

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Aida Begić

**INTERFERENCIJA TIOLNIH GRUPA METABOLITA
DISULFIRAMA SA GLUTATIONSKIM ODGOVOROM NA
OKSIDATIVNI STRES INDUKOVAN KADMIJUMOM I/ILI
ALKOHOLOM U JETRI PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Aida Begic

**INTERFERENCE OF THE FREE THIOL GROUP OF
DISULFIRAM METABOLITE AND GLUTATHIONE
RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS INDUCED WITH
CADMIUM AND/OR ALCOHOL IN THE LIVER OF *WISTAR*
RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Komisija za ocjenu i odbranu završene doktorske teze u sastavu:

Mentor:

Dr sc. Mirjana Đukić, redovni profesor, mentor i predsjednik Komisije
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Milica Ninković, vanredni profesor, mentor
Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Beograd

Dr sc. Dragana Vujanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Danijela Đukić-Ćosić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Milena Simić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Izjava zahvalnosti

Želim da izrazim svoju zahvalnost svima koji su mi pomogli u izradi doktorske disertacije.

Prije svih, mentoru, profesorici Mirjani Đukić koja ne samo da me naučila sveukupnom naučnom istraživanju, od postavljanja eksperimentalnog dizajna, preko analitičkog pristupa i precizne interpretacije dobijenih rezultata kroz pisanje naučnih radova, nego i mnogim životnim lekcijama. Naprosto naš prisniji odnos od onog mentora i studenta je učinio svaki moj boravak u Beogradu i svaki segment studija, ugodnijim i ispunjenijim. Mojoj dragoj Ani, kolegici koja mi je nesebično pomagala u svakom segmentu istraživanja i bodrila me da izdržim sve poteškoće. Naše prijateljstvo izuzetno cijenim i nadam se da će da traje cijeli život.

Profesorici Milici Ninković koja je dala svoj doprinos kao komentor, dr. sc. Ivani Stevanović koja je uvijek s puno entuzijazma pristupala svim našim analizama i pružala pomoć u raznim oblicima, tehničarima Marini, Vesni, Veri, svima iz Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije koji su moj boravak i rad u laboratorijama učinili ugodnim, profesoru Danilu, načelniku Odjeljenja za kliničku i eksperimentalnu imunologiju Instituta za medicinska istraživanja i dr. sc. Ivanu Stanojeviću, koji su nam ustupili svoje laboratorije za istraživanje.

Zaista mi je veliko zadovoljstvo bilo koristiti savremene laboratorije Instituta za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta, gdje sam upoznala divnu Veru, rukovodioca toksikološke laboratorije, i njen tim, Dušicu, Anđelku, Mariju, Nađu, koje su sve učinile da moj boravak bude ugodan i produktivan.

Bratislavu Dejanoviću koji nam je otvorio vrata biohemijskog laboratorija u Vojnomedicinskom centru.

Kolegicama sa naše katedre takođe i gospođi Ružici iz studentske službe..

Zahvalna sam svojim roditeljima i sestri, roditeljima mog supruga, rođaku Ervinu, koji su mi svi na svoj način pružali i moralnu i finansijsku podršku tokom svih godina studija.

I posebna zahvalnica mom suprugu Mirsadu, koji je uvijek vjerovao u mene i ponosio se svim mojim malim i velikim uspjesima, koji su zapravo zajednički. Hvala mu na svakoj riječi ohrabrenja, na svakoj pratnji u Beograd kako ne bih bila sama u nepoznatom gradu i na svim drugim žrtvama koje je zahtijevao ovaj studij.

Interferencija tiolnih grupa metabolita disulfirama sa glutationskim odgovorom na oksidativni stres indukovani kadmijumom i/ili alkoholom u jetri pacova

Rezime

Mehanizmi hepatotoksičnog efekta individualne i paralelne izloženosti organizma kadmijumu (Cd) i/ili etanolu su dovoljno ispitani, dok efekti disulfirama (DSF) na jetru nakon prethodne izloženosti organizma Cd i/ili etanolu, kao i tokom koekspozicije sa Cd, nisu istraženi. Imajući u vidu da je duvanski dim značajan izvor izloženosti Cd, zatim, da su alkoholičari uglavnom i pušači, te da je averzivna terapija DSF dio realnog scenarija liječenja alkoholizma, cilj ove studije je bio da se ispituju efekti individualne izloženosti DSF na redoks status (posebno u domenu glutationskog ciklusa), status esencijalnih metala i funkciju jetre, kao i na status jetre nakon prethodne izloženosti organizma Cd i/ili etanolu, kao i tokom koekspozicije sa Cd, iz razloga što ovi pacijenti nastavljaju sa pušenjem cigareta tokom terapije DSF, dok je unos alkohola ukinut. Rasvjetljavanje interferencije sulfhidrilne (-SH) grupe metabolita DSF sa antioksidativnim odgovorom glutationskog ciklusa, kao i statusom metala u jetri u datim eksperimentalnim uslovima bio je fokus ovog istraživanja, što je od značaja ako uzmemo u obzir da i Cd i etanol, kao i izmijenjeni status esencijalnih metala remete redoks metabolizam, odnosno mijenjaju glutationski status u jetri.

Analitika simultanog određivanja redukovano i oksidovanog oblika glutaciona (GSH i GSSG) iz homogenata jetre tretiranih pacova, primjenom visoko efikasne tečne hromatografije uz UV detekciju (HPLC-UV), bio je dodatni cilj ove disertacije.

Sprovedena animalna studija (na pacovima *Wistar* soja, mužjacima, $n = 210$) imala je za cilj da imitira okolnosti alkoholičara-pušača prije i tokom primjene DSF i trajala je za pojedine eksperimentalne grupe 21, odnosno 42 dana. Etanol, DSF i maslinovo ulje (OIO) kao rastvarač za DSF, su davani oralnim putem (gavažom), a Cd intraperitonealno, na dnevnoj bazi. Oformljene eksperimentalne, kao i kontrolne grupe imala su podgrupe, shodno terminima žrtvovanja pacova (1, 3, 10, 21 i 42 dana), navedenih u u subscriptu, i činilo ih je po 6 pacova: tri kontrolne grupe (C_{1-42} , OIO_{1-21} i OIO_{22-42}); tri grupe koje su individualno bile izložene ispitivanim agensima (A_{1-21} , Cd_{1-42} i DSF_{1-21}); i četiri grupe koje su bile paralelno izložene ispitivanim agensima (A_{1-21}/Cd_{1-21} , A_{1-21}/DSF_{22-42} , Cd_{1-42}/DSF_{22-42} i $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$).

U homogenatu jetre mjereni su parametri oksidativnog stresa (OS): spektrofotometrijski - superoksidni anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), malondialdehid (MDA), aktivnosti katalaze (CAT),

bakar/cink i mangan superoksidne dismutaze (Cu/Zn-SOD i Mn-SOD), glutation reduktaze (GR), glutation-S-transferaze (GST) i glutation peroksidaze (GPx); hromatografski - GSH i GSSG. Esencijalni metali bakar (Cu), željezo (Fe), cink (Zn) i magnezijum (Mg) i toksični metal Cd mjereni su atomskom apsorpcionom spektrometrijom (AAS) sa plamenom tehnikom, a selen (Se) sa hidridnom- AAS. Dalje, u plazmi su spektrofotometrijski mjereni enzimi funkcionalnog statusa jetre: aspartat aminottransferaza (AST) i alanin aminottransferaza (ALT). Na kraju, histopatološkom analizom je ustanovljen stepen morfološki narušenog integriteta tkiva jetre pacova izloženih dejstvu ispitivanih agenasa.

Uvođenjem DSF značajno se smanjuje aktivnost ALT u plazmi i povećava koncentracija bioelemenata u jetri pacova prethodno izloženih Cd i/ili etanolu (povećava koncentraciju Fe i Se kod grupe A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂, i Cu, Zn, Fe i Se kod grupa Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂). Nije zabilježen efekat na koncentraciju Mg u jetri u ispitivanim grupama. Efekat na parametre OS izražen je kroz značajno smanjenje nivoa O₂^{•-} i MDA (smanjen stepen lipidne peroksidacije) u svim kombinovanim tretmanima, iako vrijednosti ne dostižu nivo kontrolnih vrijednosti, te dvostruko nižu vrijednost odnosa GSSG/GSH (Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂). Takođe, uvođenjem DSF povećava se aktivnost CAT u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi, potpuno se regenerišu SOD i GR, prethodno inhibirane Cd u grupi Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂, te se djelimično regeneriše SOD, prethodno inhibirana koekspozicijom Cd i etanola (A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂). Histopatološka analiza je pokazala da DSF *per se* ne mijenja normalnu mikroarhitekturu jetre, dok je u grupi Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ zabilježeno smanjenje obima infiltracije neutrofila u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu.

Utvrđen je reparativni antioksidativni potencijal DSF kod prethodno narušenog redoks statusa i statusa bioelemenata u jetri pacova izloženih Cd i/ili etanolu. U nastavku ovih istraživanja, očekujemo da bi klinička studija istraživanja redoks statusa i statusa metala ne samo u jetri, već sistemskog statusa navedenih efekata kod hospitalizovanih alkoholičara-pušača na terapiji DSF utvrdila poseban naučni doprinos ovih ispitivanja od značaja za javno zdravlje.

Ključne riječi: kadmijum, etanol, disulfiram, oksidativni stres, glutationski ciklus, esencijalni bioelementi, jetra, *Wistar* pacov

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Toksikologija

UDK broj: 615.9:[616.8:616.3(043.3)]

Interference of the free thiol group of disulfiram metabolite and glutathione response to oxidative stress induced with cadmium and/or alcohol in the liver of *Wistar* rats

Abstract

Mechanisms involved in genesis of hepatotoxic effects following individual and parallel exposure to cadmium (Cd) and/or ethanol, are thoroughly investigated. However, the effects of disulfiram (DSF) introduced to treatment following exposure to Cd and/or ethanol were not formerly presented in studies. While conducting the study it was taken into consideration that cigarette smoke is a significant source of Cd exposure, as well as that alcoholics are most likely smokers, and also that aversive therapy with DSF is a real life scenario in alcohol dependence treatment. The aim of the study was to investigate the effects of individual exposure to DSF related to redox status (particularly in domain of glutathione cycle), essential metals status and liver function, as well as the status following exposure to Cd and/or ethanol and also during co-exposure with Cd, considering that patients undergoing DSF treatment continue with heavy smoking, whilst alcohol intake is excluded. The focus of the study was set on elucidation of possible interference of the free thiol (–SH) group of DSF metabolite and antioxidant glutathione response, as well as essential metals status under specified experimental conditions. Additionally, Cd and ethanol, along with changed essential metals status affect glutathione homeostasis in the liver.

Both glutathione forms, reduced and oxidized (GSH and GSSG), were measured by high performance liquid chromatography method with UV detection (HPLC-UV).

The conducted animal study (male *Wistar* rats, n = 210) aimed to mimic circumstances in the liver of alcoholics-smokers before and during DSF treatment, with defined duration of 21 or 42 days for different experimental groups. Ethanol, DSF and olive oil (OIO), used as DSF solvent, were daily administered orally (via gavage), whilst Cd was administered intraperitoneally. Each of defined experimental and control groups was divided, according to the chosen time of exposure (1, 3, 10, 21 and 42 days), in subgroups (specified in subscript) constituted of 6 rats: three control groups (C₁₋₄₂, OIO₁₋₂₁ and OIO₂₂₋₄₂); three groups individually exposed to investigated agents (A₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂ and DSF₁₋₂₁); and four groups with parallel exposure to investigated agents (A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁, A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂, Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ and A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂).

Liver tissue homogenates were used for the measurement of the following oxidative stress (OS) parameters: spectrophotometric measurement of superoxide anion radical (O₂^{•-}), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT), copper/zinc and manganese superoxide

dismutase (Cu/Zn-SOD i Mn-SOD), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) activities; chromatographic measurement of GSH and GSSG. Essential metals copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn), magnesium (Mg), as well as toxic metal Cd were measured by atomic absorption spectrometry with flame (AAS), while selenium (Se) with hydride generation-AAS. Liver function status enzymes were spectrophotometrically measured in rat plasma: aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities. Finally, histopathological analysis of liver tissue was performed and the loss of morphological integrity of liver tissue was determined, following exposure of rats to investigated agents.

Introduction of DSF in the treatment of rats, previously exposed to Cd and/or ethanol, significantly lowered plasma level of ALT activity and increased concentration of essential metals in the liver (increase of Fe and Se level in A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ group, and Cu, Zn, Fe and Se level in Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ and A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ groups). The effect on Mg level was not observed in any of the applied treatments. Furthermore, the effect considering analyzed OS parameters was ascertained through significant decline in O₂^{•-} and MDA concentration (diminished lipid peroxidation) in all combined treatments, though it did not reach control values, and two times lower value of GSSG/GSH ratio (Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ and A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂). Disulfiram also increased CAT activity in A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ group, nearly restored SOD and GR activities, previously reduced during individual exposure to Cd, in Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ group, and partially restored SOD activity, previously reduced during co-exposure to Cd and ethanol, in A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ group. Liver histopathology showed that DSF *per se* did not change normal liver microarchitecture, whilst reduction of neutrophil infiltration was noted within Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ group compared to Cd₁₋₄₂ group.

The reparative antioxidant potential of DSF after impairment of redox and essential metals status in the liver of rats previously exposed to Cd and/or ethanol is confirmed. Further investigation in the domain of a clinical study, considering not only liver but also systemic redox and essential metals status in hospitalized recovering alcoholics-smokers undergoing DSF treatment would be considered of great importance for public health.

Key words: cadmium, ethanol, disulfiram, oxidative stress, essential bioelements, glutathione cycle, liver, *Wistar* rats

Academic Expertise: Pharmacy

Major in: Toxicology

UDK No: 615.9:[616.8:616.3(043.3)]

SKRAĆENICE

AceCS.....	acetil-CoA sintetaza
ADH.....	alkoholna dehidrogenaza
ALD.....	alkoholne bolesi jetre
ALDH.....	aldehidna dehidrogenaza
ALT.....	alanin aminotransferaza
AOS.....	antioksidativni sistem zaštite
AST.....	aspartat aminotransferaza
CAT.....	katalaza
Cd.....	kadmijum
Cu/Zn SOD.....	bakar/cink superoksid dismutaza
DDC.....	<i>N,N</i> -dietilditiokarbamata
DSF.....	disulfiram
FAEE.....	etil estri masnih kiselina
GCL.....	glutamat-cistein ligaza
GGT.....	γ -glutamil transferaze
GPx.....	glutation peroksidaza
GR.....	glutation reduktaza
GSH.....	redukovani glutacion
GSS.....	glutation sintaza
GST.....	glutation-S-transferaza
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
LPO.....	lipidna peroksidacija
MDA.....	malondialdehid
MeDDC.....	<i>S</i> -metil <i>N,N</i> -dietilditiokarbamat
MeDDC sulfin.....	<i>S</i> -metil <i>N,N</i> -dietilditiokarbamat sulfin
MeDDC sulfoksid..	<i>S</i> -metil <i>N,N</i> -dietilditiokarbamat sulfoksid
MeDTC sulfoksid..	<i>S</i> -metil <i>N,N</i> -dietiltiokarbamat sulfoksid
MnSOD.....	mangan superoksid dismutaza
MPTP.....	povećana permeabilnost mitohondrijalnih pora
MT.....	metalotionein
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH.....	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
O ₂ ⁻	superoksidni anjon radikal
OS.....	oksidativni stres
ROOH.....	lipidni hidroperoksidi
ROS.....	reaktivne kisikove vrste

SADRŽAJ

Izjava zahvalnosti	4
Rezime	5
Abstract	7
1. UVOD	13
1.1. ZNAČAJ I FUNKCIJA JETRE I MEHANIZMI HEPATOTOKSIČNOSTI	13
1.2. KADMIJUM	14
1.2.1. Toksikološki značaj	14
1.2.2. Toksikokinetika	15
1.2.3. Toksični efekti	15
1.3. ETANOL.....	17
1.3.1. Toksikološki značaj	17
1.3.2. Farmakokinetika	17
1.3.3. Toksični efekti	18
1.4. DISULFIRAM.....	19
1.4.1. Primjena.....	19
1.4.2. Farmakokinetika	20
1.4.3. Toksični efekti	20
1.4.4. Prooksidativni i antioksidativni efekti	21
1.5. GLUTATION.....	22
1.5.1. Značaj u očuvanju ćelijske homeostaze.....	22
1.5.2. Sinteza i degradacija glutaciona.....	22
1.5.3. Oksidacija proteinskih tiola	23
1.5.4. Opravdanost izbora i optimizacija metode za paralelno određivanje redukovanog i oksidiranog glutaciona u animalnim tkivima	23
2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	25
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1. Hemikalije	27
3.2. Eksperimentalne životinje	27
3.3. Eksperimentalni protokol	27
3.4. Priprema tkiva jetre za histopatološku analizu	29
3.5. Određivanje aktivnosti enzima funkcije jetre u plazmi	30
3.6. Određivanje metala u uzorcima jetre.....	30
3.6.1. Reagensi i standardi.....	30
3.6.2. Priprema uzoraka.....	31
3.6.3. Određivanje koncentracije metala	31

3.7.	Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u homogenatima tkiva jetre	31
3.7.1.	Hemikalije	31
3.7.2.	Priprema homogenata za određivanje superoksid anjon radikala, malondialdehida i aktivnosti enzima.....	32
3.7.3.	Priprema homogenata za određivanje glutaciona.....	32
3.7.4.	Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	33
3.7.5.	Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva jetre	33
3.7.6.	Određivanje koncentracije malondialdehida	34
3.7.7.	Određivanje koncentracije superoksid anjon radikala.....	34
3.8.	Statistička obrada podataka	38
4.	REZULTATI.....	39
4.1.	Optimizacija izokratske HPLC-UV metode za paralelno određivanje redukovano i oksidiranog glutaciona u animalnim tkivima	39
4.1.1.	Optimizacija hromatografskih uslova.....	39
4.1.2.	Primjenjivost metode.....	41
4.1.3.	Validacija optimizirane metode.....	46
4.2.	TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA I/ILI ETANOLA NA JETRU <i>W</i> STAR PACOVA	48
4.2.1.	Efekti kadmijuma i/ili etanola na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre <i>W</i> star pacova	48
4.2.2.	Koncentracija kadmijuma u jetri	52
4.2.3.	Efekti kadmijuma i/ili etanola na koncentraciju bioelemenata u jetri	53
4.2.4.	Efekti kadmijuma i/ili etanola na parametre oksidativnog stresa u jetri	58
4.3.	EFEKTI DISULFIRAMA <i>PER SE</i> NA JETRU <i>W</i> STAR PACOVA	67
4.3.1.	Efekti disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre <i>W</i> star pacova.....	67
4.3.2.	Efekti disulfirama na koncentraciju bioelemenata u jetri	68
4.3.3.	Efekti disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri	70
4.4.	EFEKTI KOMBINOVANE PRIMJENE ETANOLA I DISULFIRAMA NA JETRU <i>W</i> STAR PACOVA..	73
4.4.1.	Efekti kombinovane primjene etanola i disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre <i>W</i> star pacova	73
4.4.2.	Efekti kombinovane primjene etanola i disulfirama na koncentraciju bioelemenata u jetri	75
4.4.3.	Efekti kombinovane primjene etanola i disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri	76
4.5.	EFEKTI KOMBINOVANE PRIMJENE KADMIJUMA I DISULFIRAMA NA JETRU <i>W</i> STAR PACOVA	77
4.5.1.	Efekti kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre <i>W</i> star pacova	77

4.5.2.	Efekti kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na koncentraciju bioeleminata u jetri	79
4.5.3.	Efekti kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri	80
4.6.	EFEKTI KOMBINOVANE PRIMJENE KADMIJUMA, ETANOLA I DISULFIRAMA NA JETRU WISTAR PACOVA	81
4.6.1.	Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre Wistar pacova	81
4.6.2.	Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na koncentraciju bioeleminata u jetri	83
4.6.3.	Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri	84
5.	DISKUSIJA	87
5.1.	Efekti na funkciju jetre i histopatološki nalaz	89
5.2.	Efekti na koncentraciju bioeleminata u jetri	92
5.3.	Efekti na parametre oksidativnog stresa u jetri	97
6.	ZAKLJUČAK	107
7.	LITERATURA	109
8.	PRILOZI	119
	Biografija autora	137
	Izjave	139
	Изјава о ауторству	139
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	140
	Изјава о коришћењу	141

1. UVOD

1.1. ZNAČAJ I FUNKCIJA JETRE I MEHANIZMI HEPATOTOKSIČNOSTI

Brojni ksenobiotici, terapeutici i sredstva koja izazivaju zavisnost uzrokuju oštećenje jetre. Jetra je zapravo dominantno ciljni organ dejstva različitih jedinjenja usljed specifičnog položaja i uloge u održavanju metaboličke homeostaze u tijelu. Sve važne funkcije jetre mogu biti izmijenjene usljed akutne ili hronične izloženosti toksikantima. Toksični agensi mogu uzrokovati disfunkciju jetre bez značajnog oštećenja ćelija, ili disfunkcija može nastati nakon oštećenja značajnog broja ćelija koje u konačnici bivaju zamijenjene nefunkcionalnim ožiljačnim tkivom. Strukturna organizacija jetre uključuje dva režnja i režnjiće heksagonalnog oblika koji predstavljaju temeljne funkcionalne jedinice jetre (acinus). Jetra ima dvostruki krvnožilni sistem koji uključuje portnu venu (dovodi krv iz probavnog sistema) i hepatičku arteriju (snabdijeva jetru hranom i kisikom). U središtu režnjića se nalazi centralna vena koja odvodi krv iz režnjića, a oko nje se zrakasto šire redovi jetrenih ćelija – hepatocita. Između dva niza hepatocita se nalazi žučni kanalić.

Oštećenje hepatocita može nastati usljed destrukcije citoskeleta (deformacija hepatocita), zastoja žuči i disfunkcije mitohondrija (Casarett i sar., 2012). Brojna istraživanja su pokazala da je disfunkcija mitohondrija jedan od glavnih mehanizama ksenobioticima indukovano oštećenja jetre, koje može uzrokovati polazna komponenta ili reaktivni metaboliti nastali biotransformacijom putem CYP450 enzimskog sistema ili drugim metaboličkim putem. Promjene nastale u mitohondrijama mogu uzrokovati akumulaciju lipida, najčešće usljed inhibicije mitohondrijalne β -oksidacije masnih kiselina. Iako mehanizmi toksičnog djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da važnu ulogu ima prekomjerna produkcija reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*- ROS) u oštećenim mitohondrijama (Begriche i sar., 2011). Stoga, oštećenja mitohondrija mogu uzrokovati različite štetne efekte, kao što su nastanak oksidativnog stresa (engl. *oxidative stress*- OS), praznjenje energetske rezerve, akumulaciju lipida (steatoza) i posljedično ćelijsku smrt. U fiziološkim uslovima u mitohondrijama nastaju ROS usljed reagovanja elektrona iz elektron-transportnog lanca sa kisikom, pri čemu nastaje superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$). Nastali radikal, u reakciji dismutacije, mitohondrijalni enzim mangan superoksid dismutaza (MnSOD) prevodi u vodonik peroksid (H_2O_2), kojeg pak dalje enzim glutation peroksidaza (GPx) prevodi u vodu uz korištenje redukovano glutationa (GSH) kao kofaktora. Dakle, u fiziološkim uslovima veći dio ROS biva neutralizirano od strane antioksidativnog sistema (AOS) zaštite. Preostale ROS difunduju van iz mitohondrija i

djeluju kao pokretači ćelijskih procesa kao što je mitogeneza. Sam proces detoksifikacije ROS može biti nadvladan u različitim patofiziološkim stanjima, naročito ukoliko dođe do pražnjenja rezervi GSH u mitohondrijama jetre, što umanjuje mogućnost detoksifikacije H₂O₂, budući da mitohondrije ne sadrže enzim katalazu (CAT) koja za svoju ulogu ne zahtijeva utrošak GSH. Biološka uloga CAT je dakle, zaštita organizma od štetnog djelovanja H₂O₂, kad njegova koncentracija dosegne neuobičajeno visoku razinu. Akumulacija H₂O₂ iznad kritične vrijednosti vodi ka mitohondrijalnoj disfunkciji, povećanoj permeabilnosti mitohondrijalnih pora (MPTP) i ćelijskoj smrti. Hronična intoksikacija alkoholom i ekspozicija kadmijumu (Cd) su neka od stanja koja dovode do pražnjenja rezervi GSH unutar mitohondrija (Begriche i sar., 2011; Rikans i Yamano, 2000). Navedeno govori o kompleksnosti nastanka OS kao mehanizma hepatotoksičnosti ispitivanih toksičnih agenasa koji su predmet istraživanja, kao i kapacitetu AOS u prevenciji toksičnosti.

1.2. KADMIJUM

1.2.1. Toksikološki značaj

Toksičnost teškog metala Cd dobija sve više na značaju u javnosti, čemu uveliko doprinosi klasifikacija Cd kao karcinogena prve grupe (IARC grupa 1) (ATSDR, 2012; IARC, 1993; Ogasawara i sar., 2014). Kadmijum dospijeva u lanac ishrane putem poljoprivrednog tla, koje može ili prirodno sadržavati Cd ili Cd može dospijeti u tlo kao rezultat antropogenih aktivnosti. Za razliku od prirodnog puta kojim Cd dospijeva u životnu sredinu, pri povećanoj vulkanskoj aktivnosti ili izbijanju šumskih požara, veću zabrinutost izaziva povećanje koncentracije Cd kojem doprinose antropogene aktivnosti kao što su sagorijevanje komunalnog otpada, naročito nikl (Ni)-Cd baterija i plastike, rudarstvo i metalurgija cinka (Zn), bakra (Cu), olova (Pb) i Ni itd. (UNEP, 2010). Najveće koncentracije Cd prisutne su u lisnatom povrću kao što je zelena salata, špinat, krompir, žitarice, te u iznutricama životinja- jetri i bubrežima. Nizak nivo Cd se očekuje u pitkoj vodi i vazduhu, izuzev u blizini industrije koja emituje Cd ili insineratora (ATSDR, 2012). Ekotoksikološki značaj Cd je u njegovoj sposobnosti bioakumulacije (biološki poluživot preko 20 godina). Dospijevanje Cd u poljoprivredno tlo nije značajno samo sa aspekta unosa kontaminirane hrane, nego kod pušača povećava opterećenje Cd skoro dvostruko u poređenju sa nepušačima, budući da listovi duhana akumuliraju visoke koncentracije Cd iz tla (ATSDR 2012; NTP 2000; Smith i sar., 1997). Upravo je izloženost pušača Cd cilj datog

istraživanja. Oko 10% od ekspozicije, 1,7 μg Cd po cigareti, biva inhalirano prilikom pušenja. Pasivno pušenje također može biti izvor ekspozicije Cd za nepušače.

1.2.2. Toksikokinetika

Absorpcija Cd zavisi od puta unosa. Približno 25, 1-10 i < 1% od unesene doze biva absorbovano nakon inhalacione, oralne ili dermalne ekspozicije. Različiti faktori utiču na stepen absorpcije. Aerosoli Cd sa malim promjerom čestica, koji su prisutni u duhanskom dimu, postižu bolju absorpciju u odnosu na čestice većeg promjera. Na absorpciju iz gastrointestinalnog trakta (GIT) utiče pak rezerva željeza (Fe) u tijelu, tako da individue koje imaju nizak sadržaj Fe absorbuju više Cd (ATSDR, 2012). Bez obzira na put unosa, Cd se dobro distribuira u tijelu i najveće koncentracije postiže u jetri i bubrezima. Previsoka koncentracija može nadmašiti sposobnost jetre i bubrega da Cd prevode u neškodljivu formu. Kadmijum se u plazmi djelimično vezuje za proteine velike molekulske mase, vjerovatno albumine, a može se vezati i za strukture manje molekulske mase poput metalotioneina (MT) (Nordberg, 2009). Prolazak Cd kroz placentu je nizak i iznosi 0,02% (EHC, 1992). Kadmijum se sporo eliminiše iz organizma, približno jednako putem urina i fecesa. Normalan nivo u krvi za opštu populaciju nakon ekspozicije ≥ 1 godine iznosi 0,315 $\mu\text{g}/\text{l}$, dok je nivo u urinu za period ≥ 6 godina 0,193 $\mu\text{g}/\text{g}$ kreatinina (0,185 $\mu\text{g}/\text{l}$). Krv i urin su najčešće korišteni biomarkeri ekspozicije Cd (ATSDR, 2012).

Kod pušača nakon inhalacije Cd dospijeva u alveole, a potom u krv. Još uvijek nije poznat mehanizam putem kojeg Cd dospijeva u cirkulaciju. Pretpostavka je da prolazi kao katjon ili vezan za glutation ili cistein, odnosno, kao neesencijalni metal koristeći transportere i kanale namijenjene transportu drugih jona i biomolekula. Iz cirkulacije Cd dospijeva u jetru gdje u obliku kompleksa sa lako topivim molekulama koje sadrže tiol (glutation i cistein) prolazi ćelijske membrane (Bridges i Zalups, 2005). Kada dospije u hepatocite Cd se veže za proteine sa visokim udjelom cisteina- MT ili GSH sa slobodnom tiol (-SH) grupom. Nastali kompleks Cd-GS₂ se izlučuje putem žuči (Martelli i sar., 2006).

1.2.3. Toksični efekti

Ciljni organi toksičnosti nakon akutne ekspozicije su pluća, jetra, bubrezi i testisi, dok usljed hronične ekspozicije nastaje imunotoksičnost, osteotoksičnost i tumori.

Najznačajniji toksični efekti koji se javljaju nakon akutne ekspozicije Cd inhalacionim putem uključuju intersticijalni pneumonitis, difuzni alveolitis, hemoragiju i pojavu edema.

Hronična ekspozicija od respiratornih simptoma uzrokuje kašalj, otežano disanje, emfizem i narušenu funkciju pluća. Ekspozicija inhalacionim putem dovodi i do oštećenja bubrega. Kadmijum koji je u krvi vezan za –SH grupe MT biva filtriran u glomerulima, a potom reabsorbovan u proksimalnim tubulima. Unutar tubularnih ćelija lizozomi degradiraju MT i oslobađa se Cd, koji u slobodnoj formi izaziva tubularno oštećenje (Chen i sar., 2006).

Ekspozicija oralnim putem rezultira toksičnim efektima na krv, jetru, bubrege, želudac, tanko crijevo, testise i nervni sistem.

Absorbicija i distribucija Cd do ciljnih mjesta zavisi i od oblika u kojem se Cd unosi i puta unosa. Jetra je jedan od najznačajnijih ciljnih organa toksičnosti i nakon akutne i hronične ekspozicije (Koyu i sar., 2006; Renugadevi i Prabu, 2010). Kadmijum ima visok afinitet vezivanja za –SH grupe proteina, peptida i drugih komponenti, što i uslovljava akumulaciju Cd u tkivima i depoziciju u ciljnim mjestima. Vezivanje za MT omogućava Cd dug biološki poluživot (Shaikh i sar., 1999). Prethodna istraživanja su pokazala da slobodni joni Cd inaktiviraju metal-ovisne enzime, aktiviraju kalmodulin i/ili oštećuju ćelijske membrane aktiviranjem ROS. Na metal-ovisne enzime, kao što su i enzimi AOS, djeluju tako što stupaju u kompeticiju sa esencijalnim metalima iz aktivnog centra enzima (Cu, Fe, Zn). Tako izmijenjeni enzimi gube svoju funkciju, što je ujedno i osnova za razvoj OS. Kao posljedica nastanka OS javlja se oksidativno oštećenje ciljnih molekula- lipida, DNA i proteina, pražnjenje rezervi antioksidanata, gubitak energije, i ćelijska smrt (apoptoza ili nekroza) (Djukic i sar., 2012). Jedino redukciono stanje u kojem egzistira u biološkim uslovima jeste Cd(II), i kao slaba *Lewis*-ova kiselina spaja se sa lako oksidirajućim ligandima kao što su ligandi koji sadrže sumpor (S). Hemijske osobine Cd omogućavaju njegovu kompeticiju sa bioelementima u mnogim proteinima i enzimima u kojima su koordinativno vezani sa S bogatim segmentima (Martelli i sar., 2006). Kadmijum takođe uzrokuje pražnjenje ćelijskih rezervi GSH (vezivanje za –SH grupe glutationa), kada usljed inaktivacije tiola narušava redoks balans u ćeliji. Prevagnuće nivoa generisanih ROS u odnosu na kapacitet AOS dovodi do oštećenja jetre (Arroyo i sar., 2012).

Veliki broj studija imalo je za cilj ispitivanje toksičnosti Cd i OS kao mehanizma njegovog toksičnog djelovanja, na molekularnom i ćelijskom nivou (He i sar., 2008; Ogasawara i sar., 2014). Međutim, ni mehanizmi toksičnosti Cd ni fiziološki odgovori uključeni u detoksifikaciju Cd nakon što dospije u ćelije, nisu još uvijek u potpunosti razjašnjeni i uveliko zavise od doze i vremena ekspozicije.

1.3. ETANOL

1.3.1. Toksikološki značaj

Prema izvještaju Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization-WHO*) iz 2014. godine o globalnom statusu po pitanju alkohola i zdravlja, zloupotreba alkohola uzrokuje približno 3,3 miliona smrtnih slučajeva u svijetu svake godine (5,9% od svih smrtnih slučajeva). Istraživanja su dovela u vezu konzumiranje alkohola sa više od 200 bolesnih stanja (WHO, 2014). Upotreba etanola je široko zastupljena u industriji, higijenskim proizvodima u domaćinstvu i u alkoholnim pićima.

Alkohol je psihoaktivna supstanca, čiji štetni efekti zavise od zapremine unosa, učestalosti konzumiranja, kao i od kvaliteta sirovine. Štetni efekti alkohola se svrstavaju među pet najvećih faktora rizika za nastanak bolesti, invaliditeta ili smrtnog ishoda.

Konzumiranje alkohola uzrokuje:

- toksične efekte na organe i tkiva;
- intoksikaciju koja se odlikuje poremećajem u koordinaciji pokreta, svijesti, spoznaje, percepcije, kao i poremećaj u ponašanju;
- zavisnost.

Novi podaci bilježe da osobe iznad 15 godina starosti u prosjeku konzumiraju 6,2 l čistog alkohola godišnje, odnosno 13,5 g čistog alkohola dnevno. Bolesti jetre (naročito ciroza jetre) najviše doprinosi konzumiranje alkohola (WHO, 2014).

1.3.2. Farmakokinetika

Različiti aleli gena za enzime alkoholnu dehidrogenazu (ADH) i aldehidnu dehidrogenazu (ALDH) su u vezi sa povećanom/umanjenom sklonosti prema zloupotrebi alkohola i zavisnosti. Razlike u stepenu absorpcije, distribucije i eliminacije alkohola uveliko doprinose kliničkoj slici usljed hronične ekspozicije.

Etanol sa dva C atoma i alkoholnom hidroksilnom grupom lako prelazi iz tjelesnih tečnosti u ćelije. Nakon oralne ekspozicije i absorpcije u tankom crijevu, etanol putem portne cirkulacije dopijeva u jetru gdje se najvećim dijelom metabolizira. Oksidacija etanola u hepatocitima odvija se putem tri enzimska sistema:

- a) oksidacija etanola do acetaldehida u citosolu uz dejstvo citosolnog enzima ADH koji zahtjeva prisustvo nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+), a potom oksidacija

acetaldehida, koji dopijeva u mitohondrije, do acetata uz dejstvo mitohondrijalnog enzima ALDH;

b) oksidacija etanola putem mikrozomalnog etanol oksidirajućeg sistema (MeOS) uz dejstvo enzima CYP2E1 koji zahtjeva prisustvo nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH); Ovaj put oksidacije etanola je aktivan kod hronične ekspozicije;

c) neoksidirajući put metaboliziranja uz dejstvo sintaze etil estara masnih kiselina, pri čemu nastaju etil estri masnih kiselina (engl. *fatty acid ethyl ester*-FAEE).

