Ruiz,C.,Collel,A.,Morales,A.,Kaplowitz,N.,Fernandez-Checa,J.C. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kb:studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Molecular Pharmacology* 1995; 48, 825–834.

Ghosh S. Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *S Immunol Res*. 1999; 19(2-3):183-9.

Giannini G. E. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association or its licensors* 2005; 172(3):367-79.

Giannini G. E. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association or its licensors* 2005;172(3):367-79.

Glatzle D, Vuilleumie JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30: 665-668

Goodwin D W, Schulsinger F, Hermansen L, Guze S B, Winokur G. Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological par-ents. *Arch Gen Psychiatry* 1973;28:238-243.

Gossell-Williams M, Lyttle K, Clarke T, Gardner M, Simon O. Supplementation with pumpkin seed oil improves plasma lipid profile and cardiovascular outcomes of female nonovariectomized and ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Phytotherapy Res* 2008;22(7):873-7.

Green RM, Flamm S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology* 2002;123(4):1367-84.

Gregersen S, Bystrup S, Overgaard A, Jeppesen PB, Sønderstgaard Thorup AC, Jensen E, Hermansen K. Effects of whey proteins on glucose metabolism in normal Wistar rats and Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Rev Diabet Stud.* 2013 ;10(4):252-69.

Grundy, S. M. . Effects of polyunsaturated fats on lipid metabolism in patients with hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* 1975;55: 269-282.

Guimont C, Marchall E, Girardet JM, LindenG. Biologically active factors in bovine milkand dairy byproducts: influence on cell culture. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997; 37: 393-410.

Gupta S, Figueredo VM. Alcohol and lipids. *OA Alcohol* 2014 Feb 10;2(1):3

Haddad JJ. Pharmaco-redox regulation of cytokine-related path-ways:from receptor signaling to pharmacogenomics. *Free Radic Biol Med* 2002;33:907–926.

Hakucho A, Liu J, Horiguchi N, Liu X, Fujimiya T. The effects of chronic alcohol exposure on progression of liver injury in spontaneously hypertensive rats; preliminary study. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* 2013; 48(3):216-22.

Halliwell B., Oxidation of low-density lipoprotein: questions of initiation, propagation and the effect of antioxidants, *Am J Clin Nutr,* 61: 670-677, 1995.

Halliwell B. and Chirico S., Lipid peroxidation: Its mechanism, maesurment and significance, *Am J Clin Nutr,* 57: 715S-725S, 1993.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edition, Oxford University Press Inc., New York, 1999.

Heaton W.F. Effect of Magnesium Deficiency on Plasma Alkaline Phosphatase Activity. *Nature* 1965; 207: 1292 - 1293.

Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*. 2007; 12(5):414-8.

Hill DB, Barve S, Joshi-Barve S, McClain CJ. Increased monocyte nuclear factor-kappaB activation and tumor necrosis factor production in alcoholic hepatitis. *Lab Clin Med*. 2000; 135(5):387-95

Hoek, J.B., Cahill, A., Pastorino, J.G. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 2002; 122 (7): 2049–206.

Husain, K., and Somani, S.M. (1997) Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *J.Appl. Toxicol*. 17(3), 189-194.

Husain, K., Scott, B.R., Reddy, S.K., and Somani, S.M. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol*. 2001;25(2): 89-97.

Ideo G, De Franchis R, Del Ninno E, Cocucc C, Dioguardi N. Increase of some rat liver microsomal enzymes as a consequence of prolonged alcohol intake: comparison with the effect of phenobarbitone. *Enzyme* 1971;12:473-80.

Imuro, Y.; Gallucci, R. M.; Luster, M. I.; Kono, H.; Thurman,R. G. Antibodies to tumor necrosis factor- attenuate hepatic necrosis and inflammation due to chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997; 26:1530–1537.