Oksidacija etanola se odvija i u peroksizomima dejstvom enzima CAT, ali zahtjeva prisustvo H₂O₂ što implicira da ovaj put nije značajan u fiziološkim uslovima. Nastali acetat se prevodi u acetyl-CoA uz dejstvo ATP-ovisne acetyl-CoA sintetaze (AceCS).

Etanol se eliminiše, izuzev metaboliziranjem, putem urina i izdisajem (ekshalacija). Nivo etanola u krvi prosječno opada za 20 mg/dl/h kod odrasle osobe, što bi značilo da je za eliminaciju koncentracije od 120 mg/dl potrebno 6-8h (Casarett i sar., 2012).

1.3.3. Toksični efekti

Alkoholne bolesti jetre (engl. *alcoholic liver disease*- ALD) uključuju širok spektar stanja, od steatoze, alkoholnog hepatitisa, fibroze, ciroze do hepatocelularnog karcinoma. Ranija istraživanja patogeneze ALD bila su fokusirana na dovodenje u vezu metabolizma etanola sa OS, pražnjenjem rezervi GSH, abnormalnim metabolizmom metionina, malnutricijom i produkcijom endotoksina koji aktiviraju Kupferove ćelije, kao mehanizmima njegove toksičnosti (Gao i Bataller, 2011). U hepatocitima, oksidacijom etanola nastaje reaktivni acetaldehid u citosolu dejstvom ADH, u mikrozomima dejstvom CYP2E1 i u peroksizomima dejstvom CAT. Metabolizam etanola uzrokuje produkciju ROS i lipidnu peroksidaciju (LPO), pražnjenje rezervi GSH u mitohondrijama i pražnjenje sadržaja S-adenozilmetionina. Acetaldehid je izrazito toksičan za hepatocyte budući da formira različite adukte sa proteinima i DNA, koji podstiču pražnjenje rezervi GSH, LPO i oštećenje mitohondrija. Acetat, nastao daljim metaboliziranjem acetaldehida, iz jetre dopijeva u cirkulaciju gdje se metabolizira do CO₂. Iako je potvrđeno da metabolizam etanola dovodi do produkcije ROS i LPO pri akutnoj i hroničnoj ekspoziciji, još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi kojima etanol uzrokuje oštećenje ćelija, odnosno u kojoj mjeri se to može pripisati nastanku OS. Dokazano je i da Fe kroz Fentonovu reakciju (reakcija tranzicijskih metala u njihovom redukovanom stanju sa H₂O₂) i produkciju hidroksil radikala (\cdot OH), može doprinijeti razvoju OS i još većem oštećenju jetre (Lu i

Cederbaum, 2008; Filipic, 2012; Nair i sar., 2013). Budući da su alkoholičari uglavnom i pušači, potrebno je razjasniti uticaj alkohola i na status drugih bioelemenata, kao i Cd.

1.4. DISULFIRAM

1.4.1. Primjena

Disulfiram (DSF) [bis(dietiltiokarbamoil) disulfid] (Antabuse®) je prvi lijek odobren od strane Američke uprave za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration-FDA*) za primjenu u tretmanu odvikavanja od ovisnosti alkohola, još davne 1951. godine. Averzivna terapija podrazumijeva akutnu toksičnu fizičku reakciju organizma ukoliko individua konzumira alkohol za vrijeme trajanja terapije. Efekti DSF su prvi put primjećeni 1930-ih godina kod radnika u industriji vulkaniziranja gume, koji su bili izloženi tetraetiltiuram disulfidu i osjećali se loše ukoliko su konzumirali alkoholna pića. Tek 1950-tih godina nakon zabilježenih smrtnih slučajeva usljed primjene visokih doza DSF koje su izazivale averziju prema alkoholu, došlo se do saznanja da bi tretman DSF trebao podsticati abstinenciju kod pacijenata i u tu svrhu su smanjene doze, te isključena primjena kod pacijenata sa liječenim infarktom miokarda ili cirozom jetre.

Disulfiram blokira oksidaciju acetaldehida do acetata, inhibirajući enzim ALDH u jetri i mozgu, što za posljedicu ima porast koncentracije acetaldehida u krvi nakon ekspozicije alkoholu. Disulfiram-alkohol reakcija može povećati koncentraciju acetaldehida u krvi čak 5-10 puta u odnosu na odsustvo DSF, ali nema uticaj na brzinu eliminacije alkohola. Navedena reakcija započinje 10 do 30 minuta nakon ingestije alkohola. Očekivani štetni efekti variraju od umjerenih (pojačano znojenje, crvenilo najviše u području prsa i lica i toplina, hiperventilacija i dispneja, zamućen vid, žeđ, mučnina i povraćanje, palpitacije i bol u prsima, hipotenzija, tahikardija, vrtoglavica, sinkopa, konfuznost i opšta slabost) do ozbiljnih (depresija disanja, aritmija, infarkt miokarda, akutni kongestivni zastoj srca, gubitak svijesti i smrt) (TIP, 2009).

Mnogobrojna istraživanja i kliničke studije su potvrdile sigurnu i efikasnu primjenu DSF (Brewer i sar., 2000; Schuckit, 2006; Martin i sar., 2005). U datim studijama se navodi značaj supervizije pacijenata koji su na terapiji DSF. Neki eksperti pak smatraju da DSF ne bi trebao biti terapijski izbor, naročito ne u domenu primarne zdravstvene zaštite, iz bojazni od mogućih ozbiljnih neželjenih efekata usljed DSF-alkohol reakcije (Williams, 2005).

1.4.2. Farmakokinetika

Nakon ingestije, absorbira se oko 80-95% unesene doze DSF i veoma brzo distribuira do tkiva i organa. Neabsorbirana frakcija biva izlučena. Disulfiram se ireverzibilno veže za ALDH, te je potrebno i do dvije sedmice da se sintetizira *de novo* dovoljno nevezanog enzima koji može da adekvatno metabolizira alkohol (TIP, 2009). Metabolizam DSF *in vivo* započinje njegovom redukcijom do *N,N*-dietilditiokarbamata (DDC), koji potom metilacijom prelazi u *S*-metil *N,N*-dietilditiokarbamat (MeDDC). Sljedeći korak je oksidacija MeDDC primarno do intermedijernog metabolita MeDDC sulfina, koji konačno biva konvertovan u *S*-metil *N,N*-dietiltiokarbamat (MeDTC) sulfoksid, koji je zapravo aktivni metabolit DSF *in vivo*, i u manjoj mjeri do MeDDC sulfoksida.

Oksidacija MeDDC u humanim jetrenim mikrozomima je katalizovana uz nekoliko izoformi enzima CYP450 (90%) i flavin monooksigenazu 3 (FMO 3) (10%) koja oksidira MeDDC do MeDDC sulfina. Krajnji produkti metabolizma DSF su ugljen disulfid i dietilamin. Metabolizam DSF podliježe enterohepatičkom kruženju (Pike i sar., 2001). Oksidacija MeDDC do MeDDC sulfina se u određenoj mjeri odvija i u renalnim mikrozomima. Budući da jetra sadrži 14 puta više mikrozomalnih proteina, jasno je da jetra u odnosu na bubrege ima veći metabolički kapacitet za metabolizam do MeDDC sulfina kod zdravih individua. Doprinos metabolizma u bubrezima može biti znatno veći kod individua kod kojih je hepatski metabolizam narušen. Produkcija aktivnog metabolita u tkivima može imati farmakološke ili toksikološke implikacije.

Do 80% DSF se metabolizira u jetri i biva izlučeno putem urina, a do 20% od oralne doze se izlučuje u nepromijenjenom obliku putem fecesa. Disulfiram je liposolubiln i biološki poluživot se kreće između 60 i 120 sati, dok DDC ima biološki poluživot 13,9 sati i ugljen disulfid 8,9 sati. Oba metabolita se najčešće izlučuju putem urina nakon glukuronidacije u jetri. Usljed hronične ekspozicije DSF, ugljen disulfid može biti izlučen i putem pluća, što objašnjava pojavu metalnog okusa i halitoze (Barth i Malcolm, 2010).

1.4.3. Toksični efekti

Mogući su navedeni neželjeni efekti nakon primjene DSF: erupcije akni na koži, alergijski dermatitis, slabost, glavobolja, impotencija, metalni ili okus bijelog luka u ustima. Hepatotoksičnost treba biti praćena kod pacijenata na terapiji DSF. Disulfiram može prouzrokovati hepatitis, ali je rizik za njegov nastanak nizak. Procijenjeno je da se javlja kod 1 od 30 000 pacijenata u godini dana (Chick, 1999). Inicijalna doza koja se primjenjuje u

terapiji iznosi 250 mg/dan u jednoj dozi administriranoj ujutro ili uveče tokom 1-2 sedmice. Doze održavanja se kreću u opsegu od 125 – 500 mg/dan, odnosno srednja doza održavanja iznosi 250 mg/dan. Maksimalna dozvoljena doza iznosi 500 mg/dan. Tokom terapije, svakodnevno se prati funkcija jetre. Nasuprot oštećenju jetre usljed ekspozicije alkoholu, koje se manifestuje visokim odnosom vrijednosti enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT), primjena DSF obično dovodi do jednako povišenih vrijednosti AST i ALT (Bjornsson i sar., 2006).

1.4.4. Prooksidativni i antioksidativni efekti

Iako je redukcija DSF do DDC brza i potpuna, jedna porcija DDC-a može biti intracelularno reoksidirana u DSF. Stoga se pretpostavlja da i DSF može djelovati kao inhibitor ALDH *in vivo*. Disulfiram reaguje sa –SH grupama različitih proteina pri čemu nastaju intermolekularni disulfidi, što je i pretpostavljeni mehanizam inhibicije ALDH, odnosno stvaranje stabilnog intermolekularnog disulfida DSF i tiola u aktivnom centru enzima (Shen i sar., 2000).

Disulfiram i njegovi aktivni metaboliti imaju više ciljnih mjesta djelovanja. *N,N*-dietilditiokarbamat je potentni metal-helirajući agens u čemu se ogleda njegov prooksidativni potencijal (Djukic i sar., 1998). Time je moguće objasniti njegove efekte na Cu-ovisne enzime, kao što je i enzim AOS citosolna Cu/Zn superoksid dismutaza (Cu/Zn SOD), ili citohrom oksidaza, čime se objašnjava povećana koncentracija lijekova i ksenobiotika u plazmi, koji se metaboliziraju putem CYP450, naročito CYP2E1, kod pacijenata na terapiji DSF. Odvojeni tranzicijski metali (Cu, Fe) usljed nukleofilnog karaktera DDC-a, odnosno njegovih helirajućih osobina ili kompeticije Cd za date metale u aktivnim centrima enzima AOS, mogu sudjelovati u Fentonovoj reakciji i doprinosti prekomjernoj produkciji ROS i razvoju OS (Barth i Malcolm, 2010). *N,N*-dietilditiokarbamat potencijalno može vezati i Cd, iako nastali kompleks nije stabilan i nema veliki toksikološki značaj (Jurczuk, 2004). Budući da DSF reaguje sa –SH grupama, potencijalno i sa –SH grupom GSH, važnog endogenog antioksidansa, te može da veže Cd koji takođe sa GSH stvara kompleks, istraživanje će pokazati međusobne interferencije, odnosno da li vezivanje DSF i Cd može spriječiti smanjenje rezervi GSH i omogućiti mu da obavlja svoju antioksidativnu ulogu.

1.5. GLUTATION

1.5.1. Značaj u očuvanju ćelijske homeostaze

Redoks reakcije su važan segment u ćelijskom metabolizmu i očuvanju homeostaze. U datim reakcijama kao sporedni produkti nastaju molekuli elektrofilnog karaktera koji mogu uzrokovati oštećenje ćelijskih makromolekula. Za očuvanje redoks homeostaze i prevenciju oštećenja važnih makromolekula, ćelije proizvode različite endogene antioksidanse proteinske prirode, od kojih najveći značaj ima GSH. Glutation je, u svom redukovanom obliku, najzastupljeniji ćelijski tiol, čija se koncentracija kreće od 1-10 mM u različitim tipovima ćelija. Dati tripeptid, koji sadrži glutamat, cistein i glicin je važan ćelijski redoks pufer i pruža zaštitu ćelijama od prekomjerno generisanih egzogenih i endogenih elektrofila (Dalton i sar., 2004). Redukovani glutacion se zapravo smatra značajnim zaštitnim endogenim agensom koji štiti ćeliju od proliferacije ili apoptoze (Watson i sar., 2003).

Smatra se da GSH predstavlja prvu liniju odbrane kod ekspozicije različitim formama jona toksičnih/teških metala. Zatim, GSH služi kao kofaktor enzima GPx, koji je zadužen za metaboliziranje H_2O_2 u H_2O i lipidnih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH) (Li i sar., 2000). Nadalje, u reakcijama kataliziranim enzimom glutation-S-transferazom (GST), GSH biva konjugiran sa različitim endogenim i egzogenim elektrofilima i omogućava njihovu eliminaciju. Postoje naznake i da neke oksidirane forme glutaciona djeluju kao sekundarni glasnici i da GSH djeluje kao neurotransmiter (Dalton i sar., 2004). Navedeno svjedoči o značaju glutaciona.

1.5.2. Sinteza i degradacija glutaciona

Glutation se sintetizira putem dvije sukcesivne reakcije. Prva reakcija, katalizirana glutamat-cistein ligazom (GCL), uključuje vezanje glutamata i cisteina, pri čemu nastaje γ -glutamilcistein (γ -GC). U drugoj reakciji kataliziranoj sa GSH sintazom (GSS), γ -GC se veže sa glicinom. Svaka reakcija zahtjeva utrošak jedne molekule ATP-a. Nastanak γ -GC uz dejstvo GCL se smatra limitirajućim korakom u sintezi GSH, budući da je prisutan u niskim koncentracijama u ćeliji kada je GSS prisutan.

Između γ -karbona bočnog lanca glutamata i amino grupe cisteina se stvara jedinstvena amidna veza koju peptidaze ne mogu razgraditi unutar ćelija. Glutation mora biti transportovan kroz plazma membranu, gdje biva metaboliziran dejstvom γ -glutamil transferaze (GGT), koja dakle katalizira cijepanje γ -glutamil amidne veze između glutamata

i cisteina uz utrošak ATP-a, pri čemu se glutamilni ostatak prenosi na drugu aminokiselinu (AK). U ovoj reakciji ostaje i cisteinilglicin, čiju standardnu α -amidnu vezu cijepaju eksterne dipeptidaze oslobađajući cistein i glicin, koje dalje koriste ćelije (Dalton i sar., 2004).

1.5.3. Oksidacija proteinskih tiola

Oksidansi nastaju i u fiziološkim uslovima, odnosno zdravim tkivima, i mogu služiti kao signalne molekule. Transdukcija signala u biološki odgovor može biti posredovana oksidacijom cisteinskih rezidua proteina. Tiolna (-SH) grupa, u bočnom lancu AK cisteina, je naročito osjetljiva na redoks reakcije, pri čemu tioli stupaju u interakcije sa različitim oksidansima sa kojima formiraju uglavnom reverzibilne kovalentne modifikacije, uključujući i formiranje disulfidnih veza. Ne reaguju svi proteinski tioli sa oksidansima, što je uslovljeno njihovim okruženjem i koncentracijama u kojima su prisutni u ćelijama. Pojedini tioli pak joniziraju u tiolatne anjone, pri čemu pojačavaju aktivnost mnogih oksidanasa. Reaktivni tioli često formiraju prelazne intermedijerne forme u ciklusima mnogih enzima. Trodimenzionalne strukture proteina otežavaju pristup oksidansima tiolnoj grupi, čime utiču na njenu reaktivnost, u poređenju sa primarnim AK sekvencama gdje je olakšan pristup.

Gubitak proteinskih tiola ne javlja se uvijek usljed formiranja disulfidnih veza. Tako npr. H_2O_2 u ćelijama može dovesti do gubitka proteinskih tiola usljed formiranja disulfida ili direktno oksidirati tiol u različita stanja (sulfen, sulfin, sulfon). Isti scenario je moguć sa tiolnom grupom bočnog lanca cisteina u GSH, odnosno, formiranje ne samo glutathion disulfida (GSSG) usljed oksidacije GSH, nego i drugih produkata npr. sulfonata (Eaton,2006).

1.5.4. Opravdanost izbora i optimizacija metode za paralelno određivanje redukovanog i oksidiranog glutathiona u animalnim tkivima

Glutathionski ciklus predstavlja osnovu antioksidativnog odgovora organizma na indukovani OS, bilo endogenim ili egzogenim faktorima. Pri fiziološkim uslovima dominantno je zastupljena redukovana forma glutathiona (GSH) (~ 90 % od ukupnog glutathiona). Iscrpljivanje rezervi GSH u ćelijama se dešava usljed nastanka OS, pri čemu se GSH oksidira u disulfidnu formu (GSSG). Reakcije konjugacije i/ili heliranja ne rezultiraju produkcijom GSSG-a, nego drugim oksidiranim formama. Povišen nivo odnosa GSSG/GSH

se smatra osjetljivim indikatorom/markerom u bolestima/trovanjima povezanim sa OS. Stoga je i paralelno određivanje obje forme glutationa od izuzetnog značaja za pouzdanu interpretaciju smanjenja sadržaja GSH.

Različite metode su dostupne za određivanje GSH i GSSG u biološkim uzorcima. Veliki broj datih metoda su spektrofotometrijske i pružaju mogućnost određivanja sadržaja ukupnog glutationa (tGSH) i GSH, dok se sadržaj GSSG izračunava iz njihove razlike. Nekoliko predloženih jednačina za izračunavanje sadržaja tGSH često vode do pogrešne procjene nivoa GSSG (Djukic i sar., 2012). U ranijem periodu razvijene tehnike, uključujući enzimске (Tietze, 1969), fluorimetrijske (Cohn i Lyle, 1966) i kolorimetrijske (Raggi i sar., 1991), rezultirale su neadekvatnim limitima detekcije i nedovoljnom specifičnosti. Elektrohemijske metode, koje su uspjele izbjeći derivatizacioni proces, su također korištene (Rodriguez-Ariza i sar., 1994). Glavni nedostatak ovih metoda je gubitak osjetljivosti elektroda nakon nekoliko stotina injektovanja. Trenutno dostupne procedure za određivanje sadržaja GSH i GSSG tehnikom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC), podrazumijevaju zahtjevnu proceduru pripreme bioloških uzoraka, uključujući postupak derivatizacije (Giustarini i sar., 2003). Prilikom derivatizacije, naročito postupka alkalizacije uzoraka, dešava se često oksidacija GSH, što rezultira lažno povišenim izmjerenim vrijednostima GSSG-a, te se smatra značajnim nedostatkom navedenih procedura (Cereser i sar., 2001, Rossi i sar., 2003). Iako je tečna hromatografija-tandem masena spektrometrija (LC-MS/MS) metoda izbora za paralelno određivanje GSH i GSSG (zahvaljujući dobroj specifičnosti i niskim limitima detekcije i kvantifikacije), aparatura za navedenu tehniku je još uvijek nedostupna većem broju laboratorija (Moore i sar., 2013; Squellerio i sar., 2012; Blahova i sar., 2014). Budući da su i HPLC aparature sa fluorescentnim detektorom takođe uglavnom nedostupne laboratorijama, a fluorescencija zahtjeva i derivatizacioni proces, UV detekcija se smatra pogodnom za određivanje u rutinskim analizama.

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Pušači su izloženi Cd s obzirom da iz tla Cd dospijeva u listove duhana, čime dovodi do inhalacione ekspozicije 1,7 μg Cd po cigareti tokom pušenja. Takođe, prema izvještaju WHO iz 2014. godine zloupotreba alkohola uzrokuje približno 3,3 miliona smrtnih slučajeva u svijetu svake godine. Zatim, upotreba DSF, lijeka za averzivnu terapiju alkoholičara, uveliko može da utiče na redoks status kao i status biolemenata u organizmu, s obzirom na prisustvo -SH grupe u hemijskoj strukturi metabolita ovog lijeka.

Uzimajući u obzir toksikološki značaj ova dva agensa i dnevnu izloženost istima od strane alkoholičara-pušača i averzivnu terapiju alkoholičara DSF, cilj ove studije bio je da postavljena animalna studija imitira ove uslove ekspozicije testiranim agensima i da se dole navedene **HIPOTEZE** u izvjesnoj mjeri testiraju:

- individualna i kombinovana ekspozicija Cd i etanolu usljed pušenja i konzumiranja alkoholnih pića od strane iste individue rezultira hepatotoksičnim efektom;
- pored za ove agense specifičnih mehanizama toksičnosti, jedan zajednički mehanizam oštećenja je OS;
- depozicija Cd, kao i metabolizam etanola se primarno odvija u jetri;
- DSF/metaboliti DSF su agensi koji imaju potencijal heliranja metala, kao i vjerovatni antioksidativni potencijal;
- uporedna studija redoks, funkcionalnog i histopatološkog statusa u jetri *Wistar* pacova otvara prostor da se rasvijetle mehanizmi odgovora glutationskog ciklusa [aktivnost antioksidativnih enzima glutationskog ciklusa i metabolički obrt glutaciona - ključnog endogenog antioksidanta tj. određivanja redukovane i oksidovane forme glutaciona (GSH i GSSG)] na hepatotoksičnost testiranih agenasa posredovanu OS;
- spektrofotometrijsko mjerenje GSSG i GSH, kao i korišćenje komercijalnih kitova za ova merenja (bazirana na istim spektrofotometrijskim principima), nisu dovoljno pouzdana analitička alatka za distinkciju oksidovane i redukovane forme glutaciona, što je neophodno razlučiti u evaluaciji redoks odgovora.

Postavili smo ciljeve ove doktorske disertacije koji se odnose na izučavanje molekularnih mehanizama interferencije tiolnih (-SH) grupa metabolita DSF, metabolita lijeka koji se primjenjuje u averzivnoj terapiji alkoholizma (koji su u osnovi ditiokarbamatni agensi), na odgovor glutationskog ciklusa (u sklopu kompleksnog antioksidativnog sistema)

na OS posredovani hepatotoksičnosti efekat etanola i Cd kod pacova, kao i na analitiku GSSG i GSH.

CILJEVI ove doktorske disertacije su:

- postavka animalne studije na pacovima koja imitira uslove humane ekspozicije testiranim agensima u meri u kojoj je to tehnički izvodljivo;

- procjena funkcionalnog statusa jetre tretiranih pacova (mjerjenje funkcionalnih hepatičkih enzima i histopatologija) tokom i nakon individualne i koekspozicije testiranim agensima;

- izučavanje statusa esencijalnih bioelemenata i toksičnog Cd pri individualnoj primjeni DSF i u kombinaciji sa Cd pri subakutnoj i/ili subhroničnoj izloženosti pacova etanolu i/ili Cd;

- izučavanje interferencije –SH grupe DDC-a sa glutationskim ciklusom u sklopu antioksidativnog odgovora na OS posredovanu hepatotoksičnost Cd i/ili etanola u jetri pacova, pri subakutnoj i/ili subhroničnoj ekspoziciji;

- postavka i optimizacija izokratne HPLC/UV metode za mjerenje GSH i GSSG uz pojednostavljenu pripremu biološkog uzorka, bez derivatizacionog postupka (uglavnom je prisutan u dostupnim/publikovanim HPLC metodama za merenje glutaciona).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Hemikalije

Disulfiram (Esperal® tablete 500 mg, 20 tableta u pakovanju, proizvođač SANOFI-AVENTIS ZRT, Budimpešta, Mađarska), kadmijum-hlorid ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, čistoće 99,99%) (Merck, Darmstadt, Njemačka), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, čistoće 96%) (Sigma-Aldrich, Švicarska) i natrijum-pentobarbital Vetanarcol (Werfft-Chemie, Beč, Austrija) su nabavljeni iz komercijalnih izvora.

3.2. Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova, soja *Wistar* (*Rattus norvegicus*), tjelesne mase 220-250 g, nabavljeni sa farme za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu. Životinje su čuvane u plastičnim kavezima sa žičanom rešetkom, u klimatski kontrolisanim uslovima (temperatura od $23 \pm 2^\circ\text{C}$, relativna vlažnost vazduha od $55 \pm 3\%$ i svjetlost/mrak ciklus od 13/11h). Hrana i voda su bili na raspolaganju *ad libitum*. Svi eksperimenti su provedeni nakon perioda adaptacije na laboratorijske uslove u trajanju od dvije sedmice i sve planirane procedure su izvođene u periodu od 9 – 13 časova. Sa eksperimentalnim životinjama se postupalo u skladu sa Zakonom o zaštiti i dobrobiti životinja („Službeni glasnik RS“, broj 41/09). Eksperiment je odobren od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (br: 323-07-04924/2015-05/3).

3.3. Eksperimentalni protokol

Priprema reagenasa izvršena je u skladu sa odabranim dozama ispitivanih supstanci:

- DSF: doza održavanja za čovjeka je 125 mg/70 kg t.m./dan, što odgovara dozi od 178,5 mg/kg t.m. pacova (44,6 mg/250 g t.m. pacova); 1 tableta Esperala sadrži 500 mg aktivne komponente – DSF; dvije tablete su sprasene i rastvorene sa 11,21 ml maslinovog ulja (44,6 mg/0,5 ml je jedna administrirana doza za pacova);
- CdCl_2 : u skladu sa literaturom, mužjacima *Wistar* pacova je *i.p.* administrirano 0,2 ml rastvora 250 mg CdCl_2 /200 ml (tj. 0,25 mg Cd/250 g t.m. pacova), što odgovara dozi od 1 mg CdCl_2 /kg/dan, tokom 21 dana (subakutna toksična doza). Naime, Nigam i sar. su primjenjivali *i.p.* 1 mg CdCl_2 /kg/5 dana nedeljno/3 meseca kod albino pacova; Shaikh i sar. su primjenjivali subkutano 5 pmol CdCl_2 /kg /dan (što odgovara dozi od 0,91 mg

CdCl₂/kg/dan) tokom 22 nedelje, kod Sprague-Dawley pacova; a Nagamine i sar. su davali *i.p.* 3 mg CdCl₂/kg/3 puta nedeljno/27 nedelja miševima (Nigam i sar., 1999; Shaikh i sar., 1999; Nagamine i sr., 2007). Dospijeće Cd u krvotok *i.p.*, kao i inhalacijom je gotovo jednako, prema utvrđenom koeficijentu korelacije (r: 0.78 - 0.9) (Honma i sar., 1998). Odabrani termini uzorkovanja (1, 3, 10 i 21 dana) odgovaraju za procjenu postignutih toksičnih efekata (Thorne i sar., 2001).

- etanol: 96% alkohol smo razblažili (4,8 puta) kako bismo dobili 20% (10 ml 96% dopunimo do 48 ml sa destilovanom vodom); administrirano je 3 ml 20% alkohola u dvije podijeljene doze (1,5 g 20% alkohola ujutro i poslijepodne).

Životinje su slučajnim odabirom podijeljene na tri kontrolne grupe C₁₋₄₂ (tri podgrupe C₁, C₁₋₂₁ i C₁₋₄₂), OIO₁₋₂₁ i OIO₂₂₋₄₂ (n = 6), kojima su davani voda, odnosno maslinovo ulje kao rastvarač za DSF i 7 eksperimentalnih grupa (n = 24), od kojih je svaka grupa podijeljena u 4 podgrupe (n = 6) prema trajanju izloženosti ispitivanim supstancama/kombinaciji supstanci, sa izuzetkom grupe izložene Cd koja je podijeljena u 6 podgrupa. Raspored doznog režima supstanci prema grupama životinja je sljedeći:

- grupa životinja koja je primala *i.p.* 1 mg vodenog rastvora CdCl₂/kg t.m./dan u jednoj dozi tokom 1, 3, 10, 21, 31 i 42 dana (subakutna/subhronična ekspozicija) (grupe su označene kao Cd₁, Cd₁₋₃, Cd₁₋₁₀, Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₃₁ i Cd₁₋₄₂);
- grupa životinja koja je primala *per os* putem oralne sonde 3 ml 20% rastvora etanola/dan u dvije podijeljene doze ujutro i poslijepodne tokom 1, 3, 10 i 21 dan (subakutna ekspozicija) (grupe su označene kao A₁, A₁₋₃, A₁₋₁₀ i A₁₋₂₁);
- grupa životinja koja je primala *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan u jednoj dozi tokom 1, 3, 10 i 21 dan (subakutna ekspozicija) (grupe su označene kao DSF₁, DSF₁₋₃, DSF₁₋₁₀ i DSF₁₋₂₁);
- grupa životinja koja je primala *i.p.* 1 mg vodenog rastvora CdCl₂/kg t.m./dan u jednoj dozi i *per os* putem oralne sonde 3 ml 20% rastvora etanola/dan u dvije podijeljene doze ujutro i poslijepodne tokom 1, 3, 10 i 21 dan (subakutna kombinovana ekspozicija) (grupe su označene kao A₁/Cd₁, A₁₋₃/Cd₁₋₃, A₁₋₁₀/Cd₁₋₁₀ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁);
- grupa životinja koja je primala *per os* putem oralne sonde 3 ml 20% rastvora etanola/dan u dvije podijeljene doze ujutro i poslijepodne tokom 21 dana a potom je prekinut unos etanola i uveden DSF u tretman *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan u jednoj dozi do 22. (ekspozicija 1 dan), 24. (ekspozicija 3 dana), 31. (ekspozicija 10 dana) i 42. (ekspozicija

21 dan) dana od početka tretmana (subhronična kombinovana ekspozicija) (grupe su označene kao A₁₋₂₁/DSF₂₂, A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₂₄, A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₃₁ i A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂);

- grupa životinja koja je primala *i.p.* 1 mg vodenog rastvora CdCl₂/kg t.m./dan u jednoj dozi tokom 1, 3, 10 i 21 dan, a potom je nastavljeno sa administriranjem Cd i uveden DSF u tretman *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan u jednoj dozi do 22. (ekspozicija 1 dan), 24. (ekspozicija 3 dana), 31. (ekspozicija 10 dana) i 42. dana (ekspozicija 21 dan) od početka tretmana (subhronična kombinovana ekspozicija) (grupe su označene kao Cd₁₋₂₂/DSF₂₂, Cd₁₋₂₄/DSF₂₂₋₂₄, Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ i Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂); i
- grupa životinja koja je primala *i.p.* 1 mg vodenog rastvora CdCl₂/kg t.m./dan u jednoj dozi i *per os* putem oralne sonde 3 ml 20% rastvora etanola/dan u dvije podijeljene doze ujutro i poslijepodne tokom 21 dana a potom je prekinut unos etanola, nastavljeno je sa administriranjem Cd i uveden DSF u tretman *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan u jednoj dozi do 22. (ekspozicija 1 dan), 24. (ekspozicija 3 dana), 31. (ekspozicija 10 dana) i 42. dana (ekspozicija 21 dan) od početka tretmana (subhronična kombinovana ekspozicija) (grupe su označene kao A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₂/DSF₂₂, A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₄/DSF₂₂₋₂₄, A₁₋₂₁/Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂).

Animalni model je dizajniran uzimajući u obzir da su alkoholičari najčešće i pušači, te da je za vrijeme terapije sa DSF pušenje učestalije, stoga i povećana ekspozicija Cd. Prestanak unosa etanola tokom terapije se podrazumijeva, kako bi se izbjegla neželjena DSF-alkohol reakcija. Tokom izvođenja eksperimenta, svakodnevno je praćena promjena tjelesne mase životinja i unos hrane i vode. Odmah nakon uvođenja u anesteziju intraperitonealnom aplikacijom 50 mg Na-pentobarbitala/kg t.m. otvoren je abdomen i grudni koš, krv je vađena iz lijevog srca, a nakon odvajanja jetre životinje su žrtvovane postupkom dekapitacije, tkivo jetre zamrzavano u tečnom azotu i ostavljeno na -80 °C za dalju analizu. Nakon nepotpunog odmrzavanja i brzim postupkom na ledu, pripremljeno je tkivo jetre za određivanje koncentracije bioelemenata, parametara OS i AOS i histopatološku analizu.

3.4. Priprema tkiva jetre za histopatološku analizu

Dio izolovane jetre je fiksiran u 10% neutralnom formalinu (pH 7,4) tokom 5-7 dana. Poslije završenog procesa fiksacije uzorci tkiva jetre su dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola, ksilenu i ukalupljeni u parafin. Parafinski isječci sječeni mikrotomom debljine 5 µm, bojani su primjenom hematoksilina i eozina (HE metoda

bojenja) (Ruegg i Meinen, 2014) i analizirani pomoću mikroskopa (Nikon ECLIPSE 50 Japan, DXM 1200C). Morfološka struktura bojenih isječaka je prikazana digitalnim slikama.

3.4.1. Reagensi

Paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) i hematoksilin i eozin (Merck, New Jersey, USA) su nabavljeni iz komercijalnih izvora.

3.5. Određivanje aktivnosti enzima funkcije jetre u plazmi

Nakon akutnog, subakutnog i subhroničnog trovanja, životinje su najprije uvedene u anesteziju, a odmah zatim im je vađena krv (*vena iliaca externa*) i iz uzoraka pune krvi pripremana plazma za odgovarajuće analize. U odgovarajuće epruvete sa 100 µL 0,005 mol/L EDTA i 50 µL heparina uzeto je 5 mL krvi i centrifugirano 15 minuta na 3000 obrtaja/minuti.

U uzorcima plazme pacova određivana je aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) primjenom komercijalnih testova (IFCC metoda bez dodatka piridoksal fosfata, na temperaturi 37 °C) na automatskom biohemijском analizatoru (Siemens Advia 1200, Diamond Diagnostics, USA). Vrijednosti ispitivanih enzima u serumu su izražene u U/l.

3.6. Određivanje metala u uzorcima jetre

Koncentracija Cd, Cu, Fe, Zn i Mg određena je iz rastvora razorenih uzoraka jetre metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS) sa plamenom tehnikom, dok je koncentracija Se određena hidridnom-AAS (Analyst 200, PerkinElmer, Shelton, USA).

3.6.1. Reagensi i standardi

Nitratna (HNO₃, 64% p.a.) i perhlorna kiselina (HClO₄, 70% p.a.) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) su nabavljeni iz komercijalnih izvora, kao i osnovni standardni rastvori: Cd (c = 1000 ppm), Cu (c = 1000 ppm), Fe (c = 1000 ppm), Zn (c = 1000 ppm), Mg (c = 1000 ppm) i Se (c = 1000 ppm) (AccuStandard New Haven). Od osnovnih standardnih rastvora metala do radnih standardnih rastvora za kalibraciju pravljena su razblaženja sa 2% HNO₃. Standardni rastvori su pripremljeni prema smjernicama proizvođača atomskog apsorpcionog spektrometra (PerkinElmer Pure Atomic Spectroscopy Standard Guidelines, NIST traceable

CRM, AccuStandard). NaBH_4 (3% NaBH_4 u 1% NaOH) i NaOH korišteni su za hidridnu tehniku (Merck, Darmstadt, Germany).

3.6.2. Priprema uzoraka

Uzorci od ~ 2 g tkiva jetre odmjeravani su u erlenmajere, koji su prethodno oprani u destilovanoj vodi i 10% HNO_3 , a potom nakon 24h isprani sa redestilovanom vodom. Na uzorke je dodavana smjesa koncentrovanih mineralnih kiselina za digestiju - HNO_3 i HClO_4 (4:1; v/v) (8 mL conc HNO_3 + 2 mL conc HClO_4), uparavano do suha na pješčanom kupatilu, a potom kvantitativno prenošeno sa 0,1 M HNO_3 u normalne sudove od 10 ml i naposljetku preneseno u plastične epruvete.

3.6.3. Određivanje koncentracije metala

U uzorcima pripremljenim prema postupku iz 3.6.2 koncentracija metala određena je pomoću AAS. Donja granica kvantifikacije, koncentracija do koje je metoda pokazala linearnost i preciznost metode navedeni su za sve ispitivane metale, respektivno: Cd (0,02 ppm, 2 ppm, 0,08%), Cu (0,14 ppm, 20 ppm, 0,06%), Fe (0,13 ppm, 100 ppm, 0,08%), Zn (0,015 ppm, 1 ppm, 0,07%), Mg (0,03 ppm, 0,5 ppm, 0,12%) i Se (0,5 ppb, 25 ppb, 0,14%).

Talasne dužine korištene za određivanje metala su: 228.8 nm za Cd, 216.51 nm za Cu, 305.91 nm za Fe, 213.86 nm za Zn, 285.21 nm za Mg i 196.03 nm za Se. Koncentracija metala izražena je u $\mu\text{g/g}$ tkiva za Cd, Cu, Fe, Zn i Mg, i ng/g tkiva za Se.

3.7. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u homogenatima tkiva jetre

3.7.1. Hemikalije

Glutation, redukovani oblik (98-100% čistoća) i oksidirani oblik (99% čistoća), ortofosforna kiselina (OPA) i metafosforna kiselina (MPA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka), natrijum perhlorat monohidrat ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Acros Organics, New Jersey, USA), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), natrijum fosfat (Na_2HPO_4), kalijum dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), trihlorsirćetna kiselina (TCA) i tiobarbiturna kiselina (TBA) (Merck, Darmstadt, Njemačka), nitro plavo tetrazolijum hlorid (NBT) i Folin Ciocalteu's fenol reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) su komercijalnog porijekla. Ransod komercijalni kitovi su korišteni za određivanje

aktivnosti SOD (RANDOX Laboratories, UK), dok su Sigma komercijalni kitovi korišteni za određivanje GR (kataloški broj GRSA), GPx (kataloški broj CGP1) i GST (kataloški broj CS0410) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Dejonizovana voda je svakodnevno pripremana u bolničkoj apoteci Vojnomedicinske akademije (VMA, Beograd, Srbija). Rastvor NaClO₄, koji je u sastavu mobilne faze za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (HPLC), je redovno filtriran neposredno prije analize kroz celulozne membranske filtere promjera pora 0,45 µm (Agilent Technologies, Njemačka).

3.7.2. Priprema homogenata za određivanje superoksid anjon radikala, malondialdehida i aktivnosti enzima

Nakon nepotpunog odmrzavanja priprema tkiva jetre za analize vršena je homogenizacijom 0,1-0,4 g uzorka na ledu, u hladnom puferizovanom saharoznom mediju (1 ml) (0,25 mol/l saharoza, 0,1 mmol/l EDTA i Na/K fosfatni pufer, pH 7,2) u staklenoj epruveti za homogenizaciju sa teflonskim tučkom, na 800 obrtaja/min (Schüett-biotec, Göttingen, Germany). Nakon dva uzastopna centrifugiranja (Beckman J-21, rotor J-20) u trajanju od 15 min na 3500 obrtaja/min i +4 °C, supernatant je izdvojen i sonifikovan (MSE, P631555) radi liziranja membrana subcelularnih struktura i predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju (Gurd i sar., 1974). Sonifikacija je izvedena u tri ciklusa po 30 sekundi i sa 5 sekundi pauze između ciklusa, a talog odbacivan. Dobiveni supernatant je odmah analiziran ili čuvan u ependorf posudama na -80 °C do momenta određivanja koncentracije proteina i odgovarajućih parametara OS i AOS. Svi uzorci su za vrijeme pripreme i tokom određivanja neenzimskih i aktivnosti enzimskih parametara antioksidativne zaštite čuvani na +4 °C.

3.7.3. Priprema homogenata za određivanje glutaciona

Nakon nepotpunog odmrzavanja priprema tkiva za analize je vršena homogenizacijom 0,1-0,4 g uzorka na ledu u hladnom fiziološkom rastvoru (1 ml) u staklenoj epruveti za homogenizaciju sa teflonskim tučkom, na 800 obrtaja/min (Schüett-biotec, Göttingen, Germany). Homogenatu tkiva jetra je dodana hladna MPA (5% w/v) (1 ml) za deproteinizaciju. Nakon centrifugiranja u plastičnim epruvetama 25 min na 8000 obrtaja/min i +4 °C, supernatant je izdvojen za hromatografsku analizu ili čuvan u ependorf posudama na -20 °C do momenta određivanja glutaciona. Na izdvojeni talog je dodan rastvor 0,1 M NaOH

i nakon 24 h spektrofotometrijski određena koncentracija proteina. Svi uzorci su za vrijeme pripreme i tokom određivanja glutaciona čuvani na +4 °C.

3.7.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Nakon pripreme homogenata tkiva jetre u saharoznom medijumu određivani su malondialdehid (MDA), superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD), aktivnost katalaze (CAT), aktivnost glutation reduktaze (GR), aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i aktivnost glutation-S-transferaze (GST). Iz fiziološkog medijuma određivani su redukovani glutation (GSH) i oksidirani glutation (GSSG) te je utvrđen njihov odnos GSSG/GSH.

3.7.5. Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva jetre

Parametri OS, kao i AOS, izražavani su na mg proteina, tako da je prije svih mjerenja u homogenatima tkiva jetre najprije određen sadržaj proteina. Proteini su određivani metodom po Lowry-ju, koja se zasniva na primjeni kristalizovanog albumina goveđeg seruma kao standarda (5% BSA) (Lowry, 1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji peptidnih veza i jona Cu u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa sa aromatičnim amino kiselinama (tirozin u triptofan) u polipeptidnim lancima. U reakciji nastaje kompleksno jedinjenje plave boje, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji proteina.

U epruvetu je odmjeravano 10 μ l uzorka i do 1 ml reakcione smjese: 2 ml 0,5 % $CuSO_4$ i do 100 mL Stock Lowry reagensa (10 g Na_2CO_3 , 10 mL 5 mol/L NaOH, 100 mg K-Na tartarata i H_2O do 500 mL), inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi i miješano na vorteksu.

Slijepa proba (1 ml reakcione smeše) i standardi (10, 20, 30, 40, 50 μ L BSA - *bovini serum albumin*, poznate koncentracija proteina 1 mg/mL, uz dodatak reakcione smjese do 1 mL) su takođe 10 minuta inkubirani na sobnoj temperaturi i vorteksirani. Zatim je u sve analize (uzorci, slijepa proba, standardi) dodato po 100 μ L Follin-reagensa i ponovo je vršena inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi. Intenzitet plave boje mjeren je spektrofotometrijski na 575 nm.

Za konstruisanje kalibracione krive i regresionu jednačinu mjerena je absorbancija (A) radnih standardnih rastvora. Koncentracija proteina u uzorku se za interpretaciju dobivenih rezultata izražava u mg/mL homogenata tkiva.

3.7.6. *Određivanje koncentracije malondialdehida*

Određivanje MDA u homogenatima tkiva zasniva se na reakciji MDA sa TBA pri čemu nastaje obojeni kompleks jako žute boje čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski na 492-650 nm (Girotti i sar., 1991). Reakcionu smjesu TBA reagensa čine 15 % trihlorsirćetna kiselina, 0,375 % tiobarbiturna kiselina i 0,25 mol/L hlorovodonične kiseline.

U epruvete je odmjeravano 200 µl razblaženog homogenata (50 µl homogenata + 150 µl prečišćene vode) i 400 µl TBA reagensa, zatim zagrijavano na 95 °C (pH 3,5) tokom 5 minuta u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja izvršeno je centrifugiranje 1 minut na 3000 obrtaja/min, nakon čega je po 300 µl supernatanta razliveno u ploču i mjerena je apsorbancija prema slijepoj probi. Vrijednost apsorbancije očitana je na ELISA spektrofotometru pri mjernoj talasnoj dužini od 492 nm i referentnoj talasnoj dužini od 650 nm.

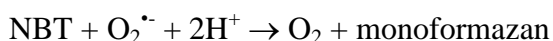
Za konstruisanje kalibracione krive i regresionu jednačinu, napravljen je radni standardni rastvor MDA koncentracije 1 mmol/l, a zatim serija mjernih rastvora koncentracija 10, 50, 100, 150 i 200 µmol/l. Koncentracija MDA je izračunavana iz regresione jednačine: gdje je y – razlika absorbancija na datim talasnim dužinama, a x – koncentracija MDA (µmol/50 µl homogenata). Dobijeni rezultati za MDA se izražavaju prema sadržaju proteina u 50 µl homogenata i vrijednosti prevode u nmol MDA/mg proteina.

3.7.7. *Određivanje koncentracije superoksid anjon radikala*

Određivanje stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u homogenatima tkiva zasniva se na redukciji nitro plavo tetrazolijuma (NBT) do monoformazana dejstvom $O_2^{\cdot-}$, što se koristi kao mjera stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u hemijskim i biološkim sistemima (Auclair i Voisin, 1985).

Redukcija NBTa odvija se u dva koraka:

- kao nepotpuna redukcija do monoformazana:



- kao kompletna redukcija NBT-hlorida do diformazana:



U oksidovanoj formi NBT je žuta supstanca rastvorljiva u vodi, dok je njegova redukcija u diformazan praćena promjenom u intenzivnu plavu boju i smanjenjem rastvorljivosti. U puferizovanom vodenom rastvoru bliskom neutralnom pH, molarni ekstinkcioni koeficijent pri talasnoj dužini od 550 nm iznosi za monoformazan 15 000 M⁻¹

$^1\text{cm}^{-1}$, a za diformazan $30\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. U vodenim rastvorima reakcije koje stvaraju $\text{O}_2^{\cdot-}$ dovode do nepotpune redukcije NBT do monoformazana.

$\text{O}_2^{\cdot-}$ - zavisna redukcija NBT odvija se do monoformazana. Reakcionu smjesu čine 1 mmol NBT (rastvorenog u 0,05 mol fosfatnom puferu, pH 8,6 sa 0,1 mmol EDTA) i 0,1 mg/mL želatina, koji NBT-formazan održava u rastvoru. Rastvor NBT je jedan sat bio izložen dejstvu azota pod pritiskom, što je imalo za cilj da smanji napon kiseonika u medijumu. Reakcija je otpočinjala dodavanjem 0,05 mL uzorka u 1 mL reakcione smjese, a promjena ekstinkcije praćena je u toku 5 minuta na talasnoj dužini 550 nm. Stvaranje $\text{O}_2^{\cdot-}$ izražavano je kao nmol redukovanog NBT/min/mg proteina.

3.7.7.1. *Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze*

Aktivnost ukupne SOD u homogenatima tkiva određivana je pomoću komercijalnog kita. Određivanje se zasniva na reakciji $\text{O}_2^{\cdot-}$, generisanih ksantinom i ksantin oksidazom, sa 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (I.N.T.). Intenzitet crvene boje formazana je mjereno na talasnoj dužini 505 nm.

Aktivnost SOD je predstavljena stepenom inhibicije. Dobijeni rezultati za aktivnost ukupne SOD se izražavaju u jedinicama po miligramu proteina (U SOD/mg proteina).

3.7.7.2. *Određivanje aktivnosti katalaze*

Aktivnost CAT određivana je spektrofotometrijskom metodom. Amonijum molibdat formira žuti kompleks sa H_2O_2 i pogodan je za mjerenje kako serumskih, tako i aktivnosti CAT u tkivu (Góth, 1991). Uzorak (0,1 mL) je najprije inkubiran 1 minut sa 0,5 mL $65\ \mu\text{M}$ H_2O_2 u Na-K fosfatnom puferu, pH 7,2. Kontrolna reakcija je pripremljena sa 0,1 mL Na-K fosfatnog pufera, pH 7,2 i 0,5 mL $65\ \mu\text{M}$ H_2O_2 . Reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,5 mL $32,4\ \text{mmol}$ amonijum molibdata u uzorke i kontrole. Absorbanca između žučkastog molibdata i H_2O_2 kompleksa u odnosu na slijepu probu čita se na 405 nm. Jedinica aktivnosti CAT definiše se kao broj μmolova H_2O_2 redukovanih u minuti ($\mu\text{mol}\ \text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$). Aktivnost ovog enzima u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U CAT/mg proteina).

3.7.7.3. *Određivanje aktivnosti glutation reduktaze*

Aktivnost GR u homogenatima tkiva je određivana pomoću komercijalnog kita. Metoda se zasniva na redukciji GSSG u GSH dejstvom GR. Glutation reduktaza je potreban donor redukcionih ekvivalenata- NADPH za reakciju. Po završetku reakcije GSH uzrokuje redukciju 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojeve kiseline) (DTNB) u 5-tio (2-nitrobenzojevu kiselinu) (TNB). Porast absorbancije (odgovara formiranju TNB-a) je mjerena na talasnoj

dužini 412 nm, i ukazuje na aktivnost GR. Absorbancija je očitavana nakon 60 sekundi inkubacije reakcione smjese i svakih 10 sekundi da se dobije 11 ciklusa.

Dobijeni rezultati za aktivnost GR se izražavaju u jedinicama po miligramu proteina (U GR/mg proteina). Jedna internacionalna jedinica (U) GR odgovara redukciji 1 μ mola DTNB-a u TNB.

3.7.7.4. *Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze*

Aktivnost GPx u homogenatima tkiva je određivana pomoću komercijalnog kita. Metoda (indirektno određivanje) se zasniva na inicijalnom utrošku GSH u reakciji koju katalizira GPx (redukcija H_2O_2 into H_2O), a potom slijedi ponovno prevođenje GSSG u GSH dejstvom GR koja koristi NADPH kao kofaktor. Smanjenje apsorbancije tokom oksidacije NADPH u $NADP^+$ (odgovara GPx aktivnosti) je mjereno na talasnoj dužini 340 nm. Reakcija se izvodi pri temperaturi 25 °C i pH 7, kako ne bi došlo do spontane reakcije H_2O_2 i GSH. Dodatkom H_2O_2 pokreće se reakcija nakon prethodnog dodatka 1 mM NaN_3 u reakcionu smjesu, koji blokira CAT. Apsorbancija je očitavana nakon 15 sekundi inkubacije reakcione smjese i svakih 10 sekundi da se dobije 6 ciklusa.

Dobijeni rezultati za aktivnost GPx se izražavaju u jedinicama po miligramu proteina (U GPx/mg proteina). Jedna internacionalna jedinica (U) GPx uzrokuje nastanak 1 μ mola $NADP^+$ iz NADPH u minuti, pri definisanim uslovima.

3.7.7.5. *Određivanje aktivnosti glutathion-S-transferaze*

Aktivnost GST u homogenatima tkiva je određivana pomoću komercijalnog kita. Metoda se zasniva na konjugaciji tiolne (-SH) grupe GSH sa 1-hloro-2-dinitrobenzenom (CDNB), što dovodi do porasta absorbancije na talasnoj dužini 340 nm, proporcionalnoj aktivnosti GST. Apsorbancija se odmah očitava, svakih 60 sekundi da se dobije 6 ciklusa.

Dobijeni rezultati za aktivnost GST se izražavaju u jedinicama po miligramu proteina (U GST/mg proteina).

3.7.7.6. *Određivanje koncentracije redukovanog i oksidiranog glutathiona*

Određivanje GSH i GSSG u homogenatima tkiva zasniva se na hromatografskoj metodi koja je prilagođena rutinskoj analizi većeg broja uzoraka (Begic, 2017). Metoda omogućava istovremeno određivanje oba oblika glutathiona, čime se izbjegavaju greške koje nastaju kada se primjenjuju formule koje služe za izračunavanje GSSG iz razlike izmjenjenog tGSH i GSH.

Analize su izvedene na aparatu Shimadzu korporacijskog HPLC sistema, koji je opremljen sa pumpom (LC-30AD Nexera Liquid Chromatograph Pump system), pećnicom

(CTO-30A Nexera Column Oven), detektorom (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector), autosemplerom (SIL-30AC Nexera Autosampler) i degazerom (DGU-20A5 Prominence Degasser), koji su proizvedeni od strane Shimadzu USA Manufacturing INC (Canby, Oregon, USA). Za kontrolu instrumenta i analizu podataka korišten je Labsolutions Main-system administrator i Nexera softver (2008-2010). Separacija je postignuta na analitičkoj koloni Zorbax eclipse AAA (4,6x150 mm; 3,5 μm) (Agilent Technologies), pri optimiziranim hromatografskim uslovima (protok 1 ml/min, temperatura 40 °C, talasna dužina 215 nm). Kolona je svaki dan ispirana sa acetonitriplom i prije analize rekondicionirana sa mobilnom fazom. Izokratska separacija je izvedena sa mobilnom fazom koju čini 100 mM rastvor NaClO_4 (pH 2,8 podešen sa 0,1% OPA). Za hromatografsku analizu je injektovano 50 μl supernatanta pripremljenog prema proceduri iz 3.7.3.

Za konstruisanje kalibracione krive i regresionu jednačinu, od osnovnog standardnog rastvora (smjesa GSH i GSSG) (1 mmol/l), napravljen je radni rastvor koncentracije 100 $\mu\text{mol/l}$, a zatim serija mjernih rastvora koncentracija 0,01, 1, 10, 100 i 200 $\mu\text{mol/l}$. Standardi GSH i GSSG su rastvoreni u diluentu/mobilnoj fazi. Mjerni rastvori se pripremaju svaki dan i čuvaju na +4 °C. Pikovi GSH i GSSG iz mjernih rastvora pokazuju izuzetnu ponovljivost retencionih vremena (t_r) i površine (A) (GSH: t_r RSD = 0,83%, A RSD = 0,33%; GSSG: t_r RSD = 1,84%, A RSD = 0,24%). Identifikacija je potvrđena provjerom UV spektra. Uzimajući u obzir prisustvo endogenog GSH i GSSG u homogenatima tkiva jetre, snimljen je prvo hromatogram supernatanta iz pripremljenog homogenata tkiva jetre kako bi se utvrdila površina pika koja odražava endogene koncentracije GSH i GSSG tzv. biološki matriks uzorka. Zatim su u porcije istog supernatanta iz homogenata tkiva jetre dodani određeni volumeni osnovnog standardnog rastvora GSH i GSSG, kako bi se dobile tačno poznate finalne koncentracije i snimljeni su hromatogrami. Za procjenu prinosa metode (*recovery*), napravljena je usporedba površina pikova iz pojačanih (*spiked*) uzoraka sa površinama pikova iz čistih mjernih standardnih rastvora. Nagibi dobivenih kalibracionih krivih odgovaraju.

Metoda određivanja je linearna u opsegu koncentracija potrebnih za određivanje uzoraka 0,01-200 $\mu\text{mol/l}$. Donja granica kvantifikacije (izračunata na bazi standardne devijacije odgovora i nagiba definisane kalibracione krive – 10x STDEV niske koncentracije/nagib kalibracione krive) iznosi 0,56 $\mu\text{mol/l}$ za GSH i 1,58 $\mu\text{mol/l}$ za GSSG. Preciznost metode (izražena kao koeficijent varijacije –CV) iznosi < 2,56% za GSH i < 1,17% za GSSG, te tačnost metode (izražena kao razlika između očekivane i izmjerene

koncentracije - % bias) iznosi < 2% i za GSH i za GSSG. Prinos metode iznosi 99,19% za GSH i 99,45% za GSSG.

Koncentracija je izračunavana iz regresione jednačine: za GSH $y = 2492,7x - 175,87$ ($r^2 = 1$) i za GSSG $y = 6648,8x + 743,4$ ($r^2 = 1$). Izmjerene vrijednosti u $\mu\text{mol/l}$ su izračunavane u odnosu na proteinski status. Dobijeni rezultati za GSH i GSSG se izražavaju u nmol GSH/mg proteina i nmol GSSG/mg proteina.

Sprovedena validacija metode odgovara zahtjevima SWGTOX (Scientific Working Group for Forensic Toxicology, 2013).

3.8. Statistička obrada podataka

Statističkom obradom podataka je ispitana značajnost razlika između vrijednosti parametara ispitivanih kod različitih grupa i korelacije između parametara/efekata koji su mjereni.

Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrijednosti izmjerenih parametara između određenih grupa/podgrupa korišteni su jednofaktorska analiza varijanse (one-way ANOVA) i post-hok Tukey-jev test (softver SPSS Statistics 24.0). Nivo statističke značajnosti za sve testove je bio $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Optimizacija izokratske HPLC-UV metode za paralelno određivanje redukovano i oksidiranog glutationa u animalnim tkivima

Predložena metoda podrazumijeva UV detekciju i jednostavnu pripremu bioloških uzoraka bez postupka derivatizacije. Metoda je za potrebe istraživanja testirana na uzorcima homogenata tkiva jetre *Wistar* pacova pripremljenih prema proceduri iz sekcije 3.7.3. za ispitivane grupe životinja predstavljene u sekciji 3.3.

4.1.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Odabir analitičke kolone: Veći broj HPLC kolona sa različitim karakteristikama testirane su u svrhu optimizacije hromatografske rezolucije. Najveća rezolucija (> 2), koja je potvrda dobre odvojenosti GSH i GSSG pikova od pikova koji potiču od drugih komponenti iz biološkog uzorka, postignuta je sa RP ZORBAX Eclipse AAA (4,6x150 mm; 3,5 μ m) analitičkom kolonom. Dobra razdvojenost pikova je dosljedna u svim izvedenim hromatografskim analizama. Takođe je visoka rezolucija (> 1) postignuta sa ZORBAX C8 Eclipse X-DB (4,6x150 mm ; 5 μ m) analitičkom kolonom, koja može poslužiti kao alternativa za iste analize. Izmjena temperature kolone, u svrhu optimizacije hromatografskih uslova, pokazala je najvišu rezoluciju pri 25 °C, ali je temperatura kolone pri 40 °C povećala oštrinu pikova i skratila vrijeme trajanja analize bez narušavanja rezolucije pikova.

Ispitivanje je pokazalo da je za postizanje dobre razdvojenosti GSH i GSSG pikova kolonu potrebno svakodnevno ispirati sa acetonitrilom, te neposredno prije analize rekondicionirati sa mobilnom fazom.

Promjena uslova mobilne faze: Podešavanje molarne koncentracije konstituenta mobilne faze (NaClO₄) na 100 mM, pokazalo je manje promjene u separaciji GSH i GSSG pikova, odnosno više dosljednu separaciju u poređenju sa separacijom pri molarnoj koncentraciji od 50 mM. Površine ispod pikova su ostale usporedive bez obzira na razlike u molarnoj koncentraciji. Takođe je važno naznačiti da je pri 100 mM koncentraciji postignuta veća simetrija pikova GSH i GSSG, sa manje učestalim cijepanjem pika GSH.

Separacija pikova se pokazala izuzetno ovisnom od promjene pH vrijednosti mobilne faze. Ispitivanje je pokazalo da se pri tačno podešenoj pH vrijednosti od 2,8 (podešavanje pH mobilne faze sa 0,1% OPA) postižu najviša rezolucija pikova i konstantna retencionna vremena pri kojima se eluiraju GSH i GSSG [izuzetna ponovljivost retencionih vremena (t_r)

i površine (A) predstavljena u procentima (%) kao relativna standardna devijacija (RSD); mjerenja su ponovljena 6 puta iz iste vijale ($n = 6$); (GSH: t_r RSD = 0,83%, A RSD = 0,33%; GSSG: t_r RSD = 1,84%, A RSD = 0,24%). Promjene pH iznad vrijednosti 3 ili ka vrijednosti 2, značajno su reducirale hromatografsku rezoluciju i separaciju pikova, do tačke kada razdvajanje više nije bilo moguće postići.

Izmjene konstituenta mobilne faze, odnosno kombinovanje sa metanolom i/ili acetonitrilom u različitim omjerima u odnosu na udio NaClO_4 , znatno narušavaju hromatografsku rezoluciju npr. zastupljenost metanola od samo 15% onemogućava detekciju GSH i GSSG. Potpuna zamjena konstituenta mobilne faze sa lako dostupnom komponentom laboratorijama - kalijum dihidrogen fosfatom (100 mM; pH 2.8), pokazala se uspješnom, odnosno omogućena je detekcija GSH i GSSG. Postignuta je nešto manje konzistentna separacija, iako je skraćeno vrijeme trajanja analize. Na osnovu razlika u hromatografskoj separaciji, odlučeno je da se analize bioloških uzoraka nastave sa rastvorom NaClO_4 , ali rastvor kalijum dihidrogen fosfata može poslužiti kao alternativa za iste analize.

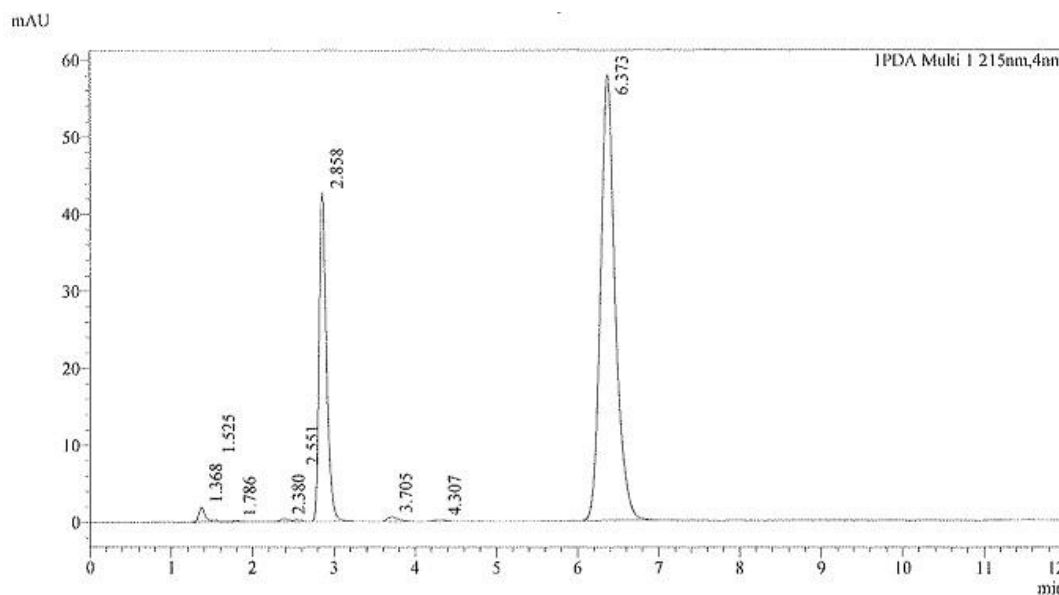
Unapređenje protokola za pripremu uzoraka: MPA (5% w/v) je primjenjena u svrhu precipitacije proteina prilikom pripreme homogenata tkiva jetre *Wistar* pacova za određivanje obje forme glutationa. Izdvojeni supernatant nakon centrifugiranja se primjenjuje za hromatografsku analizu, a iz izdvojenog taloga se odredi koncentracija precipitiranih proteina, te se rezultati predstavljaju u odnosu na njihov sadržaj. Primjena fiziološkog rastvora za homogenizaciju umjesto rastvora NaClO_4 i EDTA, rezultirala je postizanjem značajno većeg prinosa GSSG-a. Primjena MPA nije pokazala interferenciju sa drugim pikovima. Međutim, ukoliko se i homogenizacija sprovede sa MPA, pikovi GSH i GSSG gube na oštini i veća je mogućnost interferencije sa drugim pikovima.

Ispitivanje je takođe pokazalo da primjena sulfosalicilne kiseline (SSA), kao protein-precipitirajućeg agensa, rezultira interferencijom inicijalnog pika i pika GSH, koji biva djelimično ili potpuno prekriven, dok GSSG pik uopšte nije moguće detektovati, stoga i pretpostavka da su obje forme glutationa precipitirane sa SSA. Iz datog razloga se ostaje pri izboru MPA za deproteinizaciju.

Unapređenje metode ogleda se u izuzetnoj reproducibilnosti (dobra ponovljivost retencionih vremena i površina pikova GSH i GSSG), konzistentnoj separaciji pikova, unaprijeđenoj simetriji i rezoluciji pikova što omogućava veću preciznost i tačnost prilikom integriranja, dok izmijenjeni protokol za pripremu uzoraka podržava visok prinos za GSSG.

4.1.2. Primjenjivost metode

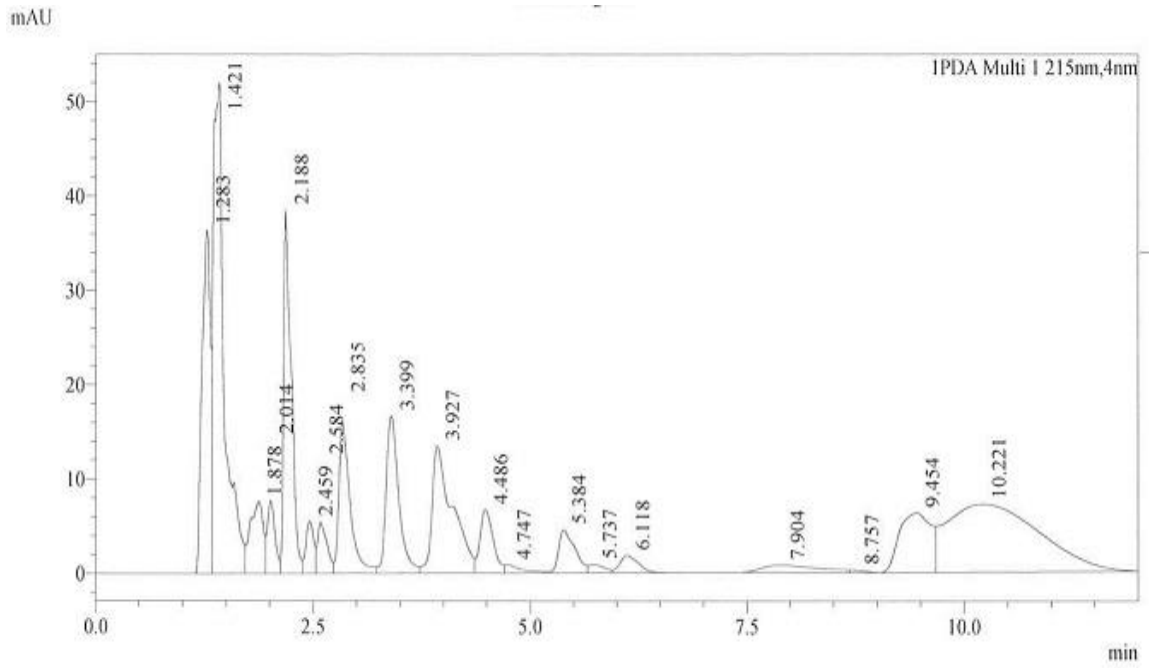
Prikazani hromatogram standardnog rastvora smjese GSH i GSSG (Slika 1) daje potvrdu izvrsne separacije pikova GSH i GSSG, što je moguće zaključiti na osnovu faktora selektivnosti ($\alpha = k'b/ k'a$) koji pri odabranim hromatografskim uslovima ima vrijednost > 3 (idealna opseg između 1 i 5). Optimizirani hromatografski uslovi su omogućili i veću oštrinu i simetriju pikova, te kratka retenciona vremena.



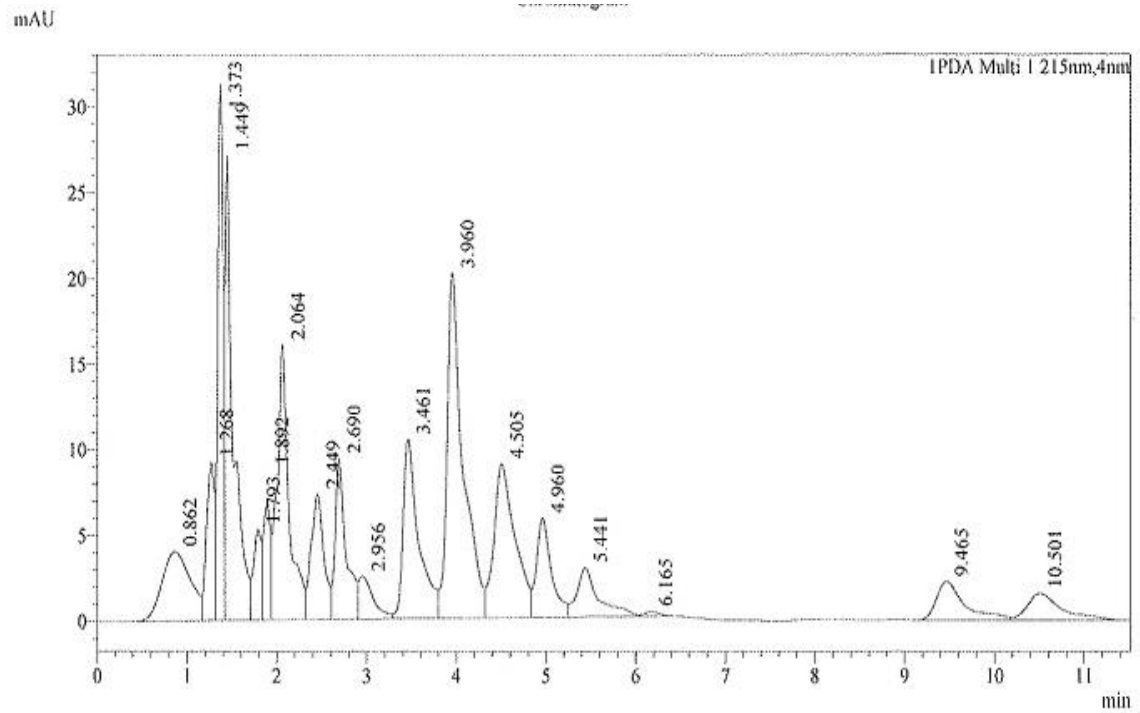
Slika 1. Hromatogram standardnog rastvora (100 μ M) smjese redukovanog glutationa (GSH) i oksidiranog glutationa (GSSG).

GSH: retenciono vrijeme 2,85 min; površina ispod pika 248 290; težling faktor (10%) 1,22; rezolucija (USP) 1,55; faktor kapaciteta (k') 1,09. GSSG: retenciono vrijeme 6,37 min; površina ispod pika 666 297; težling faktor (10%) 1,14; rezolucija (USP) 7,01 ; faktor kapaciteta (k') 3,66.

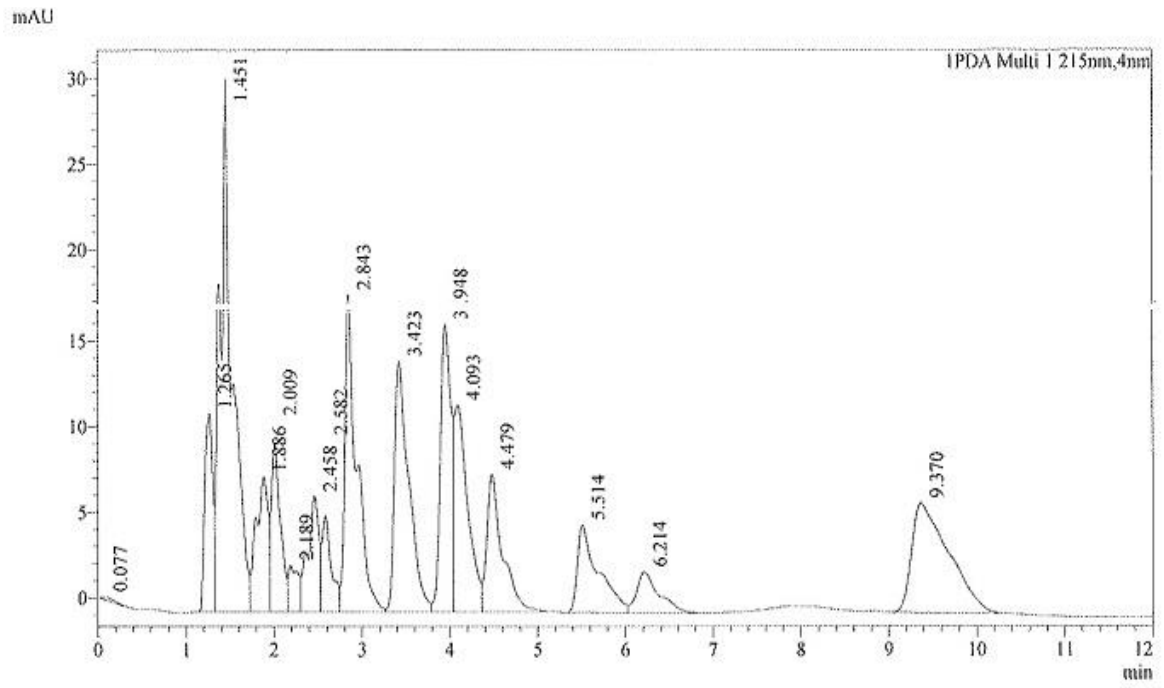
Za demonstriranje primjenjivosti metode, mjerili smo nivo GSH i GSSG u homogenatima tkiva jetre *Wistar* pacova u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama (Slika 2A, B, C, D, E, F, G, H.). Neidentificirani pikovi na hromatogramu potiču od komponenti iz biološkog matriksa i ne interferiraju sa pikovima od interesa.