Ilyas UK, Katare DP, Aeri V. Comparative evaluation of standardized alcoholic, hydroalcoholic, and aqueous extracts of *Phyllanthus maderaspatensis* Linn. against galactosamine-induced hepatopathy in albino rats. *Pharmacogn Mag*. 2015;11(42):277-82.

Iseri, O. A., Lieber SC, and Gottlieb SL. The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Amer. J. Pathol*. 1966; 48: 535.

Iturriaga H, Bunout D, Hirsch S, Ugarte G. Over weight as a risk factor or a predictive sign of histological liver damage in alcoholics. *Am J Clin Nutr* 1988; 47:235-238.

JacksonJR,RyanMJ,HaoY,AlwaySE. Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius

muscles of young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1572–R1581, 2010.

Ji C, Chan C, Kaplowitz N: Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. *J Hepatol* 2006;45:717–724.

Jones DP. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: Sies H, ed. *Oxidative stress*. London: Academic Press, 1985:151–195.

Kamimoto Y, Horiuchi S, Tanase S, Morino Y. Plasma clearance of intra-venously injected aspartate aminotransferase isozymes: evidence for preferential uptake by sinusoidal liver cells. *Hepatology* 1985;5(3):367-75.

Kamper-Jorgensen M, Gronbaek M, Tolstrup J, Becker U. Alcohol and cirrhosis: dose–response or threshold effect? *J Hepatol* 2004;41:25-30.

Kanbagli, O., Balkan, J., Aykac-Toker, G., Uysal, M. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2002; 25 (11):1482–1484.

Kasdallah-Grissa, A., Nakbi, A., Koubaa, N., El-Fazaâ, S., Gharbi, N., Kamoun, A., Hammami, M. Dietary virgin olive oil protects against lipid peroxidation and improves antioxidant status in the liver of rats chronically exposed to ethanol. *Nutrition Research*, 2008; 28(7): 472-479.

Kawakami M, Meyer AA, Johnson MC, Rezvani AH. Immunological consequences of acute ethanol ingestion in rats. *J Surg Res*. 1989;47:412–17.

Kennedy RS, Konok GP, Bounous G, et al. The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical trial study. *Res* 1995;15:2643-2649.

Klassen LW, Tuma D, Sorrell MF. Immune mechanisms of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 1995;22:355–357.

Klein, S.M., Cohen, G., Lieber, C.S., Cederbaum, A.I. Increased microsomal oxidation of hydroxyl radical scavenging agents and ethanol after chronic consumption of ethanol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983;223: 425–432.

Koch,O.R., Pani,G., Borrello,S., Colavitti,R., Cravero,A., Farre,S., Galeotti,T., Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Molecular Aspects of Medicine* 2004; 25(1–2) :191–198.

Koch OR, Fusco S, Ranieri SC, Maulucci G, Palozza P, Larocca LM, Cravero AA, Farre' SM, De Spirito M, Galeotti T, Pani G. Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage.*Lab Invest.* 2008; 88(7):750-60

Kono H, Rusyn I, Connor H, Mason RP, Thurman RG. Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Therapeut* 2000;293:296–303.

Kukielka, E., Dicker, E., Cederbaum, A.I., Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994;309 (2):377–386.

Kulaitiene J, Jariene E, Danilcenko H, Kita A, Venskutoniene E. Oil pumpkins seeds and their quality. *Pol J Food Nutr Sci* 2007;57(4B):349-52.

Kume H. ,Okazaki K. and Sasaki H. Hepatoprotective Effects of Whey Protein on D-Galactosamine-Induced Hepatitis and Liver Fibrosis in Rats. Department of Nutritional Research, Food S Biosci. Biotechnol. Biochem.2006; 70 (5): 1281–1285.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lane, B. P., and C. S. Lieber. 1966. Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Amer. J. Pathol.* 49: 593

Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo YY. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem.* 2010; 285(17):12604-11.

Leevy CM. Fatty liver: a study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1962;41:249-276.

Lefkowitz JH. Morphology of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2005;9: 37–53.

Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Marechal R, Degre D, Demetter P, de Nadai P, Geerts A, Quertinmont E, Vercruyse V, Le Moine O, Deviere J: The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646–657

Li, N.; Karin, M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEBJ* 1999;13:1137–1143.

Liangpunsakul S, Qi R, Crabb DW, Witzmann F. Relationship Between Alcohol Drinking and Aspartate Aminotransferase: Alanine Aminotransferase (AST:ALT) Ratio, Mean Corpuscular Volume (MCV), Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGT), and Apolipoprotein A1 and B in the U.S. Population. *J Stud Alcohol Drugs*. 2010; 71(2):249-252.

Lieber, C.S., DeCarli, L.M., Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristic and adaptive properties in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 1970; 245: 2505–2512.

Lieber, C.S. *Medical and Nutritional Complications of Alcoholism: Mechanisms and Management*. New York Plenum Press 1992.

Lieber CS, Jones DP, Decarli LM. Effects of prolonged ethanol intake:production of fatty liver despite adequate diets. *J Clin Invest* 1965;44:1009-1021.

Lieber CS, Leo MA, Wang X, Decarli LM. Alcohol alters hepatic FoxO1, p53, and mitochondrial SIRT5 deacetylation function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 373(2):246-52.

Lieber CS. Alcohol: its metabolism and interaction with nutri-ents. *Annu Rev Nutr* 2000;20:395–430.

Lieber CS. Alcohol and the liver. *Gastroenterology* 1994; 106: 1085–1105.

Lieber CS. Ethanol metabolism and pathophysiology of alcoholic liver disease. In: Seitz HK, Kommerell B, eds. *Alcohol related diseases in gastroenterology*. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag, 1985:10-47.

Li L, Chen SH, Zhang Y, Yu CH, Li SD, Li YM. Is the hypoxia-inducible factor-1 alpha mRNA expression activated by ethanol-induced injury, the mechanism underlying alcoholic liver disease? *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006;5:560–563.

Lin M, Rippe RA, Niemela O, Brittenham G, and Tsukamoto H. Role of iron in NF-B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1997; 272: G1355–G1364.

Li YM, Chen SH, Yu CH, Zhang Y, Xu GY. Effect of acute alcoholism on hepatic enzymes and oxidation/antioxidation in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2004; 3(2):241-4

Losso JN, Dhar J, Kummer A, et al. Detection of antibody specificity of raw bovine and human milk to bacterial lipopolysaccharides using PCFIA. *Food Agric Immunol* 1993;5:231-239.

Lovejoy JC. The influence of dietary fats in insulin resistance. *Curr Diab Rep* 2002;2(5):430-40.

Lowry OH, Rosenbroudh NJ, Ferr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265.

Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR: Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009;360:2758–2769.

Lu X L, Luo J Y, Tao M, Gen Y, Zhao P, Zhao H L, et al. Risk factors for alcoholic liver disease in China. *World J Gastroenterol* 2004;10:2423-2426.

Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44:723-738.

M.R. Free radicals : A practical approach, Panchad NA. And Kelly FJ., eds., Oxford Press, 1996

MacSween R N, Scott A R. Hepatic cirrhosis: a clinico-pathological review of 520 cases. *J Clin Pathol* 1973;26:936-942.

Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, Elm Garoui, Jaber H, Makni J, et al. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in ω -3 and ω -6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food Chem Toxicol* 2008;46:3714-20.

Mandayam S, Jamal MM, Morgan TR. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2004;24:217-232.

Mandrekar P, Catalano D, Szabo G. Inhibition of lipopolysaccharide-mediated NF κ B activation by ethanol in human monocytes. *Int Immunol.* 1999 Nov; 11(11):1781-90.

Mantle, D., Preedy, V.R.. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews* 1999;18 (4): 235–252.

Markert L. Klement. *Isozymes II physiological functions.* London 1975

Martinez, F.; Abril, E. R.; Earnest, D. L.; Watson, R. R. Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol* 1992; 9:455–458.