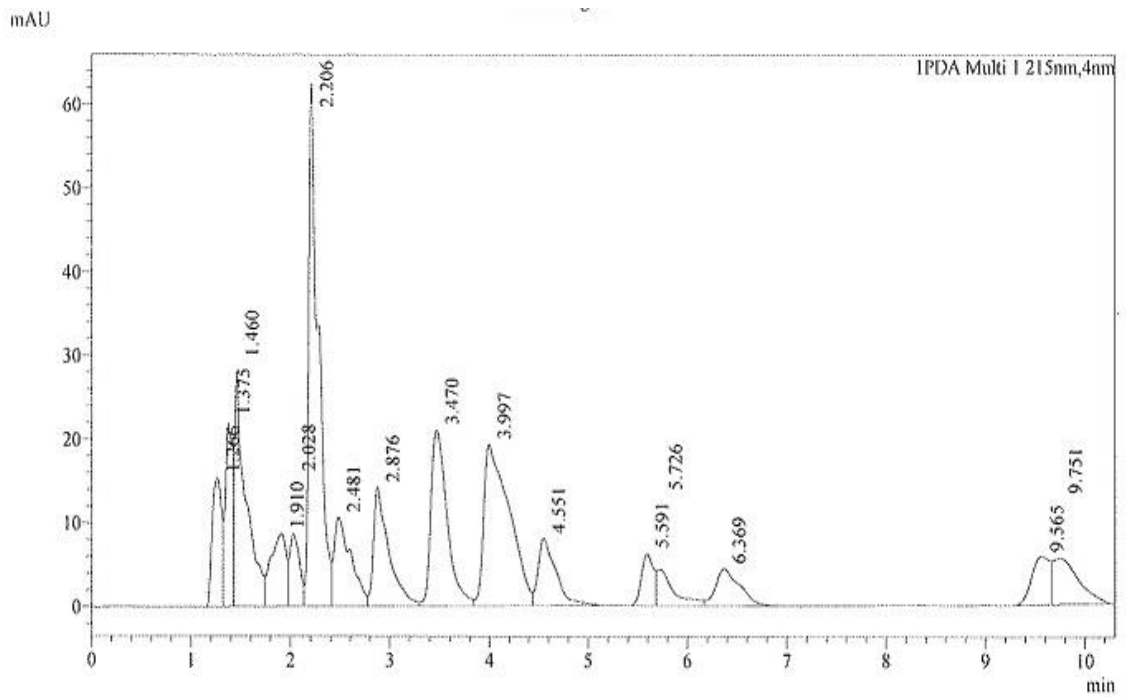
A. Kontrola



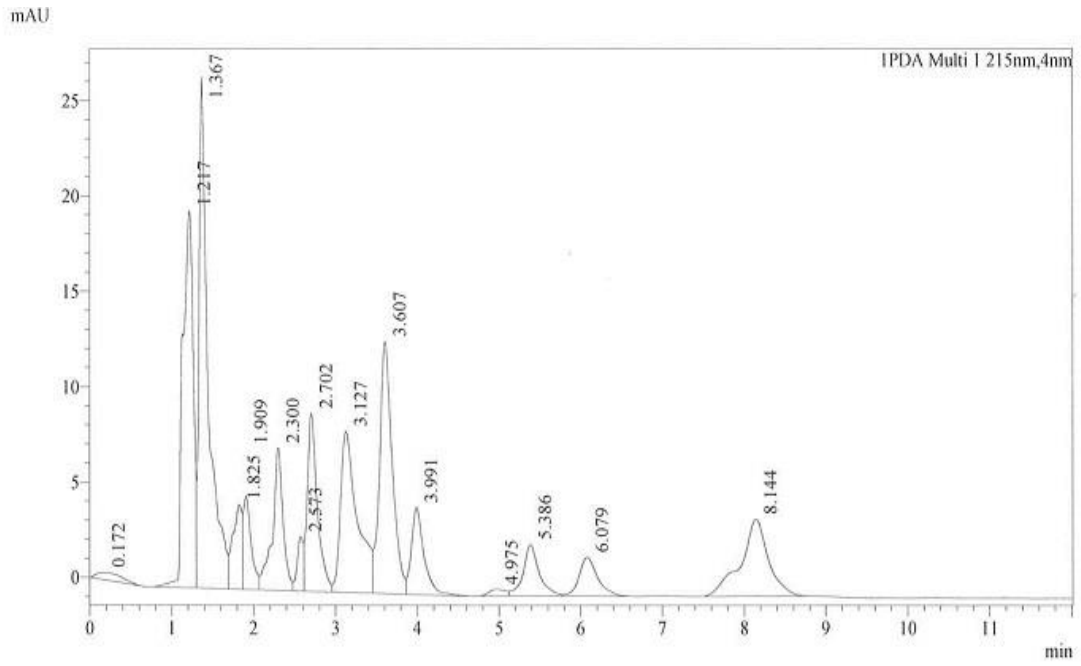
B. Cd grupa



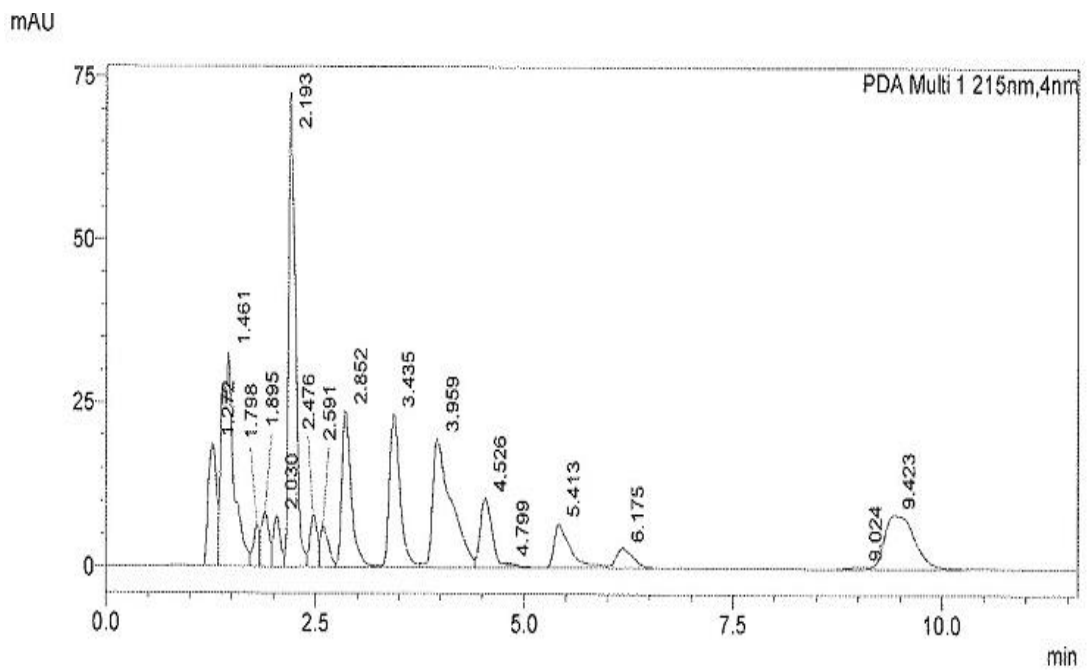
C. A grupa



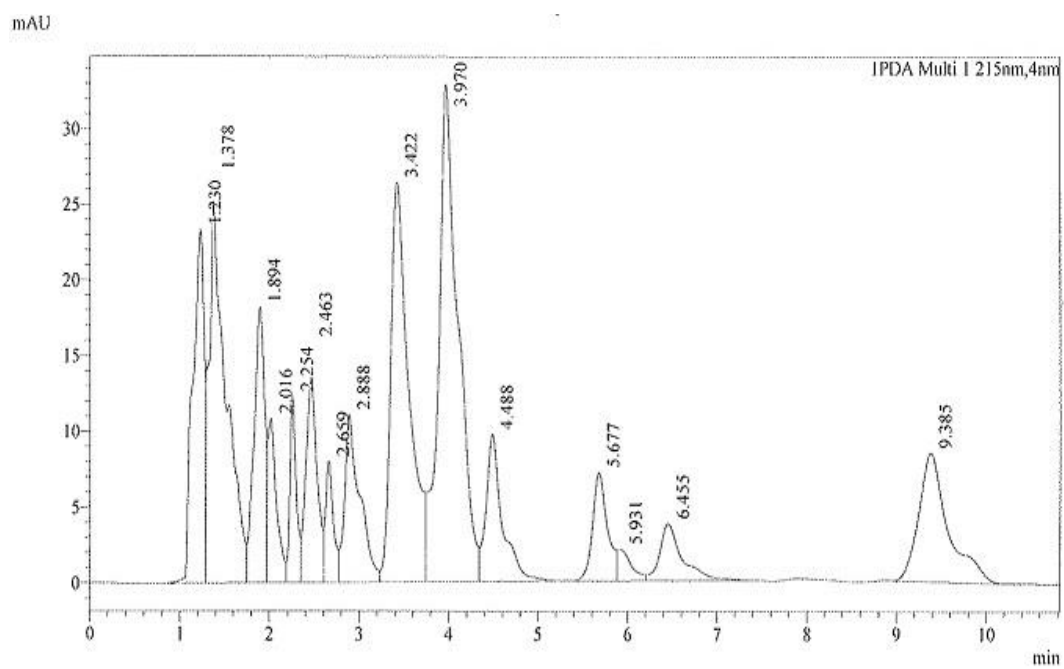
D. DSF grupa



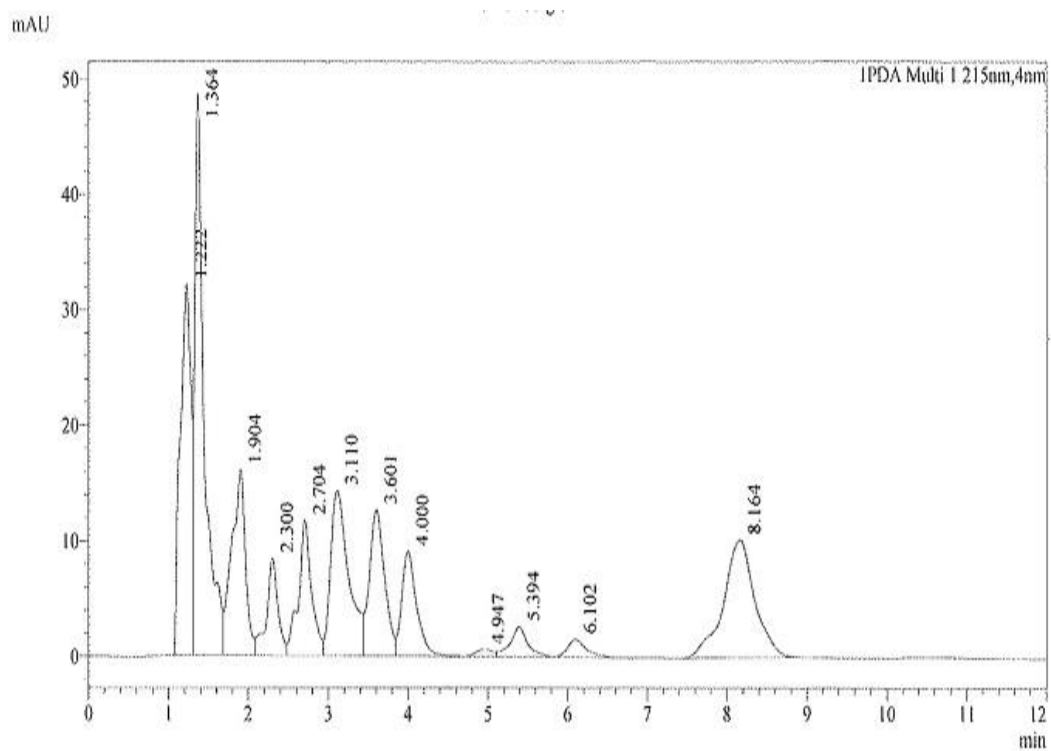
E. A/Cd grupa



F. A/DSF grupa



G. Cd/DSF grupa



H. A/Cd/DSF grupa

Slika 2 A-H. Hromatogrami redukovanog glutationa (GSH) i oksidiranog glutationa (GSSG) u jetri *Wistar* pacova kontrolne i ekperimentalnih grupa.

A. kontrolna gupa - GSH: retenciono vrijeme 2,84 min; površina ispod pika 146 692; izmjerena koncentracija 58,92 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,12 min; površina ispod pika 26 021; izmjerena koncentracija 3,80 μM ; **B.** Cd grupa (*i.p.* 1 mg CdCl_2/kg t.m./dan) - GSH: retenciono vrijeme 2,69 min; površina ispod pika 79 932; izmjerena koncentracija 32,13 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,17 min; površina ispod pika 3005; izmjerena koncentracija 0,34 μM ; **C.** A grupa (*per os* 3 ml 20% EtOH/dan) - GSH: retenciono vrijeme 2,84 min; površina ispod pika 172 920; izmjerena koncentracija 69,44 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,21 min; površina ispod pika 41 195; izmjerena koncentracija 6,08 μM ; **D.** DSF grupa (*per os* 178.5 mg DSF/kg t.m./dan) - GSH: retenciono vrijeme 2,88 min; površina ispod pika 150 897; izmjerena koncentracija 60,61 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,37 min; površina ispod pika 74 781; izmjerena koncentracija 11,14 μM ; **E.** A/Cd grupa (*i.p.* 1 mg CdCl_2/kg t.m./dan + *per os* 3 ml 20% EtOH/dan)- GSH: retenciono vrijeme 2,7 min; površina ispod pika 79 088; izmjerena koncentracija 31,80 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,08 min; površina ispod pika 31 644; izmjerena koncentracija 4,65 μM ; **F.** A/DSF grupa (*per os* 3 ml 20% EtOH/dan 21 dan + *per os* 178.5 mg DSF/kg t.m./dan u nastavku tretmana) - GSH: retenciono vrijeme 2,85 min; površina ispod pika 181 705; izmjerena koncentracija 72,98 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,18 min; površina ispod pika 42 380; izmjerena koncentracija 6,19 μM ; **G.** Cd/DSF grupa (*i.p.* 1 mg CdCl_2/kg t.m./dan 21 dan + *per os* 178.5 mg DSF/kg t.m./dan zajedno sa Cd u nastavku tretmana) - GSH: retenciono vrijeme 2,89 min; površina ispod pika 129 722; izmjerena koncentracija 52,11 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,46 min; površina ispod pika 65 550; izmjerena koncentracija 9,75 μM ; **H.** A/Cd/DSF grupa (*i.p.* 1 mg CdCl_2/kg t.m./dan + *per os* 3 ml 20% EtOH/dan 21 dan + *per os* 178.5 mg DSF/kg t.m./dan zajedno sa Cd u nastavku tretmana) - GSH: retenciono vrijeme 2,7 min; površina ispod pika 133 420; izmjerena koncentracija 53,59 μM i GSSG: retenciono vrijeme 6,1 min; površina ispod pika 24 348; izmjerena koncentracija 3,55 μM .

Vrijednosti za GSH i GSSG izražene u μM su preračunate prema sadržaju proteina i izražene u nmol (GSH ili GSSG)/mg proteina za prikladnu diskusiju dobivenih rezultata.

4.1.3. Validacija optimizirane metode

Selektivnost: Selektivnost metode je demonstrirana usporedbom retencionih vremena i UV spektara GSH i GSSG dobivenih iz snimljenih uzoraka ($n = 10$) i smjese standardnog rastvora. Retenciona vremena i UV spektri odgovaraju za obje ispitivane komponente (GSH i GSSG).

Na hromatogramima je prikazano odsustvo interferirajućih pikova iz matriksa uzorka i mjerljiv sadržaj endogenog glutationa (obje forme).

Kalibraciona kriva: Konstruisane kalibracione krive za obje ispitivane komponente (GSH i GSSG) su pokazale linearnost u testiranom rasponu koncentracija 0,01 – 200 μM . Dobivene su regresione jednačine iz kojih su izračunate koncentracije u uzorcima: $y = 2492.7x - 175.87$; $R^2 = 1$ za GSH i $y = 6648.8x + 743.4$; $R^2 = 1$ za GSSG (gdje y predstavlja

površinu ispod pika i x koncentraciju analita izraženu u μM). Donji limiti detekcije (eng. the lowest limit of detection – LLOD) i kvantifikacije (engl. *the lowest limit of quantification* – LLOQ) su procijenjeni statistički (standardna greška predviđene y-vrijednosti za svaki x iz regresije – STEYX). Kalkulacija je izvršena na osnovu standardne devijacije odgovora i nagiba definisanih kalibracionih krivih ($3 \times \text{STDEV}$ konc/nagib za LLOD i $10 \times \text{STDEV}$ konce/nagib za LLOQ). Limiti detekcije i kvantifikacije iznose $0,18 \mu\text{M}$ i $0,56 \mu\text{M}$ za GSH, te $0,52 \mu\text{M}$ i $1,58 \mu\text{M}$ za GSSG.

Preciznost i tačnost: Dva testa su potvrdila preciznost metode, koja je izražena kao koeficijent varijacije (C.V.) Analiza istog supernatanta iz tkiva jetre, 5 puta tokom istog dana, je pokazala preciznost izraženu C.V. ispod 2,56% za GSH i ispod 1,17% za GSSG, na 3 odabrana koncentraciona nivoa. Analiza istog supernatanta iz tkiva jetre, jednom dnevno tokom 5 uzastopnih dana, je pokazala preciznost izraženu C.V. ispod 4,7% za GSH i ispod 2,5% za GSSG.

Tačnost, izražena kao procenat odnosa razlike između izmjerene i očekivane (teoretske) koncentracije analita (% bias), ima vrijednost ispod 2% (Tabela 1).

Tabela 1. Tačnost i preciznost mjerenja sadržaja GSH i GSSG u homogenatima tkiva jetre *Wistar* pacova.

Parametri	GSH			GSSG		
Tačnost						
Pojačana koncentracija (μM)	25	50	100	25	50	100
Izmjerena koncentracija (μM)	25.45 ± 0.65	50.44 ± 0.47	99.58 ± 1.23	25.14 ± 0.29	49.32 ± 0.22	98.18 ± 0.37
Bias (%)	1,8	0,88	-0,42	0,56	-1,36	-1,82
Preciznost						
Isti dan C.V. (%)	2,56	0,94	1,24	1,17	0,45	0,38
Različiti dani C.V. (%)	4,7	1,4	1,8	2,5	1,2	0,99

Homogenati tkiva jetre *Wistar* pacova su pojačani (*spiked*) sa određenim volumenom standardnog rastvora kako bi se dobile finalne koncentracije 25, 50 i $100 \mu\text{M}$, za GSH i GSSG. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri odabrana homogenata tkiva jetre.

Studija stabilnosti: Stabilnost GSH i GSSG, u homogenatima tkiva jetre *Wistar* pacova, je testirana u odnosu na različitu temperaturu i vrijeme čuvanja, na 3 odabrana koncentraciona nivoa. Uzorci su podvrgnuti sljedećim uslovima: a) 1 i 4 sata čuvanja na sobnoj temperaturi (uzorci su ostavljeni u autosempleru HPLC aparata); b) 24 sata na 4°C u hladnjaku; i c) 24 sata na -20°C . Stabilnost GSH i GSSG u uzorcima je izražena kao procenat smanjenja površina ispod pikova GSH i GSSG pri određenim testiranim uslovima.

Zapaženo je da se stabilnost GSH i GSSG u uzorcima ne mijenja značajno tokom čuvanja 4 sata na sobnoj temperaturi, dok postoji razlika kada se uzorci čuvaju 24 sata na 4 °C i -20 °C. Ukoliko su uzorci čuvani na -20 °C ne dolazi do smanjenja površina ispod pikova GSH i GSSG, dok temperatura od 4 °C dovodi do smanjenja površina ispod pikova do 2,93% za GSH i do 7,6% za GSSG (Tabela y).

Tabela 2. Stabilnost GSH i GSSG u homogenatima tkiva jetre *Wistar* pacova pri različitim uslovima čuvanja.

Stabilnost	GSH			GSSG		
	25	50	100	25	50	100
Pojačana koncentracija (µM)	25	50	100	25	50	100
Stabilnost na sobnoj temperaturi 1 sat (% smanjenja površine)	/	/	/	/	/	/
Stabilnost na sobnoj temperaturi 4 sata (% smanjenja površine)	/	0.27	/	/	0.99	/
Stabilnost na 4 °C 24 sata (% smanjenja površine)	1.37	2.93	0.47	7.6	2.33	1.49
Stabilnost na -20 °C 24 sata (% smanjenja površine)	/	/	/	/	/	/

Homogenati tkiva jetre *Wistar* pacova su pojačani (*spiked*) sa određenim volumenom standardnog rastvora kako bi se dobile finalne koncentracije 25, 50 i 100 µM, za GSH i GSSG.

Kako bi se spriječili mogući gubitak sadržaja GSH i procjena većeg od stvarnog sadržaja GSSG za vrijeme pripreme uzoraka, deproteinizacija kiselinom se sprovodi neposredno nakon skupljanja uzoraka. Nakon centrifugiranja izdvojeni supernatanti se odmah analiziraju ili čuvaju na -20 °C do analize. Tako čuvani uzorci su pokazali dobru reproducibilnost i nakon mjesec dana čuvanja, ali analize neposredno nakon pripreme supernatanta su pokazale bolju hromatografsku separaciju i oštrinu pikova.

4.2. TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA I/ILI ETANOLA NA JETRU WISTAR PACOVA

4.2.1. Efekti kadmijuma i/ili etanola na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre *Wistar* pacova

Prirast tjelesne mase životinja prikazan je u Prilogu 1. Vrijednosti parametara funkcije jetre prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Parametri funkcije jetre u plazmi *Wistar* pacova *i.p.* izloženih Cd i/ili *per os* etanolu.

Grupa	Parametri	
	AST (U/L)	ALT (U/L)
kontrola	148 ± 15,8	27 ± 0,6
Cd ₁₋₁₀	168,5 ± 12,4 ¥*	32,5 ± 4,6
Cd ₁₋₂₁	184 ± 8,2 ¥**	42,3 ± 3,3 ¥***
Cd ₁₋₃₁	230,8 ± 13,8 ¥***	43,5 ± 8,2 ¥***
Cd ₁₋₄₂	230,2 ± 31,7 ¥***	46 ± 3,2 ¥***
A ₁₋₁₀	143,8 ± 4,4	42,2 ± 3,5 ¥***
A ₁₋₂₁	141,2 ± 11,1	43,7 ± 6,4 ¥***
A ₁₋₁₀ /Cd ₁₋₁₀	148,3 ± 8,4	33 ± 2,6 ¥*
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₂₁	195,5 ± 20,6 ¥***; #**	42,5 ± 6,2 ¥***

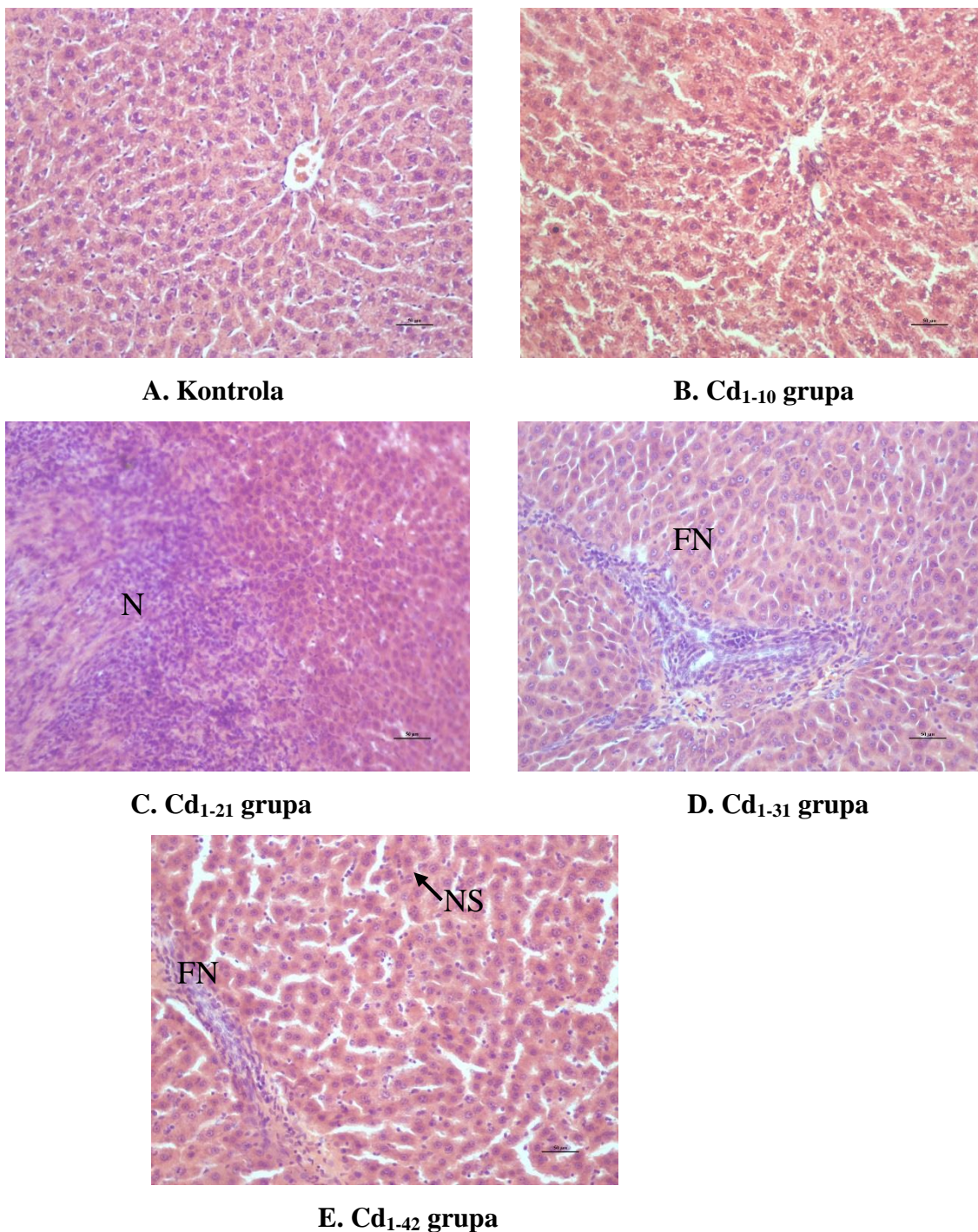
Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za 6 uzoraka (n = 6); oznake za razlike između grupa: Cd, A i A/Cd grupe vs. kontrolna grupa (¥), A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ vs. Cd₁₋₂₁ (£) i vs. A₁₋₂₁ (#); jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: *(p<0.05), ** (p<0.001), *** (p<0.0001); oznake 10, 21, 31 i 42 odnose se na dužinu ekspozicije.

Cd je doveo do kontinuiranog povećanja aktivnosti enzima AST i ALT u odnosu na kontrolnu grupu. Subakutna ekspozicija (21 dan) rezultirala je povećanjem aktivnosti od 24% i 57%, dok je ekspozicija tokom 42 dana dovela do povećanja aktivnosti od 56% i 70%, za AST odnosno ALT.

Ekspozicija etanolu tokom 21 dana rezultirala je povećanjem aktivnosti enzima ALT od 62%. Koekspozicija Cd i etanola je dovela do povećanja aktivnosti AST od 32% nakon 21 dana, što nije značajna razlika u odnosu na ekspoziciju samo Cd tokom istog perioda, dok je povećanje aktivnosti ALT od 57% jednako kao i nakon ekspozicije samo Cd, bez unosa etanola.

Histopatološkom analizom isječaka tkiva jetre pacova iz kontrolne grupe nisu uočena odstupanja od normalne histološke građe (očuvana normalna mikroarhitektura jetre) (Slika 3A.). Hepatociti su radijalno raspoređeni, jedra jasno uočljiva, a sinusoidni kapilari stisnuti i slabo vidljivi.

Izgled presjeka tkiva jetre nakon subakutne/subhronične ekspozicije Cd dat je na Slici 3. gdje su prikazane samo karakteristične promjene.

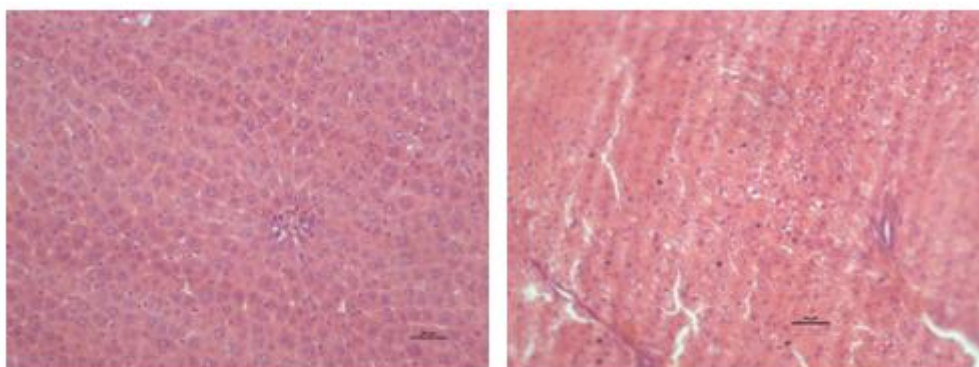


Slika 3. Presjek tkiva jetre pacova kontrolne grupe i grupa subakutno/subhronično tretiranih kadmijumom.

A. kontrolna grupa – radijalno raspoređeni hepatociti i očuvana normalna arhitektura jetre; **B.** Cd₁₋₁₀ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 10 dana) – Diskretna infiltracija parenhima neutrofilima (N); **C.** Cd₁₋₂₁ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 21 dana) – infiltracija neutrofila (N) i fokalna nekroza hepatocita (FN); **D.** Cd₁₋₃₁ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 31 dana) – značajna infiltracija parenhima neutrofilima (N) i neutrofilna infiltracija sinusoida (NS) **E.** Cd₁₋₄₂ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 42 dana) - fokalna nekroza hepatocita (FN) .

Histopatološkom analizom isječaka tkiva jetre pacova subakutno i subhronično *i.p.* tretiranih Cd (Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₃₁ i Cd₁₋₄₂ grupa), uočena je infiltracija neutrofila koja je znak inflamatornog procesa (Slika 3C, D, E.). Kod Cd₁₋₂₁ grupe vidljivo je narušen morfološki integritet tkiva jetre. Difuzno (panlobularno) u ćelijama jetre vide se svijetli optički prazni prostori koji zauzimaju cijelu ćeliju (makrovezikula) potiskujući jedro ka periferiji. Jedra se dobro boje i uglavnom nisu zaklonjena masnim kapljicama. U toku pripreme preparata mast je ekstrahovana i na tim mjestima se pojavljuju vakuole. Na pojedinim mjestima došlo je i do ruptуре hepatocita sa stvaranjem polijedarnih masnih cista. Vidljiva su i nekrotična mjesta. Mikroarhitektura tkiva jetre kod Cd₁₋₃₁ grupe još uvijek je očuvana. Hepatociti umjereno međusobno disocirani tako da se ističe intertrabekularna mikrovaskulatura. Zapaža se i umjereni peribilijarni celularni infiltrat. Nakon 42 dana tretmana Cd (Cd₁₋₄₂ grupa) uočeno je i uvećanje jetrenih sinusoida i neutrofilna infiltracija sinusoida i fokalna nekroza (Begić i sar., 2017).

Izgled presjeka tkiva jetre nakon subakutne ekspozicije etanolu dat je na Slici 4. gdje su prikazane samo karakteristične promjene.



A. A₁₋₁₀ grupa

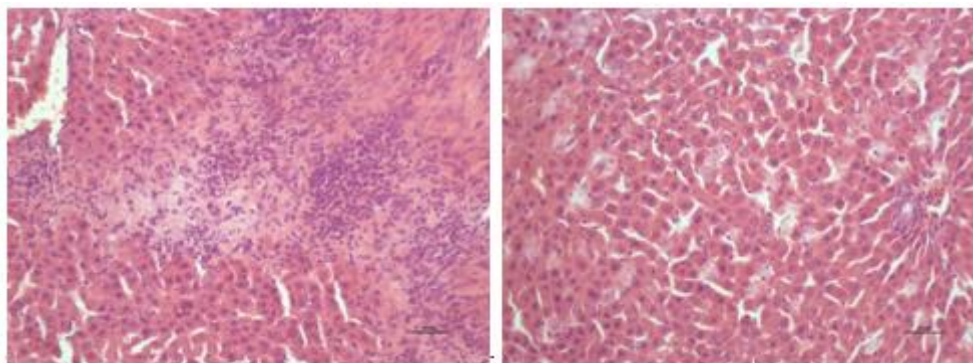
B. A₁₋₂₁ grupa

Slika 4. Presjek tkiva jetre pacova grupa subakutno tretiranih etanolom.

A. A₁₋₁₀ grupa (*per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 10 dana) – uvećani hepatociti i vakuolizacija citoplazme; **B.** A₁₋₂₁ grupa (*per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana) – uvećani hepatociti.

Histopatološkom analizom isječaka tkiva jetre pacova subakutno *per os* tretiranih etanolom uočeno je uvećanje hepatocita (A₁₋₁₀ grupa), koji su poprimili nepravilan oblik i sadrže vakuole u citoplazmi (Slika 4A.). U pojedinim hepatocitima vakuole zauzimaju gotovo cijelu citoplazmu. Jedra su centralno pozicionirana i smanjenog obima, dok su pojedini hepatociti bez jedra. Trabekularna građa jetrenog režnjića je teže uočljiva i sinusoidni kapilari su potisnuti uvećanim hepatocitima. Kod A₁₋₂₁ grupe hepatociti su također uvećani ali su zadržali zrakasti raspored u lobulusu (Slika 4B.). Citoplazma ima mutan izgled (sitno-zrnast) sa centralno postavljenim vezikularnim jedrom.

Izgled presjeka tkiva jetre nakon subakutne kombinovane ekspozicije Cd i etanolu dat je na Slici 5. gdje su prikazane samo karakteristične promjene.



A. A₁₋₁₀/Cd₁₋₁₀ grupa

B. A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupa

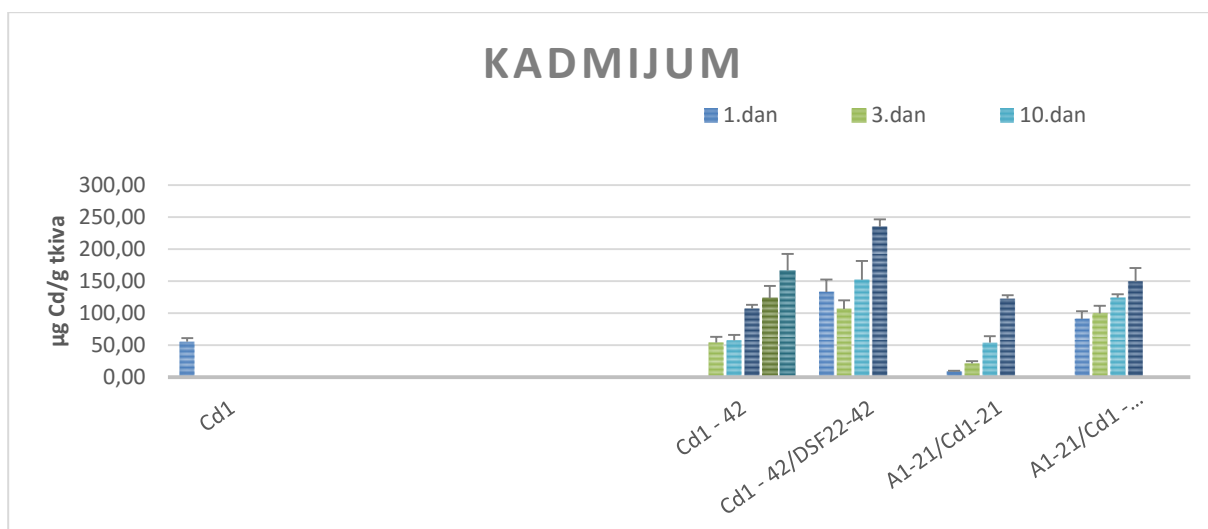
Slika 5. Presjek tkiva jetre pacova grupa subakutno kombinovano tretiranih kadmijumom i etanolom.

A. A₁₋₁₀/Cd₁₋₁₀ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan + *per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 10 dana) – opsežna infiltracija tkiva neutrofila i uvećani hepatociti; **B.** A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan + *per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana) – hemoragija u centralnoj veni.

Histopatološkom analizom isječaka tkiva jetre pacova nakon 10 dana subakutne kombinovane ekspozicije Cd i etanolu uočena je značajna infiltracija neutrofila (Slika 5A.), kao znak započetog inflamatornog procesa. Histološku sliku karakteriše nalaz supramilijarnih ognjišta u kojima su hepatociti pretvoreni u bezstrukturnu masu-detritus, sa ostacima jedara i polimorfnim celularnim infiltratima. Okolni hepatociti su edematozni. Nakon 21 dana kombinovane ekspozicije histopatološki nalaz pokazuje normalnu mikroarhitekturu tkiva jetre (jasno se vide hepatociti zrakasto raspoređeni i očuvana jedra). Centralna vena je umjereno ispunjena eritrocitima.

4.2.2. Koncentracija kadmijuma u jetri

Depozicija Cd u jetri je značajna tek nakon 21 dana ekspozicije Cd (Cd₁₋₂₁: 92%; Cd₁₋₃₁: 122%; Cd₁₋₄₂: 198% iznad vrijednosti Cd₁ grupe). Kombinovana ekspozicija Cd i etanola rezultira većom depozicijom Cd u jetri nakon 21 dana u poređenju sa depozicijom usljed ekspozicije isključivo Cd (120% iznad vrijednosti Cd₁ grupe) (Grafik 1, Prilog 2: Tabela 1).



Grafik 1. Sadržaj kadmijuma u jetri *Wistar* pacova.

Kadmijum ($\mu\text{g Cd/g tkiva}$) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa Cd₁ grupom; β – poređenje sa Cd₁₋₂₁ grupom; μ – poređenje sa Cd₁₋₄₂ grupom i α – poređenje sa A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) i *** ($p < 0,0001$).

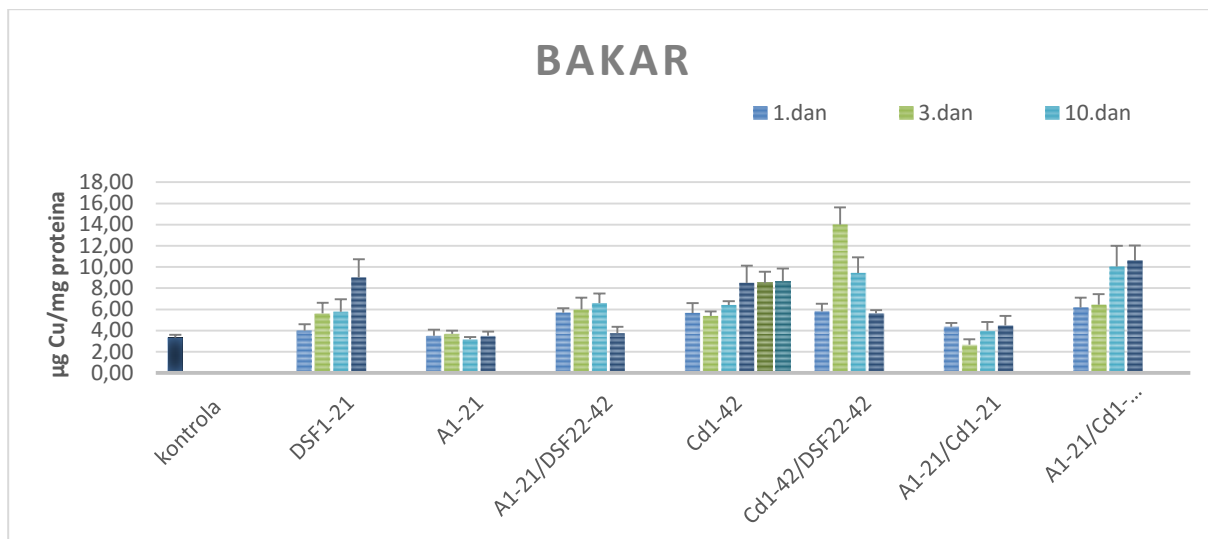
Kombinovana ekspozicija Cd i DSF rezultira značajno visokom depozicijom Cd u jetri. Sadržaj Cd je po završetku tretmana za 321% iznad vrijednosti Cd₁ grupe, što je i značajno iznad vrijednosti u poređenju sa Cd₁₋₄₂ grupom (Grafik 1, Prilog 2: Tabela 1).

Kombinovana ekspozicija Cd, etanola i DSF po završetku tretmana rezultira depozicijom Cd koja je za 168% iznad vrijednosti Cd₁ grupe, što je ujedno i značajno iznad vrijednosti zabilježene nakon koekspozicije Cd i etanola (Grafik 1, Prilog 2: Tabela 1).

4.2.3. *Efekt kadmijuma i/ili etanola na koncentraciju bioelemenata u jetri*

4.2.3.1. *Efekat kadmijuma i/ili etanola na koncentraciju bakra*

Ekspozicija Cd uzrokovala je porast koncentracije Cu u jetri (Cd₁₋₂₁: 156%; Cd₁₋₄₂: 161% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 2, Prilog 2: Tabela 2), dok nije zabilježen efekat na koncentraciju Cu usljed ekspozicije etanolu. Kombinovana ekspozicija Cd i etanola dovela je do porasta koncentracije Cu po završetku tretmana tek za 35% iznad kontrolne vrijednosti, što je značajno manji porast u odnosu na Cd₁₋₂₁ grupu (Grafik 2, Prilog 2: Tabela 2).

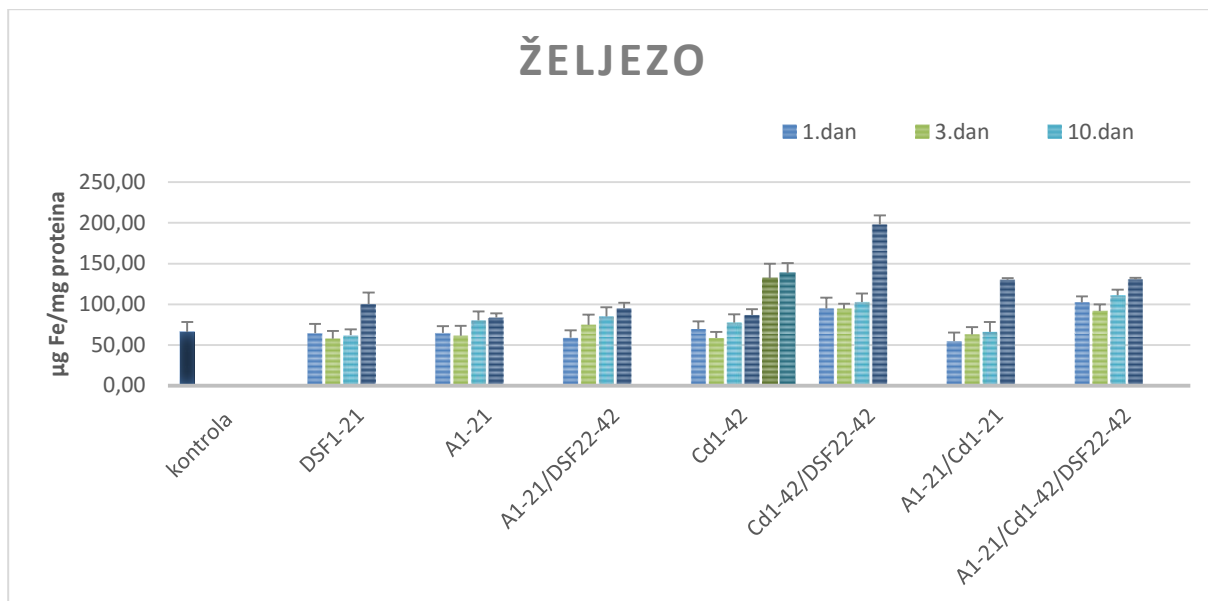


Grafik 2. Sadržaj bakra u jetri *Wistar* pacova.

Bakar ($\mu\text{g Cu/g tkiva}$) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

4.2.3.2. Efekat kadmijuma i/ili etanola na koncentraciju željeza

Značajan porast koncentracije Fe u jetri usljed ekspozicije Cd javlja se tek nakon 21 dana tretmana (Cd_{1-21} : 32%; Cd_{1-31} : 100% i Cd_{1-42} : 110% iznad kontrolne vrijednosti), kao i usljed ekspozicije etanolu (A_{1-21} : 27 % iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 3, Prilog 2: Tabela 3). Značajna promjena sadržaja Fe i usljed kombinovane ekspozicije Cd i etanola nastaje tek nakon 21 dana tretmana (97% iznad kontrolne vrijednosti), i zabilježeni porast je značajno veći u odnosu na Cd_{1-21} i A_{1-21} grupu (Grafik 3, Prilog 2: Tabela 3).

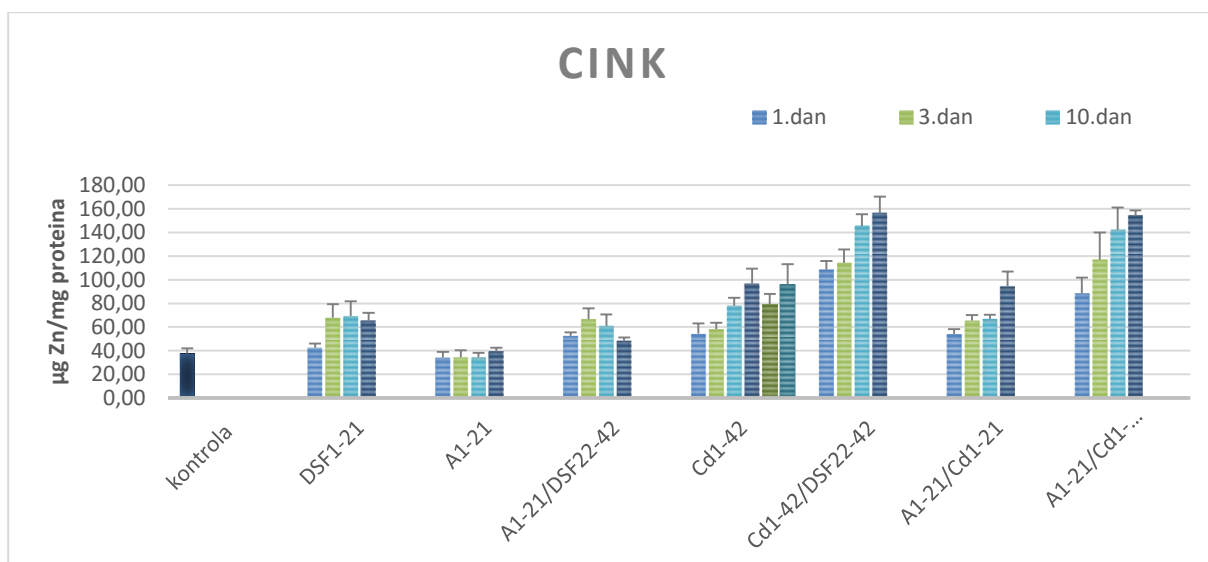


Grafik 3. Sadržaj željeza u jetri *Wistar* pacova.

Željezo ($\mu\text{g Fe/g tkiva}$) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

4.2.3.3. Efekat kadmijuma i/ili etanola na koncentraciju cinka

Ekspozicija Cd dovela je do stalnog porasta koncentracije Zn u jetri (Cd_{1-21} : 157%; Cd_{1-42} : 156% iznad kontrolne vrijednosti), dok ekspozicija etanolu nije pokazala značajan efekat (Grafik 4, Prilog 2: Tabela 4). Kombinovana ekspozicija Cd i etanola takođe uzrokuje stalan porast koncentracije Zn, čija je vrijednost po završetku tretmana za 151% iznad kontrolne vrijednosti, što je u nivou vrijednosti Cd_{1-21} grupe, a značajno iznad vrijednosti A_{1-21} grupe (Grafik 4, Prilog 2: Tabela 4).

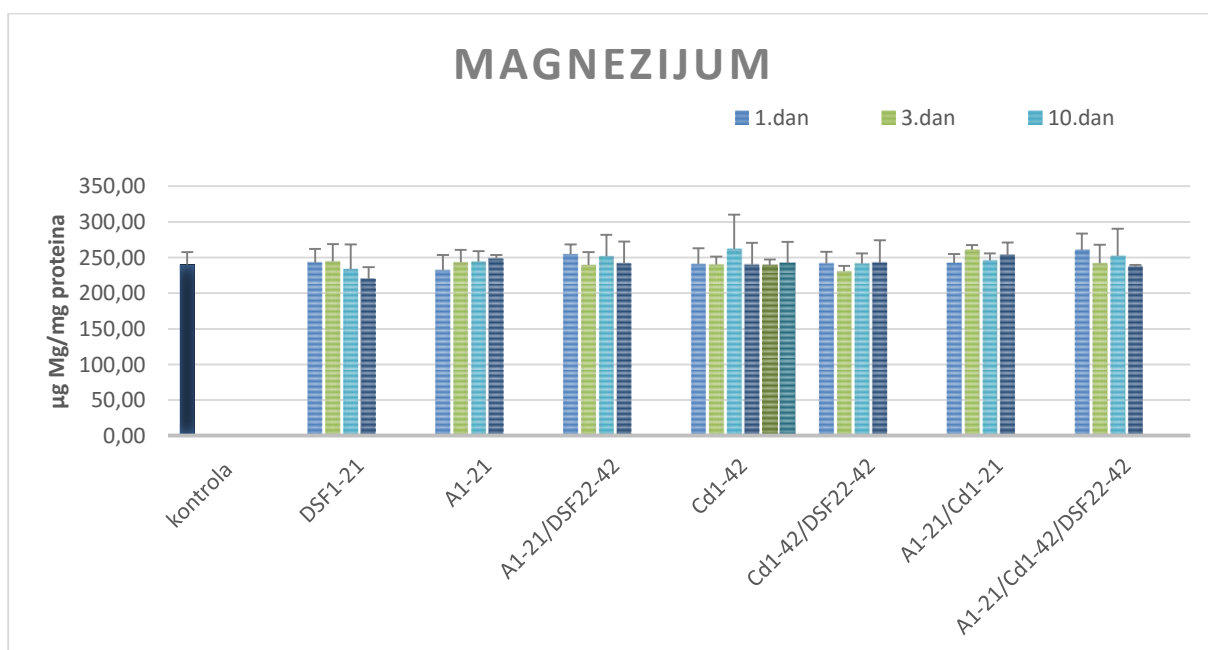


Grafik 4. Sadržaj cinka u jetri Wistar pacova.

Cink ($\mu\text{g Zn/g tkiva}$) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

4.2.3.4. Efekat kadmijuma i/ili etanola na koncentraciju magnezijuma

Ekspozicija isključivo Cd ili etanolu ili kombinovana ekspozicija Cd i etanola nije pokazala efekat na koncentraciju Mg u jetri (Grafik 5, Prilog 2: Tabela 5).

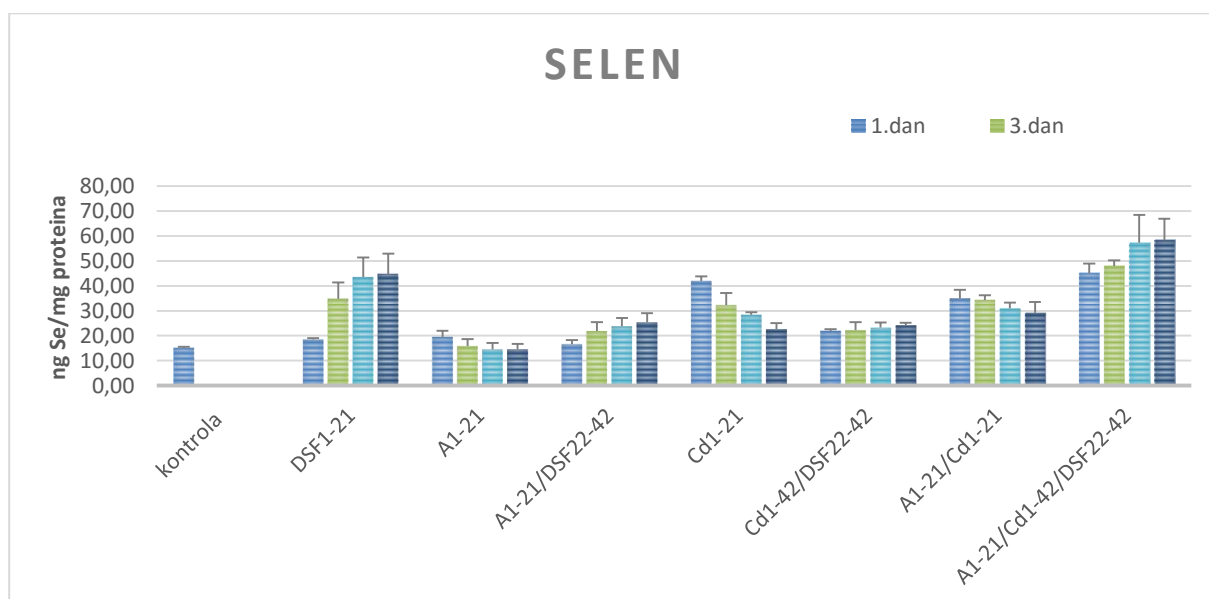


Grafik 5. Sadržaj magnezijuma u jetri *Wistar* pacova.

Magnezijum ($\mu\text{g Mg/g}$ tkiva) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$) i ** ($p < 0,001$).

4.2.3.5. Efekat kadmijuma i/ili etanola na koncentraciju selena

Ekspozicija Cd je dovela do porasta koncentracije Se u jetri za 175% iznad kontrolne vrijednosti već nakon 1. dana tretmana, i potom u nastavku tretmana iako sadržaj Se postepeno opada, nakon 21 dana ekspozicije ostaje za 48% iznad kontrolne vrijednosti. Uticaj etanola na sadržaj Se zabilježen je isključivo nakon 1. dana tretmana (29% iznad kontrolne vrijednosti), dok je u nastavku tretmana koncentracija Se u nivou kontrolne vrijednosti (Grafik 6, Prilog 2: Tabela 6). Kombinovana ekspozicija Cd i etanola takođe na početku tretmana dovodi do porasta koncentracije Se (129% iznad kontrolne vrijednosti), i potom sadržaj Se postepeno opada do vrijednosti od 92% iznad kontrolne nakon 21 dana koekspozicije (Grafik 6, Prilog 2: Tabela 6).



Grafik 6. Sadržaj selena u jetri *Wistar* pacova.

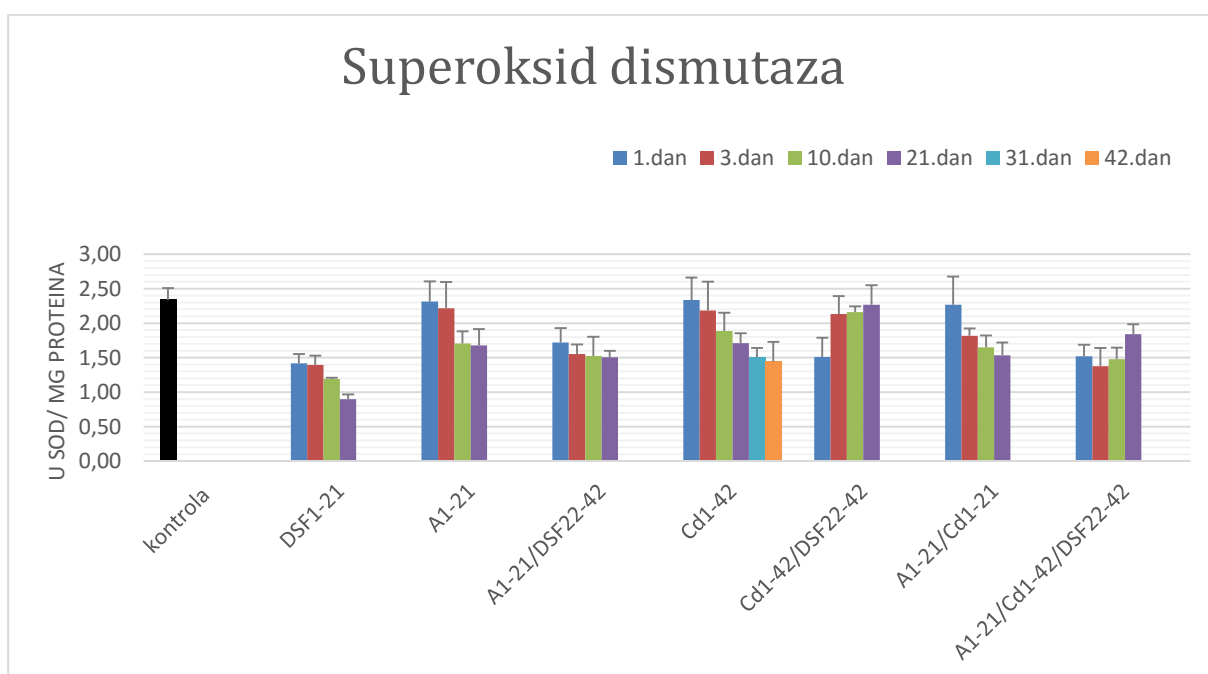
Selen (ng Se/g tkiva) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$) i ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

4.2.4. Efekti kadmijuma i/ili etanola na parametre oksidativnog stresa u jetri

4.2.4.1. Efekat kadmijuma i/ili etanola na aktivnost superoksidne dismutaze

Ekspozicija Cd dovela je do postepenog smanjnjena aktivnosti SOD u jetri od početka tretmana, iako je redukcija aktivnosti enzima u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statističku značajnost tek od 21. dana (Cd_{1-21} : 27%, Cd_{1-31} : 36% i Cd_{1-42} : 39%) (Grafik 7, Prilog 3: Tabela 1). I ekspozicija etanolu je dovela do postepenog pada aktivnosti SOD od početka tretmana, i data redukcija aktivnosti je značajna od 10. dana (A_{1-10} : 27%, A_{1-21} : 28%) (Grafik 7, Prilog 3: Tabela 1).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola značajno reducira aktivnost SOD već nakon 3. dana tretmana, i po završetku tretmana je aktivnost enzima reducirana za 34% (Grafik 7, Prilog 3: Tabela 1), što nije značajna razlika u odnosu na ekspoziciju samo Cd ili etanolu.



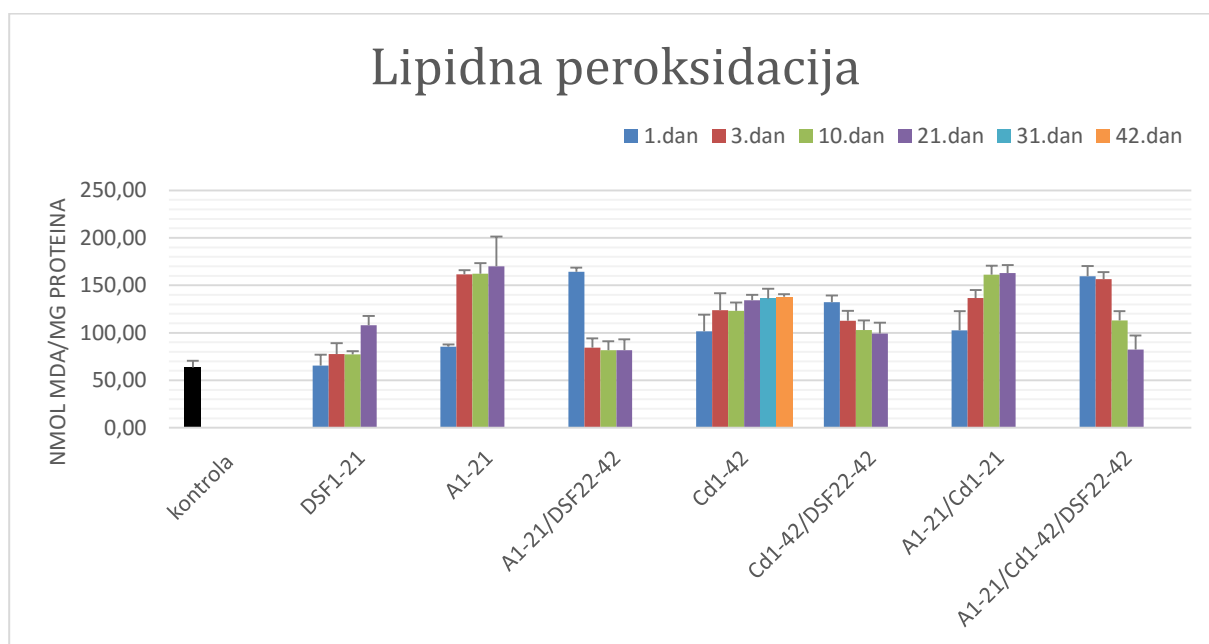
Grafik 7. Aktivnost superoksid dismutaze u jetri *Wistar* pacova.

Parametar antioksidativnog sistema zaštite: aktivnost superoksid dismutaze (U SOD/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

4.2.4.2. Efekat kadmijuma i/ili etanola na lipidnu peroksidaciju

Akutna, subakutna i subhronična ekspozicija Cd uzrokuje stalan porast nivoa MDA u jetri (Cd₁₋₂₁: 111%; Cd₁₋₄₂: 117% iznad kontrolne vrijednosti), kao i akutna i subakutna ekspozicija etanolu (A₁₋₂₁: 167% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 8, Prilog 3: Tabela 2).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola pokazuje isti trend i po završetku tretmana je nivo MDA za 156% iznad kontrolne vrijednosti, što ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na A₁₋₂₁ grupu, ali je značajna razlika u odnosu na Cd₁₋₂₁ grupu (Grafik 8, Prilog 3: Tabela 2).



Grafik 8. Lipidna peroksidacija u jetri *Wistar* pacova.

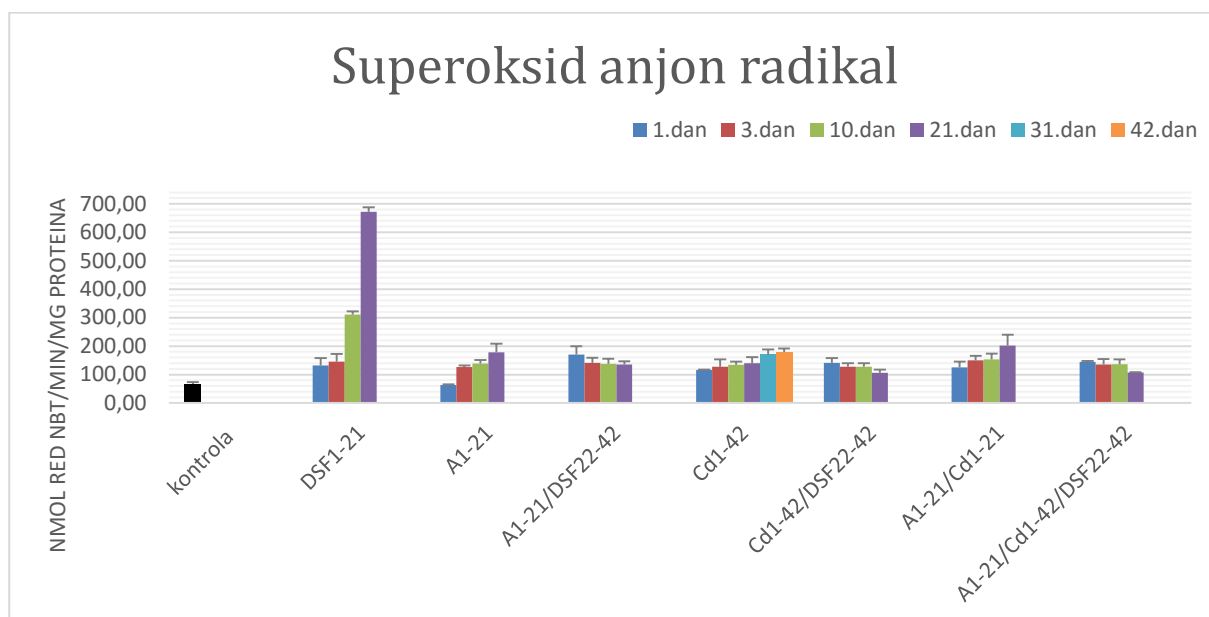
Parametar oksidativnog statusa: malondialdehid (nmol MDA/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A₁₋₂₁ grupom; β – poređenje sa Cd₁₋₂₁ grupom; μ – poređenje sa Cd₁₋₄₂ grupom i α – poređenje sa A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * (p < 0,05), ** (p < 0,005) i *** (p < 0,0001).

4.2.4.3. Efekat kadmijuma i/ili etanola na nivo superoksid anjon radikala

Akutna, subakutna i subhronična ekspozicija Cd dovodi do stalnog porasta nivoa O₂⁻ u jetri (Cd₁₋₂₁: 107%; Cd₁₋₄₂: 166% iznad kontrolne vrijednosti), kao i akutna i subakutna ekspozicija etanolu (A₁₋₂₁: 166% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 9, Prilog 3: Tabela 3).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola pokazuje isti trend i po završetku tretmana gde je nivo O₂⁻ za 201% iznad kontrolne vrijednosti, što ne pokazuje statistički značajnu razliku u

odnosu na A₁₋₂₁ grupu, ali je značajna razlika u odnosu na Cd₁₋₂₁ grupu (Grafik 9, Prilog 3: Tabela 3).



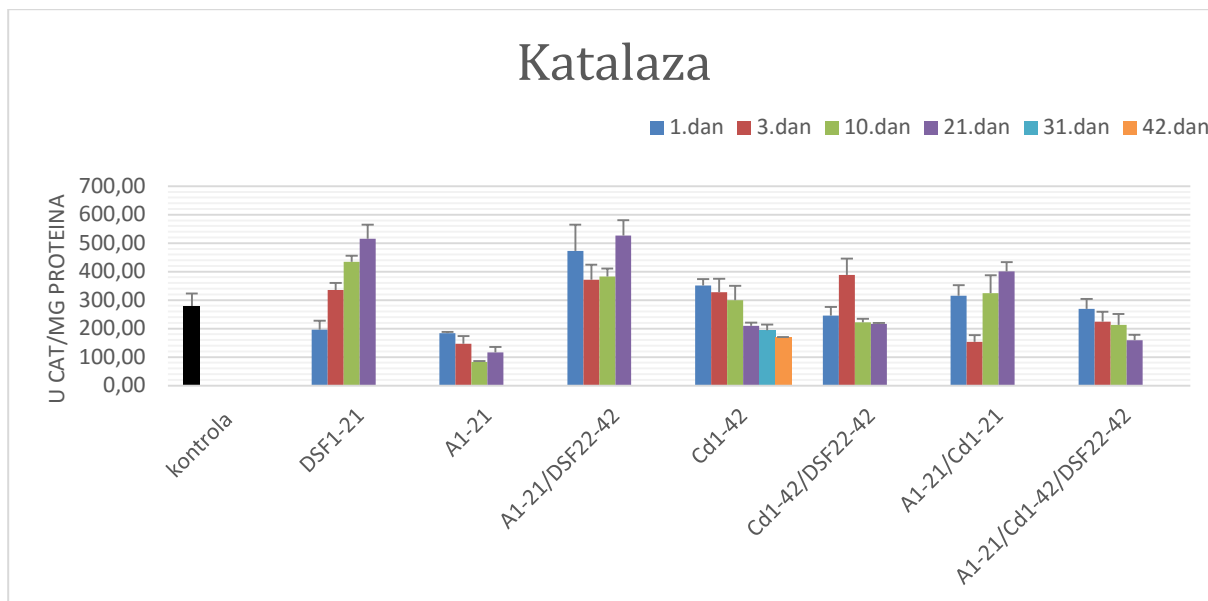
Grafik 9. Superoksid anjon radikal u jetri *Wistar* pacova.

Parametar oksidativnog statusa: superoksid anjon radikal (nmol red NBT/min/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A₁₋₂₁ grupom; β – poređenje sa Cd₁₋₂₁ grupom; μ – poređenje sa Cd₁₋₄₂ grupom i α – poređenje sa A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,01$) i ** ($p < 0,0001$).

4.2.4.4. *Efekat kadmijuma i/ili etanola na aktivnost katalaze*

Ekspozicija Cd prvobitno je dovela do povećane aktivnosti CAT u jetri, koja potom postepeno opada (Cd₁₋₂₁: 25%; Cd₁₋₄₂: 40% ispod kontrolne vrijednosti), dok je ekspozicija etanolu dovela do smanjenja aktivnosti enzima od početka tretmana (A₁₋₂₁: 58% ispod kontrolne vrijednosti) (Grafik 10, Prilog 3: Tabela 4).

Kombinovana ekspozicija dovela je, suprotno ekspoziciji isključivo Cd ili etanolu, do porasta aktivnosti CAT, čija je vrijednost po završetku tretmana za 44% iznad kontrolne vrijednosti i značajno se razlikuje u odnosu na A₁₋₂₁ i Cd₁₋₂₁ grupu (Grafik 10, Prilog 3: Tabela 4).



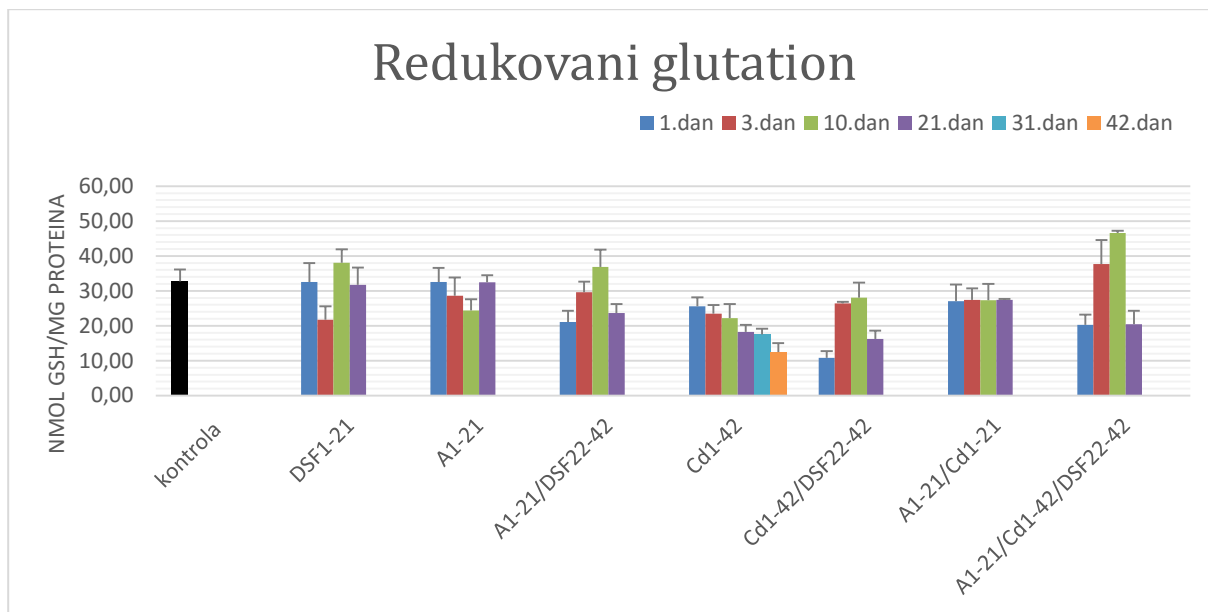
Grafik 10. Aktivnost katalaze u jetri *Wistar* pacova.