Martinez F, Abril ER, Earnest DL, Watson RR. Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol* 1992;9:455–458.

Mavrelis PG, Ammon HV, Gleysteen JJ, Komorowski RA, Charaf UK: Hepatic free fatty acids in alcoholic liver disease and morbid obesity. *Hepatology* 1983;3:226–231.

McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D: Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:205–219

McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002;27:53–61.

McCord J.M. and Fridovich I., Superoxide dismutase and enzymatic function for erythrocyte (hemocupreine), *J Biol Chem*, 1969; 244: 6049-6055.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function of erythrocyte (hemocupreine). *J Biol Chem* 1969;244:6049–6055.

Mendenhall C, Roselle G A, Gartside P, Moritz T. Relationship of protein calorie malnutrition to alcoholic liver disease: a reexamination of data from two Veterans Administration Cooperative Studies. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:635-641.

Mendenhall CL. Alcoholic hepatitis. *Clin Gastroenterol* 1981;10:417-441.

Mendenhall CL. Anabolic steroid therapy as an adjunct to diet in alcoholic hepatic steatosis. *Am J Dig Dis* 1968;13:783-791.

Mezey E. Dietary fat and alcoholic liver disease. *HEPATOLOGY* 1998; 28:901-905.

Michelangeli F., Grimes E.A., East J.M., Lee A.G., Effects of Phospholipids on the Function of (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase, *Biochemistry*, 30: 342-351, 1991.

Mirić D, Proučavanje slobodnih radikala i antioksidantne zaštite u krvi i likvoru obolelih od meningitisa, *Doktorska Disertacija, Medicinski fakultet, Priština*, 1997.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247(10):3170-5.

Moss DW. Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. *Clin Chim Acta* 1997;257(1):133-40.

Mujović V.M., *Autakoidni sistem*, Nauka, Beograd, 1998.

Mullineaux P.M. and Creissen G., Glutathione reductase: Regulation and Role in Oxidative Stress, in *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, pp. 667-713, 1997.

Murkovic M, Hillebrand A, Winkler J, Pfannhauser W. Variability of vitamin E content in pumpkin seeds (*Cucurbitapepo* L.). *Eur Food Res Technol.* 1996;202:275e8.

Nakanishi T, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, Yamashita H, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Effects of hypo-baric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol* 1995;489:869–876.

Nakano M, Worner T M , Lieber C S. Perivenular fibrosis in alcoholic liver injury: ultra structure and histologic progression. *Gastroenterology* 1982;83:777-785.

Nanji, A. A.; Khettry, U.; Sadrzadeh, S. M. H. Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1994; 205:243–247.

Nanji, Amin A., Kalle Jokelainen, George L. Tipoe, Amir Rahemtulla, Peter Thomas, and Andrew J. Dannenberg. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-B-dependent genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284: 321–327.

Nanji AA, French SW. Dietary linoleic acid is required for development of experimentally induced alcoholic liver injury. *Life Sci.* 1989;44:223–227

Nanji AA, Jokelainen K, Fotouhinia M, Rahemtulla A, Thomas P, Tipoe GL, Su GL, and Dannenberg AJ. Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G1348–G1356, 2001.

Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, and Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 30: 934–943, 1999.

Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology.* 1999 Oct; 30(4):934-43.

Nanji AA, Mendenhall CL, French SW. Beef fat prevents alcoholic liver disease in the rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1989;13:15–19.

Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, Peters D, Tahan SR, and Dannenberg AJ. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 112: 943–951, 1997.

Nanji A A. and Zakim D. Alcoholic liver disease. In: *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*, edited by Zakim D and Boyer TD (3rd ed.). Philadelphia, PA: Saunders, 1996, p. 891–961.

Navasa M, Gordon DA, Hariharan N, Jamil H, Shigenaga JK, Moser A, Fiers W, Pollock A, Grunfeld C, Feingold KR. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein mRNA expression by endotoxin and cytokines. *J Lipid Res* 1998;39:1220–1230.

Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput J C. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *HEPATOLOGY* 1997; 25:108-111.

Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999; 30:987–96.

Nikolić D. *Bolesti zavisnosti*. Narodna knjiga, 2007, Beograd.

Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med*. 1992; 12:219-240.

Nordsblom, G.D., Coon, M.J. Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1977; 180:343–347.

Odze RD GJ: *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*: Saunders Elsevier, 2009.

Ojeda ML, Delgado-Villa MJ, Llopis R, Murillo ML, Carreras O. Lipid Metabolism in Ethanol-Treated Rat Pups and Adults: Effects of Folic Acid. *Alcohol and Alcoholism* 2008; 43(5): 544–550

Oliveira-Marques V, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2223-43.

Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Medline A. Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1987;92:208-214.

Oryan, A., Eftekhari, M.H., Ershad, M. et al. Hepatoprotective effects of whey protein isolate against acute liver toxicity induced by dimethylnitrosamine in rat *Comp Clin Pathol* (2011) 20: 251-257

O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009;51:307–328.

Paglia DE, Valentine WN (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 74-77.

Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(38):6198-202.

Pani G, Fusco S, Colavitti R, Borrello S, Maggiano N, Cravero AA, Farré SM, Galeotti T, Koch OR . Abrogation of hepatocyte apoptosis and early appearance of liver dysplasia in ethanol-fed p53-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Dec 3; 325(1):97-100

Parks D.A. and Granger D.N., Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology, *Acta Physiol Scand*, suppl.1986; 548:87-99.

Pastorino JG, Hoek JB. Ethanol potentiates tumor necrosis factor- α cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2000;31:1141–1152.

Patek AJ Jr. Alcohol, malnutrition, and alcoholic cirrhosis. *Am J Clin Nutr* 1979;32:1304–1312.

Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. *Eur J Cancer Prev.* 2008; 17: 340–4.

Pierce A, Colavizza D, Benaissa M, et al. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur J Biochem.*1991; 196: 177-184.

Polavarapu L. et al. Increased Lipid Peroxidation and Impaired Antioxidant Enzyme Function Is Associated With Pathological Liver Injury in Experimental Alcoholic Liver Disease in Rats Fed Diets High in Corn Oil and Fish Oil. *Hepatology.* 1998; 27:1317-1323.

Popović M. Gvozdenović Lj. Gavrilović S. Uticaj anestetika na funkciju jetre alkoholisanih pacijenata. "Zora", 1996, Novi Sad.

Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab.* 2009; 9(4):327-38

Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., Castro, L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 33 (11):1451–1464.

Rahman I, Kode A, Biswas K S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols* 2006.1(6):3159-65

Reed J D., “Toxicity of oxygen,” in *Molecular and Cellular Mechanisms of Toxicity*, F. De Matteis and L. L. Smith, Boca Raton, Fla, USA, 1995; 35-68.

Rehm J, Samokhvalov AV, Shield KD: Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol.* 2013;59:160–168.

Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjo BK. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem.* 1980;34:1630-8.

Rej R. Aminotransferases in disease. *Clin Lab Med* 1989;9(4):667-87.

Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology.* 1997;25(2):351-5.

Rubin, E., and C. S. Lieber. 1967. Experimental alcoholic hepatic injury in man: ultrastructural changes. *Fed.Proc.* 26: 1458.

Rubin, E., Beattie, D.S., Toth, A., Lieber, C.S. Structural and functional effects of ethanol on hepatic mitochondria. *Federation Proceedings* 1972; 31: 131–140.

Sabesin, S. M., Hawkins H. L., Kuiken L., and Ragland J. B. Abnormal plasma lipoproteins and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology.* 1977; 72: 5 10-5 18.