Parametar antioksidativnog sistema zaštite: aktivnost katalaze (U CAT/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A₁₋₂₁ grupom; β – poređenje sa Cd₁₋₂₁ grupom; μ – poređenje sa Cd₁₋₄₂ grupom i α – poređenje sa A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

4.2.4.5. Efekat kadmijuma i/ili etanola na glutationski ciklus

Akutna, subakutna i subhronična ekspozicija Cd dovela je do postepenog pražnjenja rezervi GSH u jetri (Cd₁₋₂₁: 44%; Cd₁₋₄₂: 62% ispod kontrolne vrijednosti), dok je nivo GSH usljed ekspozicije etanolu ostao u visini kontrolnih vrijednosti po završetku tretmana (Grafik 11, Prilog 3: Tabela 5).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola nije uzrokovala značajno pražnjenje rezervi GSH u jetri (Grafik 11, Prilog 3: Tabela 5).

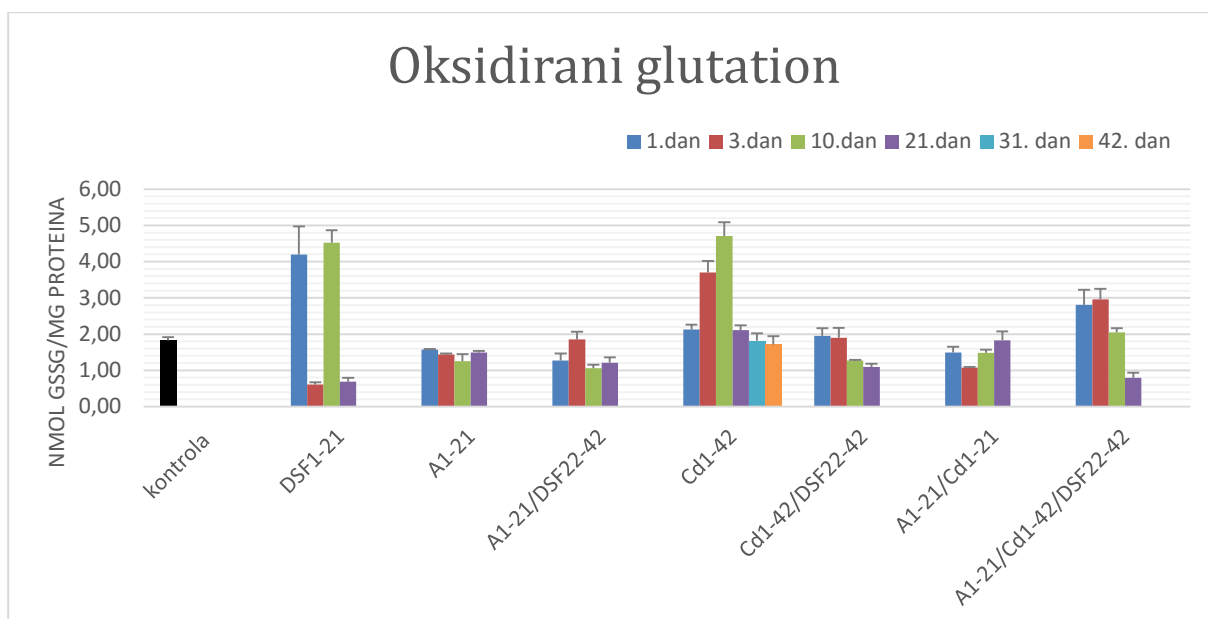


Grafik 11. Redukovani glutation u jetri *Wistar* pacova.

Parametar antioksidativnog sistema zaštite: redukovani glutation (nmol GSH/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A₁₋₂₁ grupom; β – poređenje sa Cd₁₋₂₁ grupom; μ – poređenje sa Cd₁₋₄₂ grupom i α – poređenje sa A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

Ekspozicija Cd dovela je prvobitno do postepenog porasta nivoa GSSG do 10. dana tretmana (157% iznad kontrolne vrijednosti), nakon čega nivo GSSG opada u nastavku tretmana do nivoa kontrolnih vrijednosti. Usljed ekspozicije etanolu nivo GSSG opada ispod kontrolnih vrijednosti (A₁₋₂₁: 19%) (Grafik 12, Prilog 3: Tabela 6).

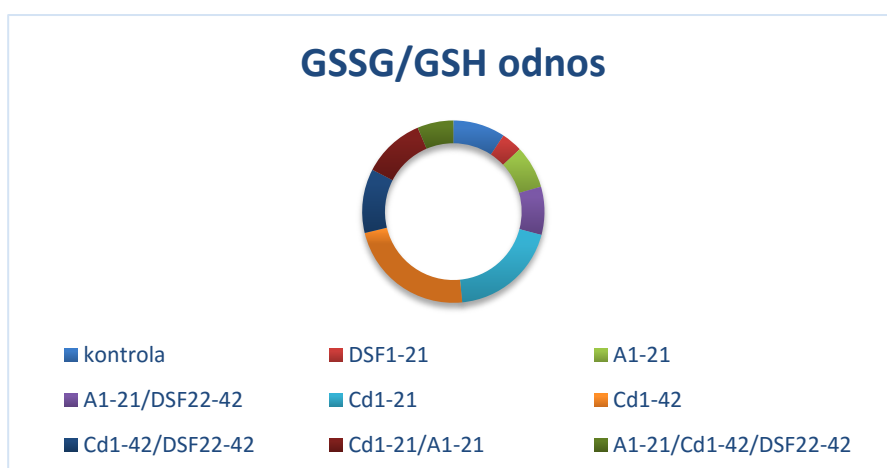
Kombinovana ekspozicija Cd i etanola dovodi prvobitno do smanjenja nivoa GSSG do 10. dana tretmana (19% ispod kontrolne vrijednosti), ali po završetku tretmana GSSG je u nivou kontrolne vrijednosti, odnosno značajno ispod vrijednosti Cd₁₋₂₁ grupe i iznad vrijednosti A₁₋₂₁ grupe (Grafik 12, Prilog 3: Tabela 6).



Grafik 12. Oksidirani glutation u jetri *Wistar* pacova.

Parametar oksidativnog statusa: oksidirani glutation (nmol GSSG/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A₁₋₂₁ grupom; β – poređenje sa Cd₁₋₂₁ grupom; μ – poređenje sa Cd₁₋₄₂ grupom i α – poređenje sa A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * (p < 0,05), ** (p < 0,005) i *** (p < 0,0001).

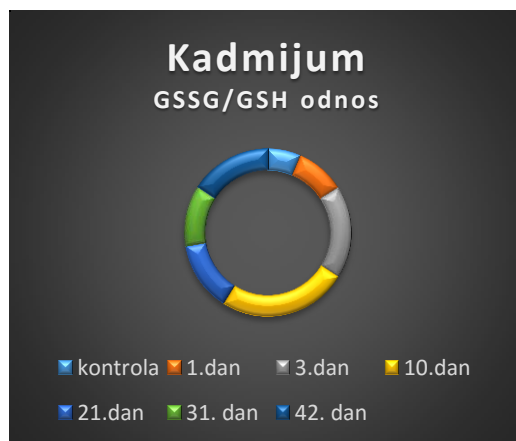
Prikazan je parametar homeostaze glutationa – odnos GSSG/GSH za sve eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolnom grupom (Grafik 13, Prilog 3: Tabela 7).



Grafik 13. Odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova.

Parametar homeostaze glutationa: odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6).

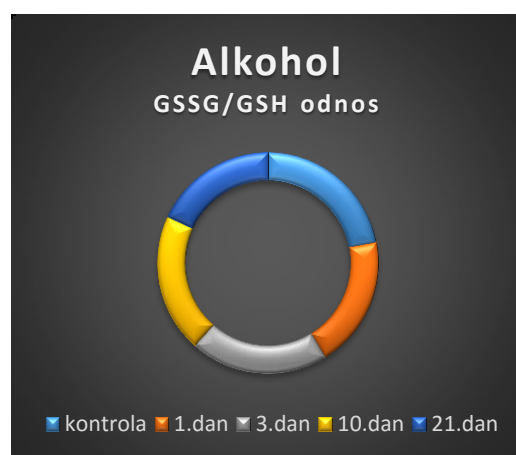
Odnos GSSG/GSH prikazan je i kroz vremenski tok tretmana za svaku eksperimentalnu grupu. Ekspozicija Cd uzrokuje povećanje u odnosu GSSG/GSH koje je najviše 10. dana tretmana (290% iznad kontrolne vrijednosti), nakon čega odnos opada iako je po završetku tretmana i dalje za 147% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 14, Prilog 3: Tabela 7).



Grafik 14. Odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova izloženih *i.p.* kadmijumu.

Parametar homeostaze glutationa: odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$).

Ekspozicija etanolu dovodi do smanjenja odnosa GSSG/GSH (A_{1-21} : 18% ispod kontrolne vrijednosti) (Grafik 15, Prilog 3: Tabela 7).



Grafik 15. Odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* etanolu.

Parametar homeostaze glutationa: odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola po završetku tretmana dovodi do porasta u odnosu GSSG/GSH za 19% u odnosu na kontrolnu grupu (Grafik 16, Prilog 3: Tabela 7).

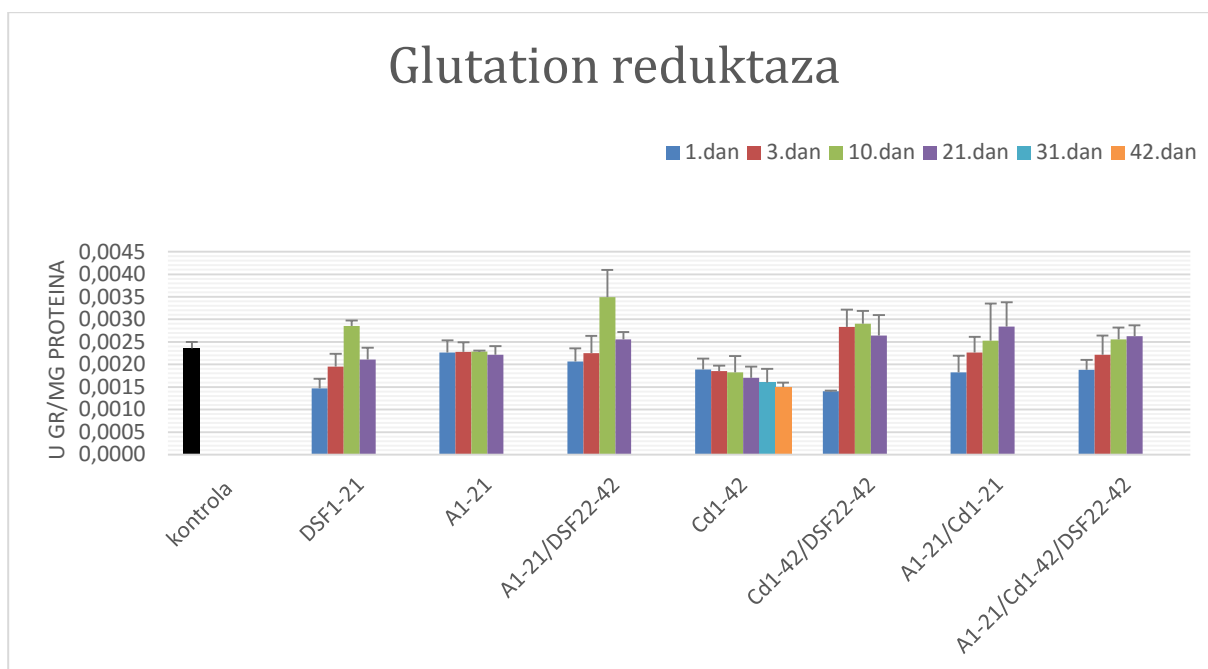


Grafik 16. Odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova izloženih *i.p* kadmijumu i *per os* etanolu.

Parametar homeostaze glutationa: odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6).

Ekspozicija Cd dovela je do smanjenja aktivnosti GR u jetri od početka tretmana (Cd₁₋₂₁: 24%; Cd₁₋₄₂: 37% ispod kontrolne vrijednosti), dok ekspozicija etanolu nije pokazala uticaj na aktivnost enzima (Grafik 17, Prilog 3: Tabela 8).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola nije pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolnu vrijednost enzima, ali je data vrijednost po završetku tretmana značajno iznad vrijednosti u Cd₁₋₂₁ grupi (Grafik 17, Prilog 3: Tabela 8).

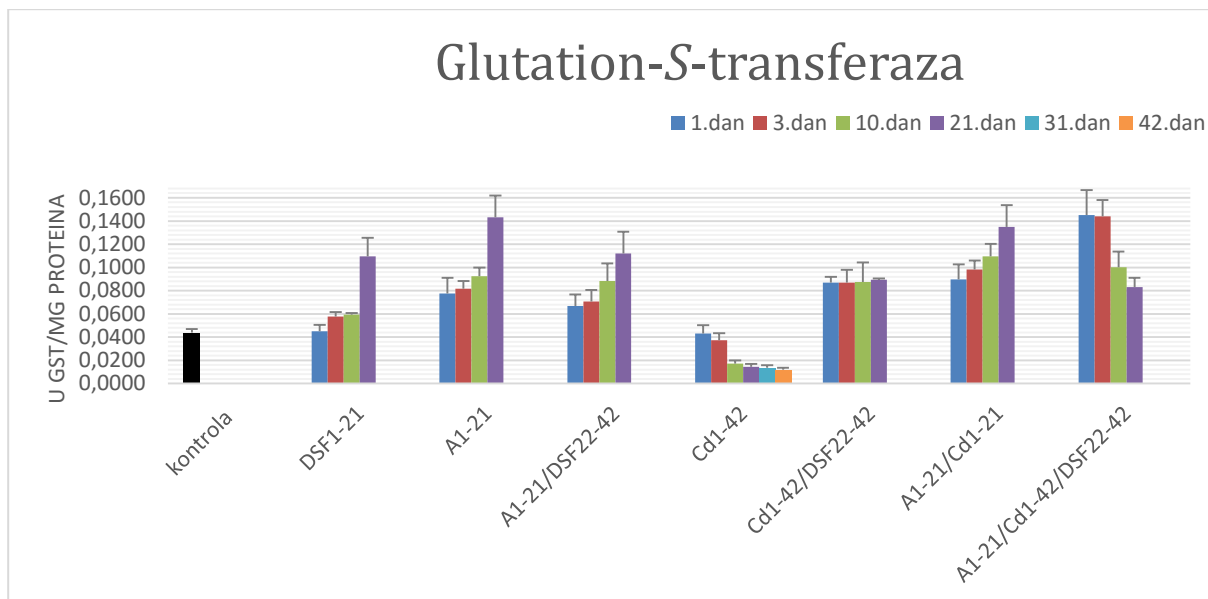


Grafik 17. Aktivnost glutation reduktaze u jetri *Wistar* pacova.

Parametar antioksidativnog sistema zaštite: aktivnost glutation reduktaze (U GR/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) i *** ($p < 0,0001$).

Aktivnost GST u jetri usljed ekspozicije Cd postepeno opada (Cd_{1-21} : 67%; Cd_{1-42} : 73% ispod kontrolne vrijednosti). Nasuprot tome, ekspozicija etanolu dovodi do porasta aktivnosti GST od početka tretmana, i po završetku tretmana je za 226% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 18, Prilog 3: Tabela 9).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola dovodi do stalnog porasta aktivnosti GST i po završetku tretmana je aktivnost enzima za 207% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 18, Prilog 3: Tabela 9).



Grafik 18. Aktivnost glutation-S-transferaze u jetri *Wistar* pacova.

Parametar antioksidativnog sistema zaštite: aktivnost glutation-S-transferaze (U GST/mg proteina) u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Jednofaktorska ANOVA analiza: C – poređenje sa kontrolnom grupom; # - poređenje sa A_{1-21} grupom; β – poređenje sa Cd_{1-21} grupom; μ – poređenje sa Cd_{1-42} grupom i α – poređenje sa A_{1-21}/Cd_{1-21} grupom. Oznake razmatrane statističke značajnosti: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,0001$).

4.3. EFEKTI DISULFIRAMA *PER SE* NA JETRU WISTAR PACOVA

4.3.1. Efekti disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre *Wistar* pacova

Prirast tjelesne mase životinja prikazan je u Prilogu 1. Vrijednosti parametara funkcije jetre prikazani su u Tabeli 4.

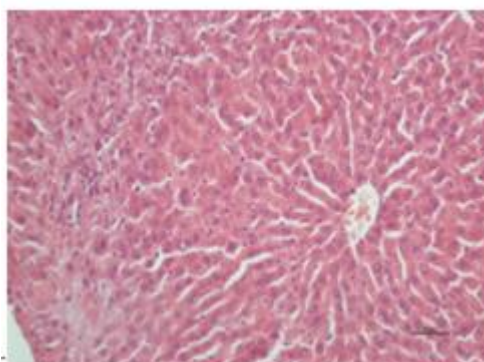
Tabela 4. Parametri funkcije jetre u plazmi *Wistar* pacova *per os* izloženih disulfiramu.

Grupa	Parametri	
	AST (U/L)	ALT (U/L)
kontrola	148 \pm 15,8	27 \pm 0,6
DSF ₁₋₁₀	149 \pm 3,7	34 \pm 3,0 *
DSF ₁₋₂₁	136 \pm 16,3	28,3 \pm 3,3

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija za 6 uzoraka ($n = 6$); jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: *($p < 0,001$); oznake 10 i 21 odnose se na dužinu ekspozicije.

Ekspozicija DSF tokom 21 dana nije dovela do promjene AST aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu. Nivo ALT aktivnosti je povećan za 26% na 10. dan ekspozicije, dok je po završetku tretmana u nivou kontrolne vrijednosti.

Izgled presjeka tkiva jetre nakon subakutne ekspozicije DSF dat je na Slici 6.



DSF₁₋₂₁ grupa

Slika 6. Presjek tkiva jetre pacova grupa subakutno tretiranih disulfiramom.

DSF₁₋₂₁ grupa (*per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan tokom 21 dana) – očuvana normalna mikroarhitektura jetre.

Histopatološka analiza isječaka tkiva jetre pacova nakon subakutne *per os* ekspozicije DSF pokazala je očuvanu normalnu mikroarhitekturu jetre (zrakasto raspoređeni hepatociti u jetrenim lobulusima, međusobno dovoljno udaljeni tako da se sinusoidni kapilari jasno uočavaju) (Slika 6.).

4.3.2. Efekti disulfirama na koncentraciju bioelemenata u jetri

4.3.2.1. Efekat disulfirama na koncentraciju bakra

Ekspozicija DSF dovela je do postepenog porasta koncentracije Cu u jetri, i po završetku tretmana je vrijednost Cu za 171% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 2, Prilog 2: Tabela 2).

Zbog primjene maslinovog ulja za otapanje DSF, prikazane su i razlike u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je administrirano samo maslinovo ulje (Tabela 5), odnosno efekat maslinovog ulja na sadržaj Cu.

Tabela 5. Bakar u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramom.

Parametar	Cu (µg Cu/mg proteina)			
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan
kontrola fiziološka otopina	3,32 ± 0,28			
kontrola maslinovo ulje	3,65 ± 0,21			
DSF	3,98 ± 0,63	5,63 ± 0,98 ^{¥*} ;µ*	5,76 ± 1,18 ^{¥***} ;µ*	9,0 ± 1,74 ^{¥***} ;µ***

Jednofaktorska ANOVA analiza: ¥ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina; µ – poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirano maslinovo ulje. Vrijednosti su prikazane

kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Oznake razmatrane statističke značajnosti: *($p < 0,05$), **($p < 0,005$) i ***($p < 0,0001$).

4.3.2.2. Efekat disulfirama na koncentraciju željeza

Tretman DSF uzrokuje porast koncentracije Fe u jetri tek nakon 21 dana tretmana ($_{DSF1-21}$: 52% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 3, Prilog 2: Tabela 3).

Zbog primjene maslinovog ulja za otapanje DSF, prikazane su i razlike u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je administrirano samo maslinovo ulje (Tabela 6), odnosno efekat maslinovog ulja na sadržaj Fe.

Tabela 6. Željezo u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramu.

Parametar	Fe ($\mu\text{g Fe/mg proteina}$)			
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan
kontrola fiziološka otopina	66,09 \pm 12,13			
kontrola maslinovo ulje	86,17 \pm 4,21			
DSF	64,24 \pm 11,65 μ^*	57,58 \pm 9,51 μ^{**}	62,13 \pm 6,87 μ^*	100,11 \pm 14,31 μ^{***}

Jednofaktorska ANOVA analiza: μ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina; μ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirano maslinovo ulje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Oznake razmatrane statističke značajnosti: *($p < 0,01$) i **($p < 0,0001$).

4.3.2.3. Efekat disulfirama na koncentraciju cinka

Ekspozicija DSF dovela je do stalnog porasta koncentracije Zn u jetri, čija je vrijednost po završetku tretmana za 75% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 4, Prilog 2: Tabela 4).

Zbog primjene maslinovog ulja za otapanje DSF, prikazane su i razlike u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je administrirano samo maslinovo ulje (Tabela 7), odnosno efekat maslinovog ulja na sadržaj Zn.

Tabela 7. Cink u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramu.

Parametar	Zn ($\mu\text{g Zn/mg proteina}$)			
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan
kontrola fiziološka otopina	37,6 \pm 4,44			
kontrola maslinovo ulje	94,35 \pm 10,53			
DSF	42,58 \pm 3,53 μ^{***}	67,94 \pm 11,44 $\mu^{***}; \mu^*$	69,39 \pm 12,38 $\mu^{***}; \mu^*$	65,67 \pm 6,4 $\mu^{***}; \mu^{**}$

Jednofaktorska ANOVA analiza: μ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina; μ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirano maslinovo ulje. Vrijednosti su prikazane

kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$). Oznake razmatrane statističke značajnosti: *($p < 0,001$) i **($p < 0,0001$).

4.3.2.4. *Efekat disulfirama na koncentraciju magnezijuma*

Ekspozicija DSF nije pokazala efekat na koncentraciju Mg u jetri (Grafik 5, Prilog 2: Tabela 5).

Sadržaj Mg u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirana fiziološka otopina ne razlikuje se značajno u odnosu na nivo u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirano samo maslinovo ulje.

4.3.2.5. *Efekat disulfirama na koncentraciju selena*

Ekspozicija DSF dovela je do postepenog porasta koncentracije Se u jetri, čija je vrijednost po završetku tretmana za 194% iznad kontrolne (Grafik 6, Prilog 2, Tabela 6).

4.3.3. *Efekti disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri*

4.3.3.1. *Efekat disulfirama na aktivnost superoksid dismutaze*

Ekspozicija DSF uzrokovala je značajnu redukciju aktivnosti SOD u jetri od početka tretmana. Tretman DSF rezultirao je redukcijom aktivnosti enzima od 62% po završetku tretmana (Grafik 7, Prilog 3: Tabela 1).

Zbog primjene maslinovog ulja za otapanje DSF, prikazane su i razlike u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je administrirano samo maslinovo ulje (Tabela 8), odnosno efekat maslinovog ulja na aktivnost SOD.

Tabela 8. Superoksid dismutaza u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramu.

Parametar	SOD (U SOD/mg proteina)			
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan
kontrola fiziološka otopina	2,34 \pm 0,17			
kontrola maslinovo ulje	1,03 \pm 0,02			
DSF	1,42 \pm 0,14 ^{***;μ**}	1,39 \pm 0,13 ^{***;μ**}	1,19 \pm 0,02 ^{***;μ*}	0,9 \pm 0,07 ^{***}

Jednofaktorska ANOVA analiza: ¥ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina; µ – poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirano maslinovo ulje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Oznake razmatrane statističke značajnosti: *(p < 0,05) i **(p < 0,0001).

4.3.3.2. Efekat disulfirama na lipidnu peroksidaciju

Ekspozicija DSF uzrokovala je značajan porast nivoa MDA u jetri tek nakon 21 dana tretmana (DSF₁₋₂₁: 70% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 8, Prilog 3: Tabela 2).

Prikazane su i razlike u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je administrirano samo maslinovo ulje (Tabela 9), odnosno efekat maslinovog ulja na nivo MDA.

Tabela 9. Malondialdehid u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramu.

Parametar	MDA (nmol MDA/mg proteina)			
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan
kontrola fiziološka otopina	63,58 ± 7,16			
kontrola maslinovo ulje	34,37 ± 4,01			
DSF	65,48 ± 11,51 ^{µ*}	77,79 ± 11,45 ^{µ*}	77,31 ± 3,31 ^{µ*}	107,87 ± 10,04 ^{µ*¥*}

Jednofaktorska ANOVA analiza: ¥ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina; µ – poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirano maslinovo ulje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Oznake razmatrane statističke značajnosti: *(p < 0,0001).

4.3.3.3. Efekat disulfirama na nivo superoksid anjon radikala

Ekspozicija DSF uzrokovala je značajan porast nivoa O₂⁻ u jetri od početka tretmana. Najvišu vrijednost O₂⁻ dostiže nakon 21 dana u poređenju sa svim eksperimentalnim grupama (DSF₁₋₂₁: 899% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 9, Prilog 3: Tabela 3).

Nivo O₂⁻ u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirana fiziološka otopina ne razlikuje se značajno u odnosu na nivo u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirano samo maslinovo ulje.

4.3.3.4. Efekat disulfirama na aktivnost katalaze

Ekspozicija DSF prvobitno je dovela do pada, a potom do povećanja aktivnosti CAT u jetri (DSF₁₋₂₁: 85% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 10, Prilog 3: Tabela 4).

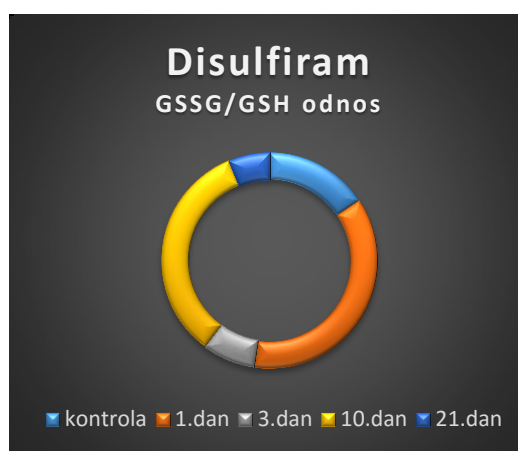
4.3.3.5. Efekat disulfirama na glutationski ciklus

Po završetku tretmana DSF nivo GSH u jetri je u visini kontrolnih vrijednosti (Grafik 11, Prilog 3: Tabela 5). Nivo GSH u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirana fiziološka

otopina ne razlikuje se značajno u odnosu na nivo u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirano samo maslinovo ulje.

Efekat DSF na nivo GSSG u jetri pokazao je izmjene porasta/smanjenja nivoa GSSG tokom tretmana, i po završetku tretmana je za 62% ispod kontrolne vrijednosti (Grafik 12, Prilog 3: Tabela 6). Nivo GSSG u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirana fiziološka otopina ne razlikuje se značajno u odnosu na nivo u jetri kontrolne grupe kojoj je administrirano samo maslinovo ulje.

Ekspozicija DSF uzrokuje izmjene porasta/smanjenja u odnosu GSSG/GSH tokom tretmana i po završetku tretmana je odnos za 60% ispod kontrolne vrijednosti (Grafik 19, Prilog 3: Tabela 7).



Grafik 19. Odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramu.

Parametar homeostaze glutationa: odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$).

Tretman DSF uzrokuje prvobitno smanjenje aktivnosti GR u jetri, a potom pokazuje trend rasta prema kontrolnoj vrijednosti po završetku tretmana (Grafik 17, Prilog 3: Tabela 8). Prikazane su i razlike u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je administrirano samo maslinovo ulje (Tabela 10), odnosno efekat maslinovog ulja na aktivnost GR.

Tabela 10. Glutation reduktaza u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramu.

Parametar	GR (U GR/mg proteina)			
Grupe	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan
kontrola fiziološka otopina	0,0024 ± 0,0001			
kontrola maslinovo ulje	0,0026 ± 0,00008			
DSF	0,0015 ± 0,0002 [¥] ***; ^μ ***	0,002 ± 0,0003 [¥] ; ^μ ***	0,0029 ± 0,0001 [¥] **	0,0021 ± 0,0003 ^μ **

Jednofaktorska ANOVA analiza: ¥ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina; μ – poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirano maslinovo ulje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Oznake razmatrane statističke značajnosti: *(p < 0,05), ***(p < 0,005) i ¥¥¥(p < 0,0001).

Tretman DSF uzrokuje porast aktivnosti GST u jetri (DSF₁₋₂₁: 149% iznad kontrolne vrijednosti) (Grafik 18, Prilog 3: Tabela 9). Prikazane su i razlike u odnosu na kontrolnu grupu kojoj je administrirano samo maslinovo ulje (Tabela 11), odnosno efekat maslinovog ulja na aktivnost GST.

Tabela 11. Glutation-S-transferaza u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* disulfiramu.

Parametar	GST (U GST/mg proteina)			
Grupe	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan
kontrola fiziološka otopina	0,0439 ± 0,0031			
kontrola maslinovo ulje	0,0218 ± 0,0043			
DSF	0,045 ± 0,0057 ^μ **	0,0578 ± 0,0037 [¥] ; ^μ **	0,0594 ± 0,0013 [¥] ; ^μ **	0,1096 ± 0,016 [¥] ***; ^μ **

Jednofaktorska ANOVA analiza: ¥ - poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina; μ – poređenje sa kontrolnom grupom kojoj je administrirano maslinovo ulje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Oznake razmatrane statističke značajnosti: *(p < 0,05) i ¥¥¥(p < 0,0001).

4.4. EFEKTI KOMBINOVANE PRIMJENE ETANOLA I DISULFIRAMA NA JETRU WISTAR PACOVA

4.4.1. Efekti kombinovane primjene etanola i disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre *Wistar* pacova

Prirast tjelesne mase životinja prikazan je u Prilogu 1. Vrijednosti parametara funkcije jetre su prikazani u Tabeli 12.

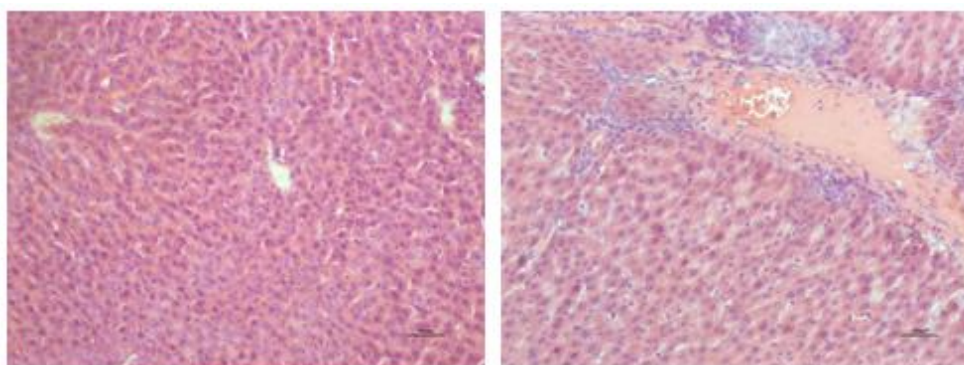
Tabela 12. Parametri funkcije jetre u plazmi *Wistar* pacova *per os* izloženih etanolu a potom disulfiramu.

Grupa	Parametri	
	AST (U/L)	ALT (U/L)
kontrola	148 ± 15,8	27 ± 0,6
A ₁₋₂₁	141,2 ± 11,1	43,7 ± 6,4 ^{¥**}
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₃₁	124 ± 3,6	36 ± 4,2 ^{¥**}
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	147 ± 22,6	34,8 ± 1,5 ^{¥**,#*}

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6); oznake za razlike između grupa: A i A/DSF grupe vs. kontrolna grupa (¥), A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ vs. A₁₋₂₁ (#); jednofaktorska ANOVA-nivo značajnosti: *(p<0.015), **(p<0.0001); oznake 10 i 21 odnose se na dužinu ekspozicije.

Ekspozicija etanolu tokom 21 dana, a potom uvođenje DSF u tretman dodatnih 21 dan, nije dovela do promjene aktivnosti AST u odnosu na kontrolnu grupu, niti se nivo aktivnosti AST razlikuje u odnosu na ekspoziciju samo etanolu tokom 21 dana. Kombinovana ekspozicija etanolu i DSF rezultirala je povećanjem ALT aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu od 33% i 29% na 10. i 21. dan ekspozicije DSF. U odnosu na zabilježeno povećanje ALT aktivnosti nakon ekspozicije samo etanolu tokom 21 dan (62%), uvođenje DSF u tretman je dovelo do smanjenja ALT aktivnosti za 33%.

Izgled presjeka tkiva jetre nakon subhronične kombinovane ekspozicije etanolu i DSF dat je na Slici 7. gdje su prikazane samo karakteristične promjene.



A. A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₃₁ grupa

B. A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupa

Slika 7. Presjek tkiva jetre pacova grupa subhronično tretiranih etanolom i disulfiratom.

A. A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₃₁ grupa (*per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana i potom *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan tokom 10 dana); **B.** A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupa (*per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana i potom *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan tokom 21 dana).

Histopatološka analiza isječaka tkiva jetre pacova nakon subhronične kombinovane ekspozicije etanolu i DSF pokazala je gubitak zrakastog rasporeda hepatocita, koji su međusobno tijesno povezani, a sinusoidi su slabo uočljivi (nisu definisane Remakove gredice) (Slika 7A.). U hepaticnim krvnim sudovima uočljivi su krvni elementi (eritrociti) bez ekstravazacije (Slika 7B.).

4.4.2. Efekti kombinovane primjene etanola i disulfirama na koncentraciju bioelemenata u jetri

4.4.2.1. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na koncentraciju bakra

Uvođenje DSF u tretman prvobitno je dovelo do porasta koncentracije Cu u jetri, dok nakon 10. dana koncentracija Cu opada do nivoa kontrolnih vrijednosti (Grafik 2, Prilog 2: Tabela 2).

4.4.2.2. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na koncentraciju željeza

Uvođenje DSF u tretman rezultiralo je porastom koncentracije Fe u jetri za 44% iznad kontrolne vrijednosti po završetku tretmana, što je i značajno iznad vrijednosti u poređenju sa A₁₋₂₁ grupom (Grafik 3, Prilog 2: Tabela 3).

4.4.2.3. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na koncentraciju cinka

Uvođenje DSF u tretman prvobitno dovodi do porasta koncentracije Zn u jetri, čija je vrijednost na 10. dan za 62% iznad kontrolne vrijednosti, a potom do završetka tretmana sadržaj Zn opada prema nivou kontrolne vrijednosti, što je i dalje iznad vrijednosti grupe A₁₋₂₁ (Grafik 4, Prilog 2: Tabela 4).

4.4.2.4. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na koncentraciju magnezijuma

Uvođenje DSF u tretman nije pokazalo efekat na koncentraciju Mg u jetri (Grafik 5, Prilog 2: Tabela 5).