Salmela, K.S., Kessova, I.G., Tsyroly, I.B., Lieber, C.S. Respective roles of cytochrome P450 2E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 1998; 22:2125–2132.

Sato C, Hasumura Y, Takeuchi J. Interaction of ethanol with drugs and xenobiotics. In: Seitz HK, Kommerell B, eds. Alcohol related diseases in gastroenterology. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag, 1985:172-84.

Sautier C., Dieng K., Flament C., Doucet C., Suquet P. J. and Lemonier D. Effects of whey protein, casein, soya-bean and sunflower proteins on the serum, tissue and faecal steroids in rats* Br. J. Nutr. 1983;49:313.

Savolainen V T, Liesto K, Mannikko A, Penttila A, Karhunen P J. Alcohol consumption and alcoholic liver disease: evidence of a threshold level of effects of ethanol. Alcohol Clin Exp Res 1993;17:1112-1117.

Sayed Abdel Aal F. The Protective Effect of Pumpkin Seed Oil on Azathioprine-Induced Hepatic Toxicity in Adult Male Albino Rats: Histological and Immunohistochemical Study. Basic Sciences of Medicine 2014, 3(4): 85-100

Schlaeger R, Haux D, Kattermann R. Studies on the mechanism of the increase in serum alkaline phosphatase activity in cholestasis: significance of the hepatic bile acid concentration for the leakage of alkaline phosphatase from rat liver. Enzyme 1982;28(1):3-13.

Schonfeld G, Weidmar SW, Witztum JL, et al: Alterations in levels and interrelations of plasma apolipoproteins induced by diet. Metabolism 25: 261, 1976

Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors. Dig Dis. 2009;27:80–92.

Scott G., Antioxidants the modern elixir?, Chem Britain, 31: 879-882, 1995.

See D, Mason S, Roshan R. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers. Immunol Invest 2002;31:137-153.

Seif Abou Sayed H. Ameliorative effect of pumpkin oil (*Cucurbita pepo* L.) against alcohol-induced hepatotoxicity and oxidative stress in albino rats. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 2014;3(3):178-185

Seitz HK, Stickel F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. Genes Nutr. 2009.

Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J. Alcohol and oxidative stress. Pathologie Biologie 2001; 49 (9), 689–695.

Shanmugam KR, Mallikarjuna K, Nishanth K, Chien H, Kuo W, Hua C, Sathyavelu K. Ginger feeding protects against renal oxidative damage caused by alcohol drinking in rats. *J Ren Nutr* 2011;21(3):263e70.

Shan X, Aw TY, Shapira R, Jones DP. Oxygen dependence of glutathione synthesis in hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;101:261–270.

Shaw S, Jayatilleke E, Ross WA, Gordon ER, Lieber S. Ethanol-induced lipid peroxidation: potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine. *J Lab Clin Med* 1981;98:417–424.

Shi L, Kishore R, McMullen MR, Nagy LE. Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF-alpha production via Egr-1. *Am J Physiol* 2002;282:1205–1211.

Sieg A. and Seitz K.H. Increased Production, Hepatic Conjugation, and Biliary Secretion of Bilirubin in the Rat After Chronic Ethanol Consumption *Gastroenterology* 1987;93:261-6

Sies H., Oxidative stress: Introductory remarks, in *Oxidative Stress* (ed. H. Sies), Academic Press, New York, pp. 1-8, 1985.

Simić T. Dopuna priručnika iz medicinske biohemije. Medicinski fakultet, 2010, Beograd.

Sorensen TI, Orholm M, Bentsen KD, Hoybye G, Eghoje K, Christoffersen P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet* 1984;2:241-244.

Steijns JM, Van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br J Nutr.* 2000; 84: S11-S17.

Stevenson DG, Eller FJ, Wang L, Jane JL, Wang T, Inglett GE. Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. *J Agric Food Chem* 2007;55(10):4005e13.