4.4.2.5. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na koncentraciju selena

Iako ekspozicija etanolu nije pokazala uticaj na sadržaj Se u jetri, uvođenje DSF u tretman dovelo je do postepenog rasta koncentracije Se (67% iznad kontrolne vrijednost po završetku tretmana) (Grafik 6, Prilog 2: Tabela 6).

4.4.3. Efekti kombinovane primjene etanola i disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri

4.4.3.1. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na aktivnost superoksid dismutaze

Ekspozicija etanolu tokom 21 dana i potom uvođenje DSF u tretman, dovelo je do značajne redukcije SOD aktivnosti u jetri već od 1. dana administriranja DSF (prekid unosa etanola se podrazumijeva). Redukcija aktivnosti enzima po završetku tretmana iznosi 36% u odnosu na kontrolnu grupu (Grafik 7, Prilog 3: Tabela 1).

4.4.3.2. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na lipidnu peroksidaciju

Zabilježeni porast nivoa MDA u jetri nakon ekpozicije etanolu tokom 21 dana postepeno opada po uvođenju DSF u tretman, i po završetku tretmana ostaje za 29% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 8, Prilog 3: Tabela 2).

4.4.3.3. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na nivo superoksid anjon radikala

Zabilježeni porast nivoa $O_2^{\cdot-}$ u jetri nakon ekpozicije etanolu tokom 21 dana postepeno opada po uvođenju DSF u tretman, i vrijednost je po završetku tretmana značajno niža u odnosu na A_{1-21} grupu, iako i dalje za 102% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 9, Prilog 3: Tabela 3).

4.4.3.4. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na aktivnost katalaze

Uvođenje DSF u tretman, nakon zabilježenog pada aktivnosti CAT u jetri usljed ekpozicije etanolu tokom 21 dana, dovodi do rasta aktivnosti enzima i vrijednost je po završetku tretmana značajno viša u odnosu na A_{1-21} grupu, odnosno za 89% iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 10, Prilog 3: Tabela 4).

4.4.3.5. Efekat kombinovane primjene etanola i disulfirama na glutationski ciklus

Po završetku tretmana nivo GSH u jetri je ispod kontrolne vrijednosti (28%), što je značajno niža vrijednost u odnosu na A_{1-21} grupu (Grafik 11, Prilog 3: Tabela 5).

Uvođenje DSF u tretman nakon ekpozicije etanolu dovelo je do smanjenja nivoa GSSG u jetri ispod nivoa A_{1-21} grupe (34% ispod kontrolne vrijednosti) (Grafik 12, Prilog 3: Tabela 6).

Na 10. dan od uvođenja DSF u tretman zabilježena je najniža vrijednost u odnosu GSSG/GSH (48% ispod kontrolne vrijednosti), dok je po završetku tretmana odnos u nivou kontrolne vrijednosti (Grafik 20, Prilog 3: Tabela 7).



Grafik 20. Odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova izloženih *per os* etanolu i disulfiramu.

Parametar homeostaze glutationa: odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$).

Uvođenje DSF u tretman dovelo je do povećanja aktivnosti GR u jetri, čija je najveća vrijednost postignuta nakon 10. dana (48% iznad kontrolne vrijednosti) i po završetku tretmana je aktivnost enzima značajno iznad vrijednosti u A₁₋₂₁ grupi (Grafik 17, Prilog 3: Tabela 8).

Ekspozicija etanolu tokom 21 dana i potom uvođenje DSF u tretman (prekid unosa etanola se podrazumijeva) dovelo je takođe do postepenog rasta aktivnosti GST u jetri (155% iznad kontrolne vrijednosti po završetku tretmana), s tim što je nivo aktivnosti enzima značajno niži u odnosu na A₁₋₂₁ grupu (Grafik 18, Prilog 3: Tabela 9).

4.5. EFEKTI KOMBINOVANE PRIMJENE KADMIJUMA I DISULFIRAMA NA JETRU WISTAR PACOVA

4.5.1. Efekti kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre *Wistar* pacova

Prirast tjelesne mase životinja prikazan je u Prilogu 1. Vrijednosti parametara funkcije jetre su prikazani u Tabeli 13.

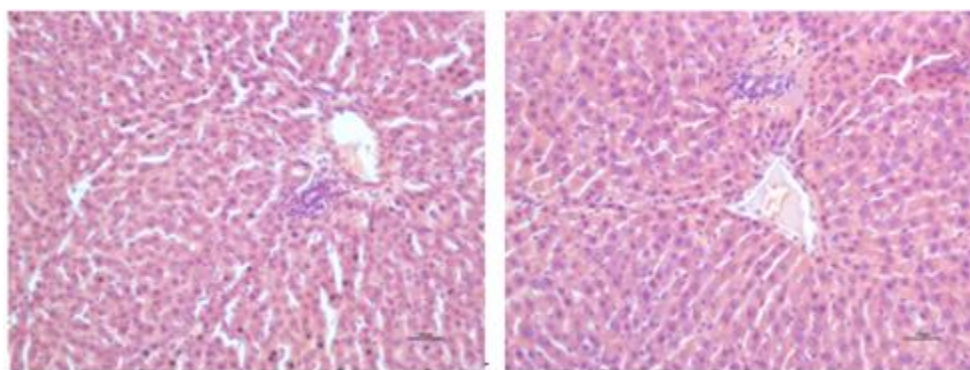
Tabela 13. Parametri funkcije jetre u plazmi *Wistar* pacova *i.p.* izloženih Cd i *per os* disulfiramom.

Grupa	Parametri	
	AST (U/L)	ALT (U/L)
kontrola	148 ± 15,8	27 ± 0,6
Cd ₁₋₄₂	230,2 ± 31,7 ^{¥*}	46 ± 3,2 ^{¥*}
Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	213,5 ± 6,7 ^{¥*}	34 ± 2,6 ^{¥*}
Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	302 ± 2,5 ^{¥*, £*}	37 ± 2,6 ^{¥*, £*}

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za 6 uzoraka (n = 6); oznake za razlike između grupa: Cd i Cd/DSF grupe vs. kontrolna grupa (¥), (Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂) vs. Cd₁₋₄₂ (£); jednofaktorska ANOVA-nivo značajnosti: *(p<0.0001); oznake 10, 21, 31 i 42 odnose se na dužinu ekspozicije.

Ekspozicija Cd tokom 21 dan, potom uvođenje DSF u tretman dodatnih 21 dan uz nastavak administriranja Cd, rezultirala je povećanjem aktivnosti aminotransferaza u odnosu na kontrolnu vrijednost (AST: 44% i 104%, ALT: 26% i 37% na 10. i 21. dan od uvođenja DSF u tretman). U odnosu na ekspoziciju samo Cd tokom 42 dana aktivnost AST je povećana za dodatnih 48%, dok je aktivnost ALT snižena za 33%.

Izgled presjeka tkiva jetre nakon subhronične kombinovane ekspozicije Cd i DSF dat je na Slici 8. gdje su prikazane samo karakteristične promjene.



A. Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ grupa

B. Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa

Slika 8. Presjek tkiva jetre pacova grupa subhronično tretiranih kadmijumom i disulfiramom.

A. Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 31 dana i *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan od 22. -31. dana) – infiltracija neutrofila (N); **B.** Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 42 dana i *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan od 22. - 42. dana) – infiltracija neutrofila (N) i fokalna nekroza (FN).

Histopatološka analiza isječaka tkiva jetre pacova nakon subhronične kombinovane ekspozicije Cd i DSF pokazala je zrakasto raspoređene hepatocite (Remakove gredice) sa

jasno uočljivim jedrima i stisnutim sinusoidima. Prisutna je infiltracija neutrofila u manjem obimu u odnosu na ekspoziciju samo Cd (Cd₁₋₂₁ grupa).

4.5.2. Efekti kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na koncentraciju bioelemenata u jetri

4.5.2.1. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na koncentraciju bakra

Uvođenje DSF u tretman prvobitno je dovelo do porasta koncentracije Cu u jetri, dok u nastavku kombinovanog tretmana koncentracija Cu opada i po završetku tretmana je za 69% iznad kontrolne vrijednosti, što je značajno niža vrijednost u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu (Grafik 2, Prilog 2: Tabela 2).

4.5.2.2. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na koncentraciju željeza

Uvođenje DSF u tretman rezultiralo je stalnim porastom koncentracije Fe u jetri od samog početka kombinovanog tretmana. Sadržaj Fe je po završetku kombinovanog tretmana za 199% iznad kontrolne vrijednosti, što je i značajno iznad vrijednosti Cd₁₋₄₂ grupe (Grafik 3, Prilog 2: Tabela 3).

4.5.2.3. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na koncentraciju cinka

Kombinovana ekspozicija Cd i DSF uzrokuje stalan porast koncentracije Zn u jetri, čija je vrijednost po završetku tretmana za 316% iznad kontrolne vrijednosti, što je značajno iznad vrijednosti u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu (Grafik 4, Prilog 2: Tabela 4).

4.5.2.4. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na koncentraciju magnezijuma

Kombinovana ekspozicija Cd i DSF nije pokazala efekat na koncentraciju Mg u jetri (Grafik 5, Prilog 2: Tabela 5).

4.5.2.5. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na koncentraciju selena

Kombinovana ekspozicija Cd i DSF dovela je do postepenog porasta koncentracije Se u jetri (za 59% iznad kontrolne vrijednosti po završetku tretmana) (Grafik 6, Prilog 2: Tabela 6).

4.5.3. Efekti kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri

4.5.3.1. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na aktivnost superoksid dismutaze

Ekspozicija Cd tokom 21 dana dovela je do redukcije SOD aktivnosti u jetri, koja nakon jednog dana od uvođenja DSF u tretman (nastavak unosa Cd se podrazumijeva) iznosi 35% u odnosu na kontrolnu vrijednost. Nastavak tretmana sa DSF doveo je do korekcije SOD aktivnosti blizu nivoa kontrolne vrijednosti (Grafik 7, Prilog 3: Tabela 1).

4.5.3.2. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na lipidnu peroksidaciju

Zabilježeni porast nivoa MDA u jetri nakon ekspozicije Cd tokom 21 dana postepeno opada po uvođenju DSF u tretman, i po završetku tretmana ostaje za 56% iznad kontrolne vrijednosti iako je do završetka tretmana nastavljena uporedna ekspozicija Cd (Grafik 8, Prilog 3: Tabela 2). Vrijednost MDA po završetku tretmana je značajno niža u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu.

4.5.3.3. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na nivo susperoksid anjon radikala

Zabilježeni porast nivoa O₂⁻ u jetri nakon ekspozicije Cd tokom 21 dana postepeno opada po uvođenju DSF u tretman, i po završetku tretmana ostaje za 59% iznad kontrolne vrijednosti iako je do završetka tretmana nastavljena uporedna ekspozicija Cd (Grafik 9, Prilog 3: Tabela 3). Vrijednost O₂⁻ po završetku tretmana je značajno niža u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu.

4.5.3.4. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na aktivnost katalaze

Uvođenje DSF u tretman dovodi do porasta aktivnosti CAT u jetri u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu, iako je vrijednost po završetku tretmana i dalje za 23% ispod kontrolne vrijednosti (Grafik 10, Prilog 3: Tabela 4).

4.5.3.5. Efekat kombinovane primjene kadmijuma i disulfirama na glutationski ciklus

Prvobitno smanjenje nivoa GSH u jetri nakon ekspozicije Cd tokom 21 dana postepeno se koriguje prema kontrolnoj vrijednosti do 10. dana od uvođenja DSF u tretman (iako je Cd i nadalje aplikovan), ali u nastavku kombinovanog tretmana ponovo se smanjuje nivo GSH i po završetku tretmana je za 50% ispod kontrolne vrijednosti (Grafik 11, Prilog 3: Tabela 5). Nivo GSH usljed kombinovane ekspozicije je značajno iznad vrijednosti grupe Cd₁₋₄₂.

Uvođenje DSF u tretman dovelo je do smanjenja nivoa GSSG ispod nivoa Cd₁₋₄₂ grupe (40% ispod kontrolne vrijednosti) (Grafik 12, Prilog 3: Tabela 6).

Na 10. dan od uvođenja DSF u tretman postignuta je najniža vrijednost u odnosu GSSG/GSH (17% ispod kontrolne vrijednosti), dok je po završetku tretmana vrijednost za 23 % iznad kontrolne vrijednosti (Grafik 21, Prilog 3: Tabela 7).



Grafik 21. Odnos oksidiranog i redukovanog glutaciona u jetri *Wistar* pacova izloženih *i.p.* kadmijumu i *per os* disulfiramu.

Parametar homeostaze glutaciona: odnos oksidiranog i redukovanog glutaciona u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 6$).

Nakon prvobitnog smanjenja aktivnosti GR u jetri usljed ekspozicije Cd tokom 21 dana, uvođenje DSF u tretman (uprkos produženom aplikovanju Cd) dovodi do povećanja aktivnosti enzima do nivoa kontrolnih vrijednosti, što je i značajno iznad vrijednosti u Cd₁₋₄₂ grupi (Grafik 17, Prilog 3: Tabela 8).

Iako ekspozicija Cd dovodi do smanjenja aktivnosti GST u jetri, uvođenje DSF u tretman dovodi do porasta aktivnosti enzima (103% iznad kontrolne vrijednosti), što je značajna razlika u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu (Grafik 18, Prilog 3: Tabela 9).

4.6. EFEKTI KOMBINOVANE PRIMJENE KADMIJUMA, ETANOLA I DISULFIRAMA NA JETRU WISTAR PACOVA

4.6.1. Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na aktivnost enzima funkcije jetre u plazmi i histopatološki nalaz tkiva jetre Wistar pacova

Prirast tjelesne mase životinja prikazan je u Prilogu 1. Vrijednosti parametara funkcije jetre su prikazani u Tabeli 14.

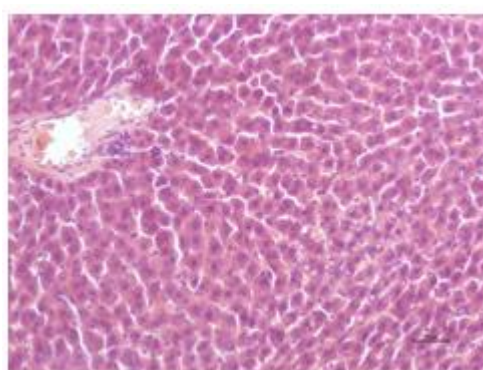
Tabela 14. Parametri funkcije jetre u plazmi *Wistar* pacova *i.p.* izloženih Cd i *per os* etanolu, a potom *i.p.* Cd i *per os* disulfiramom.

Grupa	Parametri	
	AST (U/L)	ALT (U/L)
kontrola	148 ± 15,8	27 ± 0,6
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₂₁	195,5 ± 20,6 ^{¥**}	42,5 ± 6,2 ^{¥**}
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	259,5 ± 28,8 ^{¥**}	36,2 ± 6,4 ^{¥*}
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	230 ± 6,6 ^{¥**£*}	36 ± 5,0 ^{¥*}

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za 6 uzoraka (n = 6); oznake za razlike između grupa: A/Cd i A/Cd/DSF grupe vs. kontrolna grupa (¥), A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ vs. A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ (£); jednofaktorska ANOVA -nivo značajnosti: *(p<0.03),**(p<0.0001); oznake 10, 21, 31 i 42 odnose se na dužinu ekspozicije.

Koekspozicija Cd i etanolu, a potom uvođenje DSF u tretman (prestanak unosa etanola da se izbjegne DSF-alkohol reakcija, dok je nastavljena ekspozicija Cd) dovelo je do značajnog povećanja aminotransferaza u odnosu na kontrolne vrijednosti. Zabilježene vrijednosti bile su za 75% i 55% više od kontrolnih ALT, te za 34% i 33% više od kontrolnih AST vrijednosti na 10. i 21. dan od uvođenja DSF u tretman,. U odnosu na koekspoziciju Cd i etanolu tokom 21 dana, zabilježeno je povećanje AST aktivnosti od 23% i smanjenje ALT aktivnosti od 24%.

Izgled presjeka tkiva jetre nakon subhronične kombinovane ekspozicije etanolu, Cd, i DSF dat je na Slici 9. gdje su prikazane samo karakteristične promjene.



A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa

Slika 9. Presjek tkiva jetre pacova grupa subhronično tretiranih etanolom, kadmijumom i disulfiramom.

A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa (*per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana, *i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 42 dana i *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan od 22. - 42. dana).

Histopatološkom analizom isječaka tkiva jetre pacova nakon subhronične kombinovane ekspozicije etanolu, Cd i DSF uočeno je da su hepatociti zadržali svoj normalni zrakasti raspored sa intertrabekularnom mikrovaskulaturom koja je prazna (Slika 9).

4.6.2. Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na koncentraciju bioelemenata u jetri

4.6.2.1. Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na koncentraciju bakra

Uvođenje DSF u tretman dovodi do stalnog porasta koncentracije Cu u jetri, čija je vrijednost po završetku tretmana za 219% iznad kontrolne vrijednosti, što je značajno iznad vrijednosti zabilježene u Cd₁₋₄₂, A₁₋₂₁ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupi (Grafik 2, Prilog 2: Tabela 2).

4.6.2.2. Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na koncentraciju željeza

Uvođenje DSF u tretman rezultiralo je stalnim porastom koncentracije Fe u jetri od samog početka kombinovanog tretmana. Sadržaj Fe je po završetku kombinovanog tretmana za 97% iznad kontrolne vrijednosti, što je i značajno iznad vrijednosti A₁₋₂₁ grupe, dok se ne razlikuje značajno u odnosu na kombinovanu ekspoziciju Cd i etanolu (Grafik 3, Prilog 2: Tabela 3).

4.6.2.3. Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na koncentraciju cinka

Kombinovana ekspozicija Cd, etanola i DSF uzrokuje stalan porast koncentracije Zn u jetri, čija je vrijednost po završetku tretmana za 310% iznad kontrolne vrijednosti, što je značajno iznad vrijednosti u poređenju sa A₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom (Grafik 4, Prilog 2: Tabela 4).

4.6.2.4. Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na koncentraciju magnezijuma

Uvođenje DSF u tretman nije pokazalo efekat na koncentraciju Mg u jetri, ali je data vrijednost po završetku tretmana niža u odnosu na A₁₋₂₁ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupu (Grafik 5, Prilog 2:).

4.6.2.5. Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na koncentraciju selena

Kombinovana ekspozicija Cd, etanola i DSF dovela je do postepenog porasta koncentracije Se u jetri, i dati porast sadržaja Se je značajno veći u odnosu na ostale

eksperimentalne grupe (283% iznad kontrolne vrijednosti po završetku tretmana) (Grafik 6, Prilog 2: Tabela 6).

4.6.3. Efekti kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na parametre oksidativnog stresa u jetri

4.6.3.1. Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na aktivnost superoksid dismutaze

Ekspozicija Cd i etanola tokom 21 dana dovela je redukcije SOD aktivnosti u jetri. Uvođenje DSF u tretman (nastavak unosa Cd) dovelo je do postepenog rasta aktivnosti enzima, čija je vrijednost i po završetku kombinovanog tretmana za 21% niža u odnosu na kontrolnu vrijednost (Grafik 7, Prilog 3: Tabela 1).

4.6.3.2. Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na lipidnu peroksidaciju

Zabilježeni porast nivoa MDA u jetri nakon kombinovane ekspozicije Cd i etanola tokom 21 dana postepeno opada po uvođenju DSF u tretman, i po završetku tretmana ostaje za 29% iznad kontrolne vrijednosti, iako je do završetka tretmana nastavljena uporedna ekspozicija Cd (Grafik 8, Prilog 3: Tabela 2). Vrijednost MDA po završetku tretmana je značajno niža u odnosu na A₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupu.

4.6.3.3. Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na nivo superoksid anjon radikala

Zabilježeni porast nivoa O₂^{·-} u jetri nakon kombinovane ekspozicije Cd i etanola tokom 21 dana postepeno opada po uvođenju DSF u tretman, i po završetku tretmana ostaje za 59% iznad kontrolne vrijednosti, iako je do završetka tretmana nastavljena uporedna ekspozicija Cd (Grafik 9, Prilog 3: Tabela 3). Vrijednost O₂^{·-} po završetku tretmana je značajno niža u odnosu na A₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupu.

4.6.3.4. Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na aktivnost katalaze

Uvođenje DSF u tretman nije dovelo do razlike aktivnosti CAT u jetri u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu, ali je zabilježena aktivnost enzima značajno viša u poređenju sa A₁₋₂₁ grupom i značajno niža u poređenju sa A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupom. Vrijednost aktivnosti CAT po završetku tretmana je za 43% ispod kontrolne vrijednosti (Grafik 10, Prilog 3: Tabela 4).

4.6.3.5. *Efekat kombinovane primjene kadmijuma, etanola i disulfirama na glutationski ciklus*

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola nije uzrokovala značajno smanjenje nivoa GSH u jetri. Uvođenje DSF u tretman (prekid unosa etanola i nastavak unosa Cd se podrazumijeva) dovelo je do porasta nivoa GSH do 10. dana kombinovane ekpozicije (42% iznad kontrolne vrijednosti), ali u nastavku tretmana ponovo se smanjuje nivo GSH i po završetku tretmana je za 38% ispod kontrolne vrijednosti (Grafik 11, Prilog 3: Tabela 5). Nivo GSH usljed kombinovane ekspozicije je značajno iznad vrijednosti grupe Cd₁₋₄₂, i ispod vrijednosti A₁₋₂₁ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupe.

Uvođenje DSF u tretman dovelo je do smanjenja nivoa GSSG u jetri značajno ispod nivoa u Cd₁₋₄₂, A₁₋₂₁ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupi (57% ispod nivoa kontrolne vrijednosti) (Grafik 12, Prilog 3: Tabela 6).

Po završetku tretmana odnos GSSG/GSH je za 31% ispod kontrolne vrijednosti (Grafik 22, Prilog 3: Tabela 7).



Grafik 22. Odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova izloženih *i.p.* kadmijumu i *per os* etanolu i disulfiramu.

Parametar homeostaze glutationa: odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri (pogledati eksperimentalne uslove u sekciji 3.3. *Eksperimentalni protokol*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6).

Kombinovana ekspozicija Cd, etanola i DSF ne pokazuje razliku aktivnosti GR u jetri u odnosu na kontrolnu vrijednost, ali je vrijednost aktivnosti enzima po završetku tretmana značajno iznad vrijednosti u Cd₁₋₄₂ i A₁₋₂₁ grupi (Grafik 17, Prilog 3: Tabela 8).

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola rezultira povećanjem aktivnosti GST u jetri. Uvođenjem DSF u tretman dolazi prvobitno do još većeg stepena povećanja aktivnosti enzima. U nastavku tretmana aktivnost enzima postepeno opada i po završetku tretmana je

za 89% iznad kontrolne vrijednosti, što je značajno iznad vrijednosti u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu, a ispod vrijednosti A₁₋₂₁ grupe i kombinovane ekspozicije Cd i etanolu (Grafik 18, Prilog 3: Tabela 9).

5. DISKUSIJA

Toksični metal Cd i psihoaktivna supstanca koja izaziva zavisnost, etanol, su od velikog toksikološkog i ekotoksikološkog značaja u slučaju Cd, i pod određenim uslovima ekspozicije predstavljaju neprihvatljiv rizik po zdravlje ljudi, naročito kada je u pitanju njihova koekspozicija. Iako se po svojim fizičko-hemijskim osobinama Cd i etanol veoma razlikuju, pojedini efekti ovih komponenti na jetru se dovode u vezu sa istim mehanizmima toksičnosti, nastankom OS i narušavanjem homeostaze bioelemenata. Disulfiram, lijek koji se primjenjuje u averzivnoj terapiji alkoholizma, zbog specifične strukture svojih metabolita, može imati potencijalno protektivno dejstvo na jetru, u smislu korekcije narušenog redoks statusa i statusa bioelemenata u jetri pacova koji su prethodno izloženi etanolu i/ili Cd. Doprinos studije je u rasvjetljavanju interferencije –SH grupe metabolita DSF sa glutationskim odgovorom, što je jako važno ako uzmemo u obzir da i Cd i etanol utiču na glutationski status u jetri. Studija je pokazala u kojoj mjeri DSF ima potencijal za oporavak jetre, što je potvrđeno i određivanjem enzima funkcije jetre i histopatološkim nalazom tkiva jetre.

Za studiju je odabran animalni model na pacovima koji je za svrhu imao da imitira izloženost Cd, etanolu i DSF (pušači, alkoholičari, alkoholičari pušači bez i na terapiji DSF) uz pokušaj predstavljanja realnih puteva ekspozicije Cd, etanolu i DSF. Usljed nemogućnosti da se sprovede inhalaciona studija na pacovima (pušači su izloženi Cd putem inhalacije dima cigareta), Cd je administriran intraperitonealno (*i.p.*). Dati put ekspozicije je odabran obzirom da je očekivano vrijeme dospijeca Cd u cirkulaciju nakon *i.p* i inhalacione ekspozicije gotovo jednako (Bauman i sar., 1991; Moffatt i Denizeau, 1997; Honma i Suda, 1998). Primjenjena doza od 1 mg CdCl₂/kg/dan je odabrana prema literaturnim podacima (Nigam i sar., 1999; Shaikhi sar., 1999; Nagamine i sar., 2007). Disulfiram je administriran *per os* u dozi od 178,5 mg DSF/kg t.m./dan što odgovara dozi od 125 mg po tableti koja se primjenjuje u terapiji (Nabekuraa i sar., 2003; Badawi i Bano, 2015). Budući da pacovi brže metaboliziraju etanol, potrebna im je veća doza etanola nego humanim subjektima za postizanje istih toksičnih efekata. Za odabrani model studije, prije ispitivanja uticaja DSF ispitani su štetni efekti Cd na jetru usljed akutne, subakutne i subhronične ekspozicije, štetni efekti etanola na jetru usljed akutne i subakutne ekspozicije, te štetni efekti akutne i subakutne koekspozicije Cd i etanolu. Pri ispitivanju uticaja DSF na štetne efekte etanola u jetri, DSF se uvodi u tretman pacova koji su prethodno izloženi etanolu, pri čemu se u nastavku tretmana prekida unos etanola. Budući da se koekspozicija Cd i DSF javlja kod

alkoholičara-pušača na terapiji DSF, pri čemu se nastavlja učestalo pušenje kod pacijenata, DSF se uvodi u tretman pacova koji su prethodno izloženi Cd i nastavlja se uporedna ekspozicija Cd i DSF. Uz tako odabran tretman ispitan je uticaj DSF na štetne efekte Cd u jetri. Za ispitivanje uticaja DSF na štetne efekte koekspozicije Cd i etanolu u jetri, DSF se uvodi u tretman pacova koji su prethodno izloženi Cd i etanolu, pri čemu se prekida unos etanola u nastavku tretmana i nastavlja uporedna ekspozicija Cd i DSF, što je realan scenario kod alkoholičara pušača na terapiji DSF.

Od ranije poznati mehanizmi toksičnosti Cd uključuju izmjene u strukturi tiolnih proteina i aktivnosti enzima AOS, inhibiciju energetskeg metabolizma i prekide u strukturi DNA (Lopez i sar., 2006). Rezultati studije su pokazali da molekularni put hepatotoksičnosti Cd uključuje promociju OS usljed povećanja koncentracije slobodnih Cu i Fe jona, koji u Fentonovoj reakciji sa H_2O_2 doprinose produkciji hidroksil radikala ($\cdot OH$). Drugi put nastanka OS uključuje narušavanje funkcije neenzimskih (GSH i drugih molekula sa slobodnom $-SH$ grupom) i enzimskih antioksidanata (SOD, CAT, GPx) u jetri (Arroyo i sar. 2012; Kayama i sar., 1995). Prema tome, prooksidativni efekat Cd je potvrđen zabilježenom inhibicijom antioksidativnih enzima, porastom LPO i štetnim efektom na glutationski ciklus. Disulfiram, *per se*, pokazao je drugačije efekte na hepatocelularni redoks pufer sistem, zbog nukleofilnog karaktera i izraženog afiniteta za vezivanje metala svog glavnog metabolita (DDC), koji u strukturi ima $-SH$ grupu. Prooksidativni efekat DSF ostvaren je kroz redukciju SOD aktivnosti (DDC djeluje kao helator sa jakim afinitetom za vezivanje Cu koji je smješten u aktivnom centru SOD-a; DDC takođe reaguje sa cisteinskim $-SH$ grupama ovog enzima) i povišen sadržaj $O_2^{\bullet -}$. Povećane aktivnosti CAT, GPx [oba enzima učestvuju u prevođenju hidrogen peroksida (H_2O_2) u H_2O] kao i GST (enzim uključen u eliminaciju terminalnih produkata LPO), praćene nepromijenjenim sadržajem GSH (kofaktor za GPx i GST), pokazatelji su antioksidativne uloge DSF. DDC nije efikasan u vezivanju Fe koji je u aktivnom centru CAT, stoga aktivnost datog enzima nije pogođena tretmanom. Od ranije predloženi mehanizmi putem kojih etanol dovodi do OS uključuju promjene redoks stanja, stvaranje reaktivnih produkata acetaldehida, oštećenje mitohondrija, direktne efekte na biološke membrane usljed hidrofobnosti etanola, etanolom indukovanu hipoksiju i efekat na imunološki sistem, indukciju CYP2E1, mobilizaciju Fe, efekat na enzime AOS i glutation i prevođenje u 1-hidroksietilradikal (Dey i Cederbaum, 2006). Prooksidativni efekat etanola je potvrđen porastom LPO (slika br.), koju potencira Fe oslobođeno iz feritina zbog samog metabolizma etanola .

5.1. Efekti na funkciju jetre i histopatološki nalaz

Ekspozicija kadmijumu i/ili etanolu: Ekspozicija Cd je dovela do povećanja aktivnosti aminotransferaza u odnosu na kontrolnu grupu (AST: Cd₁₋₂₁ p < 0,001, Cd₁₋₄₂ p < 0,0001; ALT: Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂ p < 0,0001), što je dosljedno prethodno publikovanim izvještajima prema kojima se dešava znatno oslobađanje jetrenih enzima u cirkulaciju usljed ekspozicije Cd (Yamano i sar., 1999; Adikwu i sar., 2013) (Tabela 3).

Nivoi aminotransferaza u plazmi predstavljaju značajan marker hronične izloženosti alkoholu. Studije na humanim subjektima su pokazale povećanje nivoa aminotransferaza u plazmi koje je ovisno o zdravstvenom stanju pacijenta (Tsui i sar., 2013), sadržaju Fe u organizmu (Whitfield i sar., 2001), tjelesnoj težini (Alatalo i sar., 2008) i nivou unosa alkohola (Liangpunsakul i sar., 2010). Rezultati velike nacionalne (U.S.) studije, Liangpunsakul-a i saradnika, ukazuju zapravo na beskorisnost testova za određivanje nivoa aminotransferaza ukoliko je unos alkohola manji od dva pića dnevno ili nešto više od dva pića dnevno. Unosi alkohola koji su veći od toga povećavaju aktivnost aminotranferaza ili narušavaju AST/ALT odnos. Studije na pacovima su pokazale da pri akutnoj ekspoziciji alkoholu nema značajnih promjena aktivnosti aminotransferaza, uključujući ekspoziciju niskim i visokim dozama (Li i sar., 2004). Hronična ekspozicija alkoholu povećava nivo ALT u plazmi, dok se AST ne mijenja (Hakucho i sar., 2013), što je slučaj i sa rezultatima sprovedene studije, odnosno prilikom ekspozicije alkoholu tokom 21 dana (ALT: A₁₋₂₁ p < 0,0001) (Tabela 3).

Koekspozicija Cd i etanola tokom 21 dana, pokazala je gotovo istu razliku aktivnosti AST i ALT u odnosu na kontrolnu grupu kao i ekspozicija samo Cd (p<0,0001) (Tabela 3). Stoga se može zaključiti da se oslobađanje AST u cirkulaciju dešava isključivo usljed ekspozicije Cd, dok se oslobađanje ALT dešava usljed ekspozicije Cd i etanolu, ali njihovi efekti nisu zbirni prilikom koekspozicije. Promjene upućuju na subcelularnu lokalizaciju toksičnog djelovanja alkohola koja je dominantno vezana za citoplazmu, dok su target toksičnog delovanja Cd više mitohondrije (Majkić Signh, 1993).

Histopatološkom analizom isječaka tkiva jetre pacova subakutno i subhronično *i.p.* tretiranih Cd uočena je infiltracija neutrofila koja je znak inflamatornog procesa. Prisustvo inflamacije je u saglasnosti sa prethodnim publikacijama (Kayama i sar., 1995; Adikwu i sar., 2013; Habeebu i sar., 2000). Veći stepen infiltracije neutrofila zabilježen je kod Cd₁₋₂₁ grupe u odnosu na Cd₁₋₄₂ grupu (Slika 3C, E.), što bi se moglo objasniti time da ponovljena ekspozicija Cd uzrokuje akutnu i nespecifičnu hroničnu inflamaciju u parenhimu jetre i

sistemu *v. portae* (Habeebu i sar., 2000). Pojava fokalne nekroze nakon subakutne ekspozicije (Cd_{1-21}) takođe je u saglasnosti sa prethodnim publikacijama, u kojima se navodi pojava hepatičke nekroze pri primjenjenoj sličnoj *i.p.* dozi $CdCl_2$ (Moura i sar., 2016). Masne kapljice i citoplazmatska vakuolizacija usljed koje je jedro potisnuto ka periferiji ukazuju na toksično oštećenje hepatocita i narušavanje normalne mikroarhitekture jetre. Kod Cd_{1-42} grupe uočeno je uvećanje jetrenih sinusoida i neutrofilna infiltracija sinusoida (Slika 3E.), koje su u ostalim grupama tretiranim Cd konstrihovane i slabije uočljive.

Inicijalno oštećenje tkiva jetre nakon ekspozicije Cd nastaje vjerovatno usljed narušavanja homeostaze tiola i/ili povećane produkcije ROS, što je u saglasnosti i sa prethodnim saznanjem da Cd uzrokuje smanjenje rezervi GSH u epitelnim ćelijama (Checconi i sar., 2013). Pokazano je da ovakav efekat može da poveća osjetljivost pacijenta na virusnu infekciju (Influenza virus), budući da Cd induciran OS povećava replikaciju virusa influence u ćelijama. Progresija u oštećenju tkiva jetre odvija se usljed započetog inflamatornog procesa iniciranog aktivacijom Kupferovih ćelija iz kojih se oslobađaju hemoatraktanti i aktivatori neutrofila (citotoksični medijatori – ROS, citokini, hemokini). Usljed hemotaktičnih signala aktiviraju se neutrofilni koji migriraju iz vaskularnog u parasinusoidni prostor gdje indukuju procese kojima se narušava struktura parenhima jetre. Nekrotične promjene koje pri tome nastaju praćene su oslobađanjem ROS i proteaza. Hepatociti takođe generišu hemokine koji mogu otpočeti neutrofilima indukovano oštećenje. I produkti LPO su hemotaktični i potencijalno odgovorni za uvećavanje povrede (Jaeschke i sar., 2002; Radosavljević i sar., 2012). Kadmijum djeluje i na vaskularni endotel, što pored toga što dovodi do ishemijskog oštećenja hepatocita u bliskom okruženju, promovise i migraciju neutrofila iz krvnih sudova. Pri datoj dozi nije zabilježena pojava hemoragije (Stoll i sar., 1976).

Za razliku od hronične ekspozicije etanolu koja dovodi do akumulacije masnih kapljica u hepatocitima i nastanka fibroze, bez značajne infiltracije imunskih ćelija (Hakucho i sar., 2013), subakutna ekspozicija odabranoj dozi u studiji dovela je samo do uvećanja hepatocita i njihove mjestimične vakuolizacije (Slika 4. A, B.). Promjena volumena ćelija upućuje na opterećenje homeostatskih mehanizama koji održavaju volumen ćelije, kao što je rad jonskih pumpi i kanala (Ref).