Stewart S H. Racial and ethnic differences in alcohol-associated aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase elevation. *Arch Intern Med* 2002;162:2236-2239.

Stinson F S, Grant B F, Dufour M C. The critical dimension of ethnicity in liver cirrhosis mortality statistics. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1181-1187.

Stoian I., Oros A., and Moldoveanu E., "Apoptosis and free radicals," *Biochemical and Molecular Medicine*, 1996;74(2):93-97.

Szabo G, Mandrekar P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33:220–32.

Tang Y., Banan A., Forsyth B.C., Fields Z. J., Lau K. C., Zhang J. L., Keshavarzian A. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease, *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 2008;355-364

Tannapfel A, Denk H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, Flott-Rahmel B. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Arch* 2011; 458: 511-523.

Terada L.S., Leff J.A., Repine J.E. Measurement of xanthine oxidase in biological tissues. *Methods Enzymol*. 1990;186:651–656.

Testino G. Alcoholic diseases in hepato-gastroenterology: a point of view. *Hepatogastroenterology*. 2008;55:371–7.

Theise. N. Histopathology of alcoholic liver disease. *Clinical Liver disease*, 2013;2: 64–67.

Thiele G. M. , Freeman T.K. , Klassen L.W, *Semin. Liver Dis*. 24 (2004) 273.

Thurman RG. Mechanisms of hepatic toxicity. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol* 1998;275:G605–G611.

Trabut J B, Plat A, Thepot V, Fontaine H, Vallet-Pichard A, Nalpas B, et al. Influence of liver biopsy on abstinence in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 2008;43:559-563.

Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, Brittenham GM. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995;96:620–630.

Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J*. 2001; 15:1335-1349.

Tsukamoto H, Xi XP. Incomplete compensation of enhanced hepatic oxygen consumption in rats with alcoholic centrilobular liver necrosis. *Hepatology* 1989;9:302–306.

Turrens, J.F., Alexander, A., Lehninger, A.L. Ubisemiquinone is the electron donor of superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1985;237: 408–414.

Turrens, J.F., Boveris, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical Journal* 1980; 191, 421–427.

Uesegi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Gabele E, Wheeler MD, and Thurman RG. Delivery of IB superrepressor gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Hepatology* 2001; 34: 1149–1157.

Uhl G R, Liu Q R, Walther D, Hess J, Naiman D. Polysubstance abuse-vulnerability genes: genome scans for association, using 1,004 subjects and 1,494 single-nucleotide polymorphisms. *AmJHumGenet* 2001;69:1290-1300.

Vanderlinde RE. Review of pyridoxal phosphate and the transaminases in liver disease. *Ann Clin Lab Sci* 1986;16(2):79-93.

Van Hoetegem P, Fevery J, Blanckaert N. Serum bilirubins in hepatobiliary disease: comparison with other liver function tests and changes in the postobstructive period. *Hepatology* 1985;5(1):112-7.

Velayudham LS, Farrell GC. Drug-induced cholestasis. *Expert Opin Drug Saf* 2003;2(3):287-304.

Vetriselvan S, Rajamanikkam V, Parimala Devi, Subasini Arun G. Comparative evaluation of hepatoprotective activity of *andrographis paniculata* and silymarin in ethanol induced hepatotoxicity in albino wistar rats. *Der Pharm Lett* 2010;2(6):52e9

Vodič za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Odbor za lipide Endokrinološke sekcije Srpskog lekarskog društva, Udruženje za aterosklerozu Srbije. Beograd 2011.

Watanabe A, Okada K, Shimizu Y, et al. Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein (non-heated). *J Med* 2000;31:283-302.

Wheeler MD, Kono H, Yin M, Rusyn I, Froh M, Connor HD, Mason RP, Samulski RJ, Thurman RG. Delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Gastroenterology* 2001;120:1241–1250.

Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, Uesugi T, Mason RP, Connor HD, Dikalova A, Kadiiska M, Thurman RG. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J Biol Chem* 2001;276:36664–36672.

Wheeler MD, Yamashina S, Froh M, Rusyn I, Thurman RG. Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF-kappaB activation and cytokine production. *J Leukoc Biol.* 2001; 69(4):622-30.

Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW, Martin NG. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25(7):1037-45.

Wickramasinghe S N, Corridan B, Izaguirre J, Hasan R, Marjot D H. Ethnic differences in the biological consequences of alcohol abuse: a comparison between south Asian and European males. *Alcohol Alcohol* 1995;30:675-680.

Worner T M, Lieber C S. Perivenular fibrosis as precursor lesion of cirrhosis. *JAMA* 1985;254:627-630.

Wroblewski F. The clinical significance of alterations in transaminase activities of serum and other body fluids. *Adv Clin Chem* 1958;1(2):313-51.

Wu, D., Cederbaum, A.I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health* 2003; 27 (4), 277–284.

Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y, Okazaki S. p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004; 279(20):571-5.

Yamamoto Y and Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of NF-B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107: 135–142, 2001.

Yip WW, Burt AD. Alcoholic liver disease. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 149-160.

Yost GS, Finley BL. Ethanol as an inducer of UDP-glucuronyltransferase: a comparison with phenobarbital and 3-methylcholanthrene induction in rabbit hepatic microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;11:210-23.

Younis YM, Ghirmay S, al Shihry SS. African *Cucurbita pepo* L.: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry* 2000; 54(1):71-75

Yu P. B., "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species," *Physiological Reviews*, vol. 74, no. 1, pp. 139–162, 1994.

Zhao W. Z. et al. Antialcoholic liver activity of whey fermented by *Lactobacillus casei* isolated from koumiss. *American Dairy Science Association*, 2014; 97 :4062–4071.

Zima, T., Fialova, L., Mestek, O., Janebova, M., Crkovska, J., Malbohan, I., Stipek, S., Mikulikova, L., Popov P., Oxidativestress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *Journal of Biomedical Science* 2001; 8 (1): 59–70.

Zindenberg-Cherr S, Halsted CH, Olin KL, Reisenauer AM, Keen CL. The effect of chronic alcohol ingestion on free radical defense in the miniature pig. *J Nutr* 1990;120:213-217.

Zindenberg-Cherr S, Olin KL, Villanueva J, Tang A, Phinney SD, Halstead CH, Keen CL. Ethanol-induced changes in hepatic free radical defense mechanisms and fatty acid composition in the miniature pig. *HEPATOLOGY* 1991;13:1185-1192

Đuračková Z., "Some current insights into oxidative stress," *Physiological Research*, vol. 59, no. 4, pp. 459–469, 2010.

Đorđević V.B., Pavlović D.D., Kocić G.M., *Biohemija slobodnih radikala*, Medicinski fakultet, Niš, 2000.

Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Niciforovic A, Radojic MB. Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats *Physiol Res*. 2010;59(5):729-36.

Izjava o autorstvu

Potpisan: Ivan Radić

Broj indeksa: 182/14

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija

DEJSTVO SURUTKE I TIKVINOGL ULJA (*Cucurbita pepo L.*) NA OŠTEĆENJA JETRE PACOVA INDUKOVANIH ALKOHOLOM

- 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

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ivan Radić

Broj indeksa: 182/14

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: **Dejstvo surutke i tikvinog ulja (*Cucurbita Pepo L.*) na oštećenja jetre pacova indukovanih alkoholom**

Mentor: Prof. dr Snežana Janićijević Hudomal

Potpisan: Ivan Radić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Prištini, sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici.**

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 Prištini, sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici.

Potpis doktoranda

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Prištini, sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

DEJSTVO SURUTKE I TIKVINOGL ULJA (*Cucurbita pepo L.*) NA OŠTEĆENJA JETRE PACOVA INDUKOVANIH ALKOHOLOM

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

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 poleđini lista).

Potpis doktoranda