Premda je kombinovana ekspozicija Cd i etanola indukovala infiltraciju neutrofila i uvećanje hepatocita, veći stepen oštećenja tkiva jetre je izostao (Slika 5A, B.). Ovo upućuje na mogućnost odlaganja toksičnog delovanja Cd usljed metabolisanja alkohola (Nation i sar., 1994).

Ekspozicija disulfiramu: Tretman samo DSF nije doveo do promjene aktivnosti aminotransferaza nakon 21 dana ekspozicije (Tabela 4), što je potvrda sigurnosti primjene DSF u liječenju ovisnosti od alkoholizma. Povećanje aktivnosti ALT je zabilježeno nakon 10. dan ekspozicije ($p < 0,001$), ali je u nastavku tretmana aktivnost ALT vraćena na nivo kontrolne vrijednosti čime se dokazuje da nije narušena funkcija jetre. Rezultati su u skladu sa prethodnim studijama, koje su pokazale da DSF samo usljed hronične ekspozicije izaziva umjereno povećanje aktivnosti aminotransferaza u serumu kod 25% pacijenata, dok se povećanje od 3 puta iznad kontrolnih vrijednosti dešava kod samo 4% pacijenata (U.S.National library of medicine, internet).

U skladu sa ovim su i rezultati histopatološke analize isječaka tkiva jetre pacova subakutno *per os* tretiranih DSF u kojima nisu uočena odstupanja od normalne histološke građe (Slika 6A, B.).

Ekspozicija etanolu i disulfiramu: Uvođenje DSF u tretman nakon ekspozicije etanolu tokom 21 dana, nije dovelo do promjene aktivnosti AST u odnosu na kontrolnu grupu, niti se nivo aktivnosti AST razlikuje u odnosu na ekspoziciju isključivo etanolu, što je dosljedno prethodnoj konstataciji da nivo AST prilikom ekspozicije samo etanolu ili samo DSF miruje. Kada je u pitanju nivo aktivnosti ALT, zabilježene su određene promjene usljed kombinovane ekspozicije. Ekspozicija isključivo etanolu je dovela do povećanja aktivnosti ALT (A_{1-21} : $p < 0,0001$), dok je uvođenje DSF u tretman dovelo do značajnog smanjenja ALT nivoa ($p < 0,011$), iako je ta vrijednost ostala iznad kontrolne vrijednosti ($p < 0,0001$) (Tabela 12). Rezultati histološke analize tkiva jetre su u skladu sa ovim - tkivne promjene su znatno izraženije kod životinja koje su dobijale samo alkohol (slika 4) u odnosu na one koje su nakon intoksikacije alkoholom dobijale DSF (slika 7. A, B).

Ekspozicija kadmijumu i disulfiramu: Kombinovana ekspozicija Cd i DSF rezultirala je povećanjem aktivnosti aminotransferaza u serumu u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,0001$) (Tabela 13). U odnosu na ekspoziciju samo Cd, aktivnost AST je dodatno povećana, dok je aktivnost ALT, nasuprot tome, snižena ($p < 0,0001$), iako su obje vrijednosti i dalje značajno veće od kontrolnih. Značajno povećanje aktivnosti AST upućuje na dodatno opterećenje mitohondrija koje se dešava vjerovatno usljed metabolisanja DSF, s obzirom da je aktivnost ovog enzima dominantno vezana za mitohondrije, dok se aktivnost AST dominantno dešava u citoplazmi, pa je stoga i rani znak oštećenja hepatocita (Majkić Singh, 1993). Na promjene koje su više funkcionalne prirode upućuje i histološki nalaz isječaka tkiva jetre pacova koji su tretirani Cd i DSF gde je zabilježena oskudnija infiltracija

neutrofila uz i nadalje prisutne znake fokalne nekroze u poređenju sa Cd₁₋₂₁ grupom (Slika 8.A, B.).

Ekspozicija kadmijumu, etanolu i disulfiramu: Koekspozicija Cd i etanola, a potom uvođenje DSF u tretman (prestanak unosa etanola da se izbjegne DSF-alkohol reakcija, dok je nastavljena ekspozicija Cd), pokazalo je tendenciju snižavanja vrijednosti aminotransferaza, iako je završetak tretmana rezultirao i dalje značajno povišenim vrijednostima u odnosu na kontrolne vrijednosti (A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ - AST: $p < 0,0001$; ALT: $p < 0,012$) (Tabela 14). Na 21. dan od uvođenja DSF nivo AST aktivnosti se značajno razlikuje u odnosu na koekspoziciju Cd i etanola tokom 21 dana ($p < 0,029$), dok se nivo ALT aktivnosti uopšte značajno ne razlikuje u odnosu na navedenu grupu. Zapravo, AST aktivnost je povišena, dok je ALT aktivnost smanjena u odnosu na A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ grupu. Ukoliko uzmemo u obzir nivo aktivnosti AST u grupama Cd₁₋₄₂ i A₁₋₂₁, možemo zaključiti da je i kod kombinovanog tretmana uzrok povišene aktivnosti zapravo Cd i DSF ne pokazuje značajan uticaj. Nasuprot tome, povišenoj ALT aktivnosti doprinose i Cd i etanol, ali kombinovani tretman sa DSF rezultira smanjenjem ALT aktivnosti do određenog stepena. Ovo upućuje na potencijal hepatoprotektivnog delovanja DSF, što se i na histološkim preparatima uočava kao manji stepen tkivnih promjena u odnosu na pojedinačno toksično delovanje alkohola i Cd, odnosno njihovu koaplikaciju (Slika 9A, B.).

5.2. Efekti na koncentraciju bioelemenata u jetri

Ekspozicija kadmijumu i/ili etanolu: Subakutna/subhronična ekspozicija Cd rezultirala je porastom koncentracije Cu, Fe, Zn ($p < 0,0001$) i Se ($p < 0,01$) u jetri (Grafik 2, 3, 4, 6). Retencija Cd u hepatocitima od samog početka tretmana (Grafik 1) u skladu je sa prethodno publikovanim rezultatima (Liu i sar., 2009; Webb, 1986). Akumulacija Cd u ćelijama dešava se zbog afiniteta Cd prema vezivanju za -SH grupe malih peptida i proteina, kao što su GSH i MT (MT- I i MT- II, čija je ekspresija podstaknuta ekspozicijom Cd). Potvrđena vremenski ovisna depozicija Cd u jetri odgovara i mikroskopski potvrđenom uvećanju oštećenja tkiva jetre (Slika 3) (Funakoshi i sar., 1997; Ogasawara i sar., 2014).

Funkcija metaloproteina ovisi o nivou esencijalnih metala (Cu, Fe, Zn, Se, itd.) dostupnih u bliskom okruženju. Dostupnost esencijalnih metala se čak smatra kritičnim faktorom funkcionalnosti metaloenzima, važnih u zaštiti od oksidativnog oštećenja. Jonska izmjena Cd i esencijalnih metala u aktivnim mjestima metaloenzima neizbježno dovodi do njihove inhibicije. Dakle, predočeni molekularni mehanizam hepatotoksičnosti Cd je potvrđen i rezultatima naše studije. Povećana koncentracija Cu u jetri pacova tretiranih Cd je

u vezi sa očekivanim i zabilježenim postepenim padom aktivnosti SOD tokom tretmana (Cu je koordinativno vezan za četiri ostatka histidina u aktivnom mjestu citosolne SOD) (Grafik 7). Dato povećanje Cu nije samo rezultat izmjene sa jonima Cd, nego i povećane ekspresije MT koja zahtjeva i dodatno oslobađanje Cu iz ceruloplazmina plazme. I porast Zn je u vezi sa povećanom ekspresijom MT, budući da Cd pokazuje afinitet za istiskivanjem Zn sa njegovog mjesta u MT (Iljin i sar., 2009; Thirumoorthy i sar., 2011). Budući da Cd pokazuje veći afinitet za vezivanje za –SH grupe u odnosu na fosfatnu, hloridnu, karboksilnu ili amino grupu, inaktivacija ključnih tiola (GSH, MT) utiče na važne biološke procese, odnosno dovodi do niza štetnih efekata (Arroyo i sar., 2014). Ovi štetni efekti se posebno ispoljavaju na mitohondrijama.

Povećanje koncentracije Se (za 175% na 1. dan ekspozicije; $p < 0,0001$) na početku tretmana Cd je u saglasnosti sa pojavom redistribucije Se iz drugih tkiva u jetru usljed ekspozicije Cd. Sadržaj Se potom postepeno opada do 21. dana tretmana usljed formiranja Cd-Se proteinskih kompleksa (slično kao i sa MT), i ostaje za 49% iznad kontrolne vrijednosti ($p < 0,01$) (Grafik 6), što je u saglasnosti sa navodima iz literature?? (Ognjanovic i sar., 2008). Porast sadržaja Fe u jetri je takođe vremenski ovisan (Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂: $p < 0,0001$) (Grafik 3), i dati povišeni nivo Fe doprinosi nastanku OS kroz odvijanje Fentonove reakcije (Kini i sar., 2011). Prethodne publikacije ukazuju na mogućnost porasta sadržaja Fe usljed izmjene njegovog dvovalentnog jonskog oblika iz različitih membranskih i citoplazmatskih proteina sa Cd (feritina i Fe-S klastera u Fe-S proteinima) (Maret i Wedd, 2014). Neki autori su publikovali i oprečne efekte Cd na nivo Fe, odnosno smanjenje sadržaja Fe usljed ekspozicije Cd (Jurczuk i sar., 2003). Tretman Cd nije doveo do promjene u sadržaju Mg (Grafik 5).

Subakutna ekpozicija etanolu rezultirala je porastom koncentracije Fe u jetri nakon 21 dan ekspozicije ($p < 0,046$) (Grafik 3) i inicijalnim porastom koncentracije Se ($p < 0,023$) (Grafik 6) čija je vrijednost ipak nešto ispod nivoa kontrolne po završetku tretmana. Smanjenje nivoa Se u jetri je zabilježeno i u ranijim studijama (Cederbaum, 1989). Značajan uticaj na koncentraciju Cu, Zn i Mg u jetri nije zabilježen pri datoj administriranoj dozi i vremenu ekspozicije (Grafik 2, 4, 5). Pokazano je da tek hronična i prekomjerna ekspozicija etanolu sa pojavom anoreksije i malabsorpcije dovodi do gubitka mnogih esencijalnih substanci putem urina, što za posljedicu ima smanjenje koncentracije bioelemenata i vitamina (Gonzalez-Reimers i sar., 1998). Kraće vrijeme ekspozicije u sprovedenoj studiji nije narušilo homeostatske mehanizme kontrole ovih bioelemenata, upućujući na očuvan odnos procesa resorpcije, odnosno eliminacije, koji se odrazio i na tkivu jetre.

Porast sadržaja Fe vjerovatno nastaje zbog mobilizacije Fe iz feritina usljed metabolizma etanola dejstvom ADH, i dalje, acetaldehida dejstvom alkoholne oksidaze, pri čemu se generišu superoksidni radikali ($p < 0,0001$) (Grafik 9) koji zapravo mobiliziraju Fe, što ujedno predstavlja značajan mehanizam etanolom indukovane hepatotoksičnosti (Shaw i Jayatilleke, 1990). Katalitički aktivno Fe katalizuje redoks reakcije između kiseonika i bioloških molekula, i time učestvuje u inicijaciji LPO (Stohs i Bagchi, 1995), koja je potvrđena i našom studijom ($p < 0,0001$) (Grafik 8). Dakle, Fe potencira toksičnost alkohola, ne samo putem Fentonove reakcije pri čemu nastaju $\cdot\text{OH}$ radikali, nego i ubrzava dekompoziciju lipidnih peroksida što rezultira nastankom peroksil i alkoksil radikala koji mogu odvajati vodikove atome iz molekula i stimulisati LPO (Nordmann i sar., 1992). Oksidacija etanola u jetri uzrokuje porast u odnosu NADH/NAD^+ , odnosno povećan nivo NADH favorizuje oslobađanje Fe iz feritina, i dovodi takođe do redukcije Fe vezanog za transferin (Nordmann i sar., 1992).

Simultana ekspozicija Cd i etanola i u drugim studijama je pokazala da etanol utiče na „turnover“ Cd, odnosno povećava absorpciju Cd iz GIT-a i akumulaciju Cd u jetri, bubrezima, srcu i slezeni pacova (Brzoska i sar., 2000). Navedeno je potvrđeno i našom studijom, pri čemu je kombinovana ekspozicija Cd i etanola rezultirala većim odlaganjem Cd u jetri nakon 21 dana u poređenju sa depozicijom usljed ekspozicije isključivo Cd ($p < 0,001$) (Grafik 1). U obje grupe uočava se dozna zavisnost akumulacije Cd. Mehanizam putem kojeg etanol povećava akumulaciju Cd u mekim tkivima je u vezi sa osobinom obje supstance da indukuju sintezu MT. Smatra se da etanol indirektno indukuje sintezu MT povećavajući koncentraciju Cd usljed povećane absorpcije ili izmjenom homeostaze Zn (Brzoska i sar., 2000). Sprovedena studija je pokazala da etanol nema značajan uticaj na koncentraciju Zn u jetri iz čega se može zaključiti da povećana koncentracija Cd zapravo dovodi do povećanja koncentracije Zn i sinteze MT. Navedeno je potvrđeno praktično istim porastom koncentracije Zn usljed kombinovane ekspozicije u odnosu na ekspoziciju isključivo Cd (Grafik 4). Dati tretman uzrokovao je i značajno manji porast koncentracije Cu u odnosu na ekspoziciju isključivo Cd ($p < 0,0001$) (Grafik 2). Povećana koncentracija Cu u jetri pacova je u vezi sa očekivanim i zabilježenim postepenim smanjenjem aktivnosti SOD tokom tretmana, dijelom zbog izmjene jona Cu i Cd (Grafik 7).

Značajna promjena sadržaja Fe usljed kombinovane ekspozicije Cd i etanola nastaje tek nakon 21 dana tretmana (97% iznad kontrolne vrijednosti), i zabilježeni porast je značajno veći u odnosu na Cd_{1-21} (32% iznad kontrolne vrijednosti; $p < 0,0001$) i A_{1-21} (27% iznad

kontrolne vrijednosti; $p < 0,0001$) grupu (Grafik 3). Porast koncentracije Fe je veći usljed koekspozicije zbog mobilizacije Fe iz feritina pod uticajem etanola, koji ujedno i povećava koncentraciju Cd, a samim tim dovodi i do veće izmjene dvovalentog jonskog oblika Fe sa Cd iz feritina i Fe-S proteina.

Ni koekspozicija Cd i etanola nema uticaj na sadržaj Mg u jetri (Grafik 5), što je u skladu i sa prethodnom studijom i dovodi nas do zaključka da je Mg najstabilniji bioelement u uslovima intoksikacije Cd ili etanolom (Brzoska i sar., 2000),.

Kombinovana ekspozicija Cd i etanola takođe na početku tretmana dovodi do porasta koncentracije Se (129% iznad kontrolne vrijednosti), i potom sadržaj Se postepeno opada do vrijednosti od 92% iznad kontrolne što je iznad vrijednosti Cd₁₋₂₁ grupe ($p < 0,01$) (Grafik 6). Budući da ekspozicija etanolu nije pokazala značajan efekat na koncentraciju Se, možemo zaključiti da zabilježeni trend, inicijalni porast koncentracije Se i potom postepeni pad koncentracije, potiče uglavnom od Cd koji prvobitno dovodi do redistribucije Se iz drugih tkiva i potom do formiranja Cd-Se proteinskih kompleksa, kao što je prethodno navedeno. Veća koncentracije Se, zabilježena nakon završenog kombinovanog tretmana u odnosu na ekspoziciju isključivo Cd, može se objasniti efektom etanola na porast koncentracije Cd, a samim tim i veće redistribucije Se iz drugih tkiva.

Ekspozicija disulfiramu: Subakutna ekspozicija DSF rezultirala je porastom koncentracije Cu, Fe, Se ($p < 0,0001$) i Zn ($p < 0,001$) u jetri (Grafik 2, 3, 4, 6).

Visok afinitet -SH grupe za vezivanje metala potvrđen je i formiranjem Cu-DDC kompleksa kod grupa izloženih DSF (Ostrovskii, 1978). Nadalje, povišen sadržaj Cu i Zn može se objasniti povećanom ekspresijom MT u jetri (koja zahtjeva i oslobađanje Cu iz ceruloplazmina), kao što je slučaj i kod tretmana Cd (Iljin i sar., 2009). Za razliku od zamjene Zn/Cd u MT, DDC dovodi do oksidacije cisteinskih ostataka MT u formu cistina (izazvano hvatanjem generisanih štetnih oksidirajućih radikala), što može uzrokovati oslobađanje vezanih metalnih jona (Cu, Zn, Se). Navedeno je potvrđeno i našim rezultatima (Giles i sar., 2003). Povišen nivo Se, vremenski ovisan ($p < 0,0001$), takođe se može objasniti indukcijom MT, kao što je slučaj i sa Zn (Lopez i sar., 2006).

Sadržaj Mg nije značajno izmijenjen tokom tretmana DSF (Grafik 5) što upućuje na rezistentnost hepatičnog metabolizma Mg u odnosu na sprovedenu eksperimentalnu proceduru.

Kontrolna grupa kojoj je administrirano maslinovo ulje, koje se koristi kao otapalo prilikom pripreme DSF za *per os* administriranje, pokazalo je nešto veću koncentraciju Cu u jetri, i značajno veću koncentraciju Fe i Zn u poređenju sa kontrolnom grupom kojoj je

administrirana fiziološka otopina (Tabela 5, 6, 7) što upućuje verovatno na redistribuciju ovih bioelemenata u odnosu na sprovedeni eksperimentalni postupak, dok se sadržaj Mg i Se ne razlikuje.

Ekspozicija etanolu i disulfiramu: Iako ekspozicija etanolu tokom 21 dana nije pokazala uticaj na sadržaj Cu, Zn i Se u jetri, uvođenjem DSF u nastavku tretmana dolazi do porasta koncentracije Cu i Zn tokom prvih 10 dana tretmana, nakon čega njihov sadržaj opada do kontrolnih vrijednosti, dok je porast koncentracije Se prisutan do završetka tretmana ($p < 0,0001$) (Grafik 2, 4, 6). Porast koncentracije Cu, Zn i Se nastaje usljed DDC oksidacije cisteinskih ostataka MT u formu cistina pri čemu dolazi do oslobađanja metalnih jona vezanih za MT, kao što je ranije navedeno.

Porast koncentracije Fe je po završetku kombinovanog tretmana veći u odnosu na individualnu ekspoziciju etanolu ($p < 0,008$), što znači da i DSF daje doprinos porastu koncentracije Fe (Grafik 3).

Uticaj na sadržaj Mg nije zabilježen (Grafik 5).

Ekspozicija kadmijumu i disulfiramu: Kombinovana ekspozicija Cd i DSF uzrokovala je aditivni efekat u povećanju koncentracije Fe i Zn, te umjereno povećanje Cu i Se u jetri, u poređenju sa efektima ostvarenim usljed individualne ekspozicije Cd i DSF (Grafik 2, 3, 4, 6). U datim grupama postignut je i najviši nivo akumulacije Cd u jetri, vjerovatno usljed enterohepatičkog kruženja DSF i nastanka Cd-DDC kompleksa, što zapravo ukazuje da bi transport Cd u hepatocitima putem žučnih kanalića mogao biti povezan sa bilijarnom ekskrecijom GSH (Arroyo i sar., 2014). Data pojava ukazuje na povećan rizik za jetru kod alkoholičara-pušača koji su podvrgnuti terapiji DSF. Izmjene Cu/Zn sa Cd, bilo da se dešavaju u aktivnom centru SOD, MT ili kompleksima sa DDC (Cu-DDC i Cd-DDC), su mogući mehanizmi djelovanja koji se javljaju kod kombinovane primjene Cd i DSF (Lihua i sar., 2008).

Sličan sadržaj Se je zabilježen u grupama izloženim samo Cd i kombinovanoj ekspoziciji Cd i DSF, u oba slučaja veći u odnosu na kontrolnu vrijednost (Cd_{1-21} : $p < 0,01$, Cd_{1-42}/DSF_{22-42} $p < 0,001$) (Grafik 6).

Sadržaj Mg ni prilikom kombinovane ekspozicije nije izmijenjen (Grafik 5).

Ekspozicija kadmijumu, etanolu i disulfiramu: Kombinovana ekspozicija Cd, etanola i DSF uzrokovala je aditivni efekat u povećanju koncentracije Cu i Fe, te potenciran efekat na povećanje Zn koji je u pozitivnoj relaciji sa dužinom ekspozicije u poređenju sa efektima ostvarenim usljed individualne ekspozicije Cd, etanolu i DSF (Grafik 2, 3, 4, 6). Promjene u

koncentraciji Se su najviše izražene nakon 10. i 21. dana i znatno su veće u odnosu na sve druge grupe (Grafik 6.). Depozicija Cd u jetri je značajno veća u odnosu na koekspoziciju Cd i etanolu ($p < 0,013$), dok se ne razlikuje značajno u odnosu na individualnu ekspoziciju Cd tokom 42 dana (Grafik 1).

Uticaj na koncentraciju Mg u jetri zabilježen je samo u najdužoj oglednoj grupi i ispoljava se kao smanjenje u odnosu na grupu kojoj je aplikovan Cd i grupu koja je 21 dan dobijala Cd i alkohol (Grafik 5).

5.3. Efekti na parametre oksidativnog stresa u jetri

Ekspozicija kadmijumu i/ili etanolu: Antioksidativni enzim SOD (učestvuje u konverziji $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2) se javlja u tri različite forme: intracelularna Cu/Zn SOD (prisutna u citosolu i jedru) i mangan (Mn) SOD (prisutna u mitohondrijima), i ekstracelularna Cu/Zn SOD (ecSOD). Date izoforme enzima označavaju se i kao SOD1, SOD2 i SOD3 (Arroyo i sar., 2014). Ukupna aktivnost SOD (tSOD) predstavlja sumu aktivnosti sve tri izoforme. Postepeno smanjenje tSOD aktivnosti zabilježeno je u svim Cd grupama (Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂: $p < 0,0001$) (Grafik 7), što je praćeno i očekivanim porastom sadržaja $O_2^{\bullet-}$ ($p < 0,0001$) (Grafik 9). Inhibirani enzim podrazumijeva nedovoljnu sekvestraciju $O_2^{\bullet-}$. Povećana produkcija $O_2^{\bullet-}$ može biti i posljedica aktivacije Kupferovih ćelija usljed povrede jetre koja nastaje zbog ekspozicije Cd (Kayama i sar., 1995). Kadmijum uzrokuje izmjenu topografije enzima (citosolne i mitohondrijalne SOD) usljed reverzibilnog vezivanja za -SH grupe cisteinskih ostataka i izmjenom sa jonima Cu i/ili Mn u aktivnom mjestu Cu/Zn SOD i/ili MnSOD.

U skladu sa prethodno publikovanim rezultatima, u Cd grupama zabilježen je veoma rano (od 1. dana) porast nivoa MDA koji se održavao u svim posmatranim terminima ($p < 0,0001$) (Grafik 8) (Arroyo i sar., 2014). Navedeno može biti odraz nastalih promjena u produkciji $O_2^{\bullet-}$, odnosno u aktivnosti antioksidativnih enzima.

U skladu sa ovim su i rezultati smanjene aktivnosti CAT (Cd₁₋₂₁: $p < 0,001$; Cd₁₋₄₂: $p < 0,0001$), što se može objasniti vezivanjem Cd za imidazolne ostatke His-74 u strukturi enzima (Liu i sar., 1990) (Grafik 10) i što ukazuje na nedovoljno prevođenje H_2O_2 u H_2O . Dobro je poznato da GPx takođe učestvuje u konverziji H_2O_2 u H_2O , i dodatno konverziji lipidnih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH) (Li i sar., 2000). Akumuliranjem H_2O_2 javlja se mogućnost njegovog homolitičkog cijepanja u HO^{\bullet} , koji trenutno inicira LPO. Nadalje, povećan sadržaj Fe i Cu doprinosi formiranju HO^{\bullet} kroz Fentonovu reakciju, što objašnjava progresivni razvoj LPO (Djukic i sar., 2012).

Rezultati su pokazali da je porast LPO neovisan o aktivnosti GPx (u svim eksperimentalnim grupama) (Prilog 4). Tretman Cd je rezultirao postepenim porastom GPx aktivnosti (Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂: $p < 0,0001$) (Grafik x), što je u suprotnosti sa prethodno publikovanim izvještajima o efektu Cd na GPx aktivnost (Arroyo i sar., 2014).

Smanjenje aktivnosti GST u Cd grupama je u skladu sa rezultatima dobivenim drugim studijama na životinjama (Arroyo i sar., 2014; Yamano 1999 i sar.; Jurczuk i sar., 2003). Nastala redukcija aktivnosti GST može se objasniti vezivanjem Cd za –SH grupu GSH, koji je substrat datog enzima (Djukic i sar., 2012). U saglasnosti s navedenim, dobiveni rezultati ukazuju na vezu između postepenog smanjenja aktivnosti GST (Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂: $p < 0,0001$) (Grafik 18) i značajnog pražnjenja rezervi GSH u jetri (Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂: $p < 0,0001$) (Grafik 11), odnosno potvrđen je visok afinitet vezivanja Cd za –SH grupu (Begic i sar., 2016).

Glutation nije samo substrat za GST, nego i donor redukcionih ekvivalenata u reakciji koju katalizira GPx (redukcija ROOH i H₂O₂, pri čemu GSH biva oksidiran u GSSG). Takođe ima značajnu ulogu u reakcijama detoksifikacije toksičnih metala (Lihua i sar., 2008). Pored toga, značajna je uloga GSH u reakciji sa intermedijernim metabolitima sa kojima formira konjugate merkapturane kiseline u drugoj fazi biotransformacije (Kalsi i sar., 2011). Snižena aktivnost GST upućuje na to da se iscrpljivanje zaliha GSH u jetri ne dešava na račun reakcija tiolizacije (Grafik 18). Od ranije je poznato da GST katalizira tiolizaciju terminalnih produkata LPO i podstiče aktivnost GPx nad ROOH (Muller, 1986; Li i sar., 2000). Stoga je i vjerovatno da se povećana LPO u Cd grupama dešava usljed neprikladne konverzije ROOH zbog smanjene aktivnosti GST (Djukic i sar., 2012).

Narušavanje homeostaze glutaciona se zapravo smatra ključnim elementom u hepatotoksičnosti induciranoj Cd (Arroyo i sar., 2014). Glutationski ciklus predstavlja osnovu anitoksidativnog odgovora na OS potaknut u organizmu egzogenim/endogenim faktorima. Homeostaza glutationskog (tiol-disulfid) redoks pufer sistema u ćelijama definisana je odnosom GSSG/GSH. Pri fiziološkim uslovima u organizmu, redukovana forma glutaciona je dominantno zastupljena (~ 90 % od ukupnog sadržaja glutaciona). Pražnjenje rezervi GSH je u direktnoj vezi sa nastankom OS, pri čemu uglavnom dolazi do oksidacije glutaciona u disulfidnu formu (GSSG), izuzev u reakcijama konjugacije i/ili helacije kada je izostavljena oksidacija u GSSG. Stoga se i povišen odnos GSSG/GSH smatra senzitivnim biomarkerom u bolestima/trovanjima posredovanim OS (Djukic i sar., 2012), što je slučaj i sa trovanjem Cd. Zabilježeni povišen GSSG/GSH odnos u Cd grupama, ukazuje na aktivno učešće glutationskog ciklusa u nastanku OS (Grafik 14) (Begic i sar., 2016). Postepeno smanjenje sadržaja GSH javlja se od samog početka tretmana ($p < 0,0001$)

(Grafik 11), vjerovatno kao posljedica vezivanja GSH i Cd u kompleks. Sadržaj GSSG je u porastu do 10. dana tretmana ($p < 0,0001$) (Grafik 12), nakon čega nastupa smanjenje do nivoa kontrolnih vrijednosti po završetku tretmana. Navedeno upućuje na povećanu produkciju slobodnih radikala u Fentonovoj reakciji sa tranzicijskim metalima i inhibiciju antioksidativnih metaloenzima, pri čemu je oslabljena antioksidativna uloga GSH koji je vezan u kompleks Cd-GS₂.

Za održavanje fiziološkog GSSG/GSH odnosa u ćelijama, od izuzetnog značaja je flavoprotein GR, enzim odgovoran za kataliziranje redukcije oksidirane forme glutationa, pri čemu je NADPH neophodan kao donor elektrona. Nedovoljan obrt GSSG-a u GSH, zbog postepenog smanjenja GR aktivnosti u Cd grupama (Cd₁₋₂₁: $p < 0,001$ i Cd₁₋₄₂: $p < 0,0001$) (Grafik 17) je u saglasnosti sa prethodno publikovanim izvještajima o inhibiciji GR usljed ekspozicije Cd (Arroyo i sar., 2014).

Smanjenje aktivnosti tSOD zabilježeno je od 10. dana ekspozicije etanolu do završetka tretmana (A₁₋₂₁: $p < 0,002$) (Grafik 7), što je praćeno i očekivanim postepenim porastom sadržaja O₂^{•-} (A₁₋₂₁: $p < 0,0001$) (Grafik 9). Redukcija SOD aktivnosti usljed ekspozicije etanolu u saglasnosti je sa prethodnim publikacijama (Kessova i Cederbaum, 2007; Nordmann, 1992). Ekspozicija etanolu dovodi do smanjenja aktivnosti CAT od početka tretmana (A₁₋₂₁: $p < 0,0001$) (Grafik 10), što prethodi smanjenju aktivnosti Cu/Zn SOD. Budući da O₂^{•-} mogu inaktivirati CAT, a H₂O₂ Cu/Zn SOD, povećana produkcija O₂^{•-} može inicirati narušavanje funkcije oba enzima (Nordmann, 1992). Neki autori su publikovali i porast aktivnosti SOD, što bi se moglo dovesti u vezu sa razlikama u administriranoj dozi i vremenu ekspozicije (Das i Vasudevan, 2005).

Inhibirani enzim podrazumijeva nedovoljnu sekvestraciju O₂^{•-}. Povećana produkcija O₂^{•-}, koja se dešava i prije smanjenja aktivnosti tSOD, može biti posljedica: a) metabolizma etanola putem P450IIE1 u mikrozomima, te ksantin i/ili aldehid oksidaza u citosolu ili funkcije mitohondrijalnog respiratornog lanca; b) aktivacije Kupferovih ćelija koje oslobađaju prostaglandin E2, što rezultira povećanom metaboličkom aktivnosti hepatocita i većoj potrošnji kisika. Etanolom indukovani enzim P450IIE1 redukuje molekulu kisika u O₂^{•-} i H₂O₂. Izuzev povećane produkcije ROS, oštećenju mikrozomalnih struktura doprinose i slobodni radikali izvedeni iz molekule etanola. Hidroksil radikali, nastali u Fentonovoj reakciji između Fe i H₂O₂ su oksidirajući agensi koji etanol oksidiraju do 1-hidroksietil radikala (•OH odvaja atom H od C1 atoma u molekuli etanola) (Lu i Cederbaum, 2008). Prilikom oksidacije etanola nastaju i 2-hidroksietil radikal i etoksil radikal, dok oksidacijom

acetaldehida nastaje acetil radikal (Nordmann, 1992). Povećan odnos NADH/NAD⁺ usljed akutne/subakutne ekspozicije etanolu takođe doprinosi generisanju O₂^{•-} povećavajući protok elektrona duž respiratornog lanca. Izmjena u odnosu NADH/NAD⁺ nastaje usljed katalitičkog dejstva i ADH i ALDH (NADH nastaje redukcijom NAD⁺). Nastali NADH mora biti oksidovan u mitohondrijama putem oksidativne fosforilacije koja zahtijeva potrošnju kisika. Kako bi obezbijedili dovoljno kisika za prihvatanje elektrona sa NADH, hepatociti moraju povećati preuzimanje kisika iz krvi, zbog čega se hepatociti i grupišu u okolini jetrene arterije, usljed čega je ograničeno snabdijevanje kisikom drugih regija jetre, tačnije hipoksija zahvata perivenozne hepatocite.

Generisani ROS su toksični za ćelije budući da reaguju sa makromolekulama - inaktiviraju enzime i denaturišu proteine, te uzrokuju oštećenje DNA (raskidaju veze ili modifikuju/uklanjaju baze) što može rezultirati mutacijama. Uzrokujući peroksidaciju lipida dovode do oštećenja membrana, pri čemu nastaju reaktivni aldehidni produkti kao što su MDA i 4- hidroksinonenal (McCord, 1998; Dey i Cederbaum, 2006). Rezultati su potvrdili porast nivoa MDA (A₁₋₂₁: p < 0,0001) (Grafik 8). Direktni toksični efekti etanola, koji podrazumijevaju da etanol djeluje kao solvent na biološke membrane, prije nego metabolički, pogoduju nastanku LPO (Shaw, 1989). U jetri, MDA i acetaldehid reaguju sinergistički sa proteinima i formiraju hibridne proteinske adukte (MAA adukte). Nastali adukti mogu izazvati potentni imunski odgovor (Tuma, 2002). Zapravo, acetaldehid i ROS reagujući sa biomolekulama u ćelijama učestvuju u formiranju različitih stabilnih i nestabilnih adukta. Tako acetaldehid ima veći afinitet prema određenim aminokiselinama (lizin, cistein i aromatične aminokiseline) u proteinima, uključujući i P450IIE1.

Alkoholom inducirano oštećenje jetre dovodi se u vezu kako sa povećanjem LPO tako i sa smanjenjem antioksidativne zaštite u jetri, naročito nivoa GSH (Tsukamoto, 2001; Bai i Cederbaum, 2006). Veza između nivoa GSH i etanolom indukovane LPO još uvijek nije razjašnjena. Smanjenje nivoa GSH bi mogao biti ili uzrok LPO ili nastati kao rezultat LPO (Shaw, 1989).

Zapravo, efekti etanola na nivo GSH u jetri su oprečni u raznim studijama i variraju od smanjenja, porasta do neizmijenjenog sadržaja GSH (Dey i Cederbaum, 2006; Cederbaum, 1989). Iako je većina studija ipak pokazala smanjenje sadržaja GSH u jetri usljed akutne/subakutne ekspozicije etanolu, saznanja o mehanizmima koji do toga dovode su oprečna pri čemu se navodi sljedeće: a) stvaranje adukta između acetaldehida i GSH (manje značajna uloga zbog toga što teško dolazi do stabilne konjugacije sa GSH i potrebne su

visoke koncentracije acetaldehida); b) povećana oksidacija glutationa usljed generisanja ROS (u nekim studijama pak nije zabilježen niti porast sadržaja GSSG, niti GSSG/GSH odnosa, i nije zabilježena pojačana bilijarna ekskrecija GSH ili GSSG); c) smanjena sinteza glutationa i povećan efluks glutationa iz jetre (Shaw, 1989). Rezultati naše studije su pokazali postepeno pražnjenje nivoa GSH do 10. dana tretmana (A_{1-10} : $p < 0,006$) (Grafik 11), dok je nivo GSH po završetku tretmana vraćen na nivo kontrolne vrijednosti, što ukazuje na to da sinteza glutationa nije narušena. Takođe, zabilježeno smanjenje nivoa GSSG od početka tretmana ($p < 0,0001$) (Grafik 12) ukazuje na to da zabilježena umjerena redukcija nivoa GSH nije na račun oksidacije glutationa. U skladu s navedenim i odnos GSSG/GSH je ispod kontrolne vrijednosti po završetku tretmana (Grafik 15).

Povećana aktivnost GST, zabilježena od početka tretmana ($p < 0,0001$) (Grafik 18), upućuje na to da se umjereno iscrpljivanje zaliha GSH vjerovatno dešava na račun reakcija tiolizacije. Budući da aktivnost GST nije narušena, enzim obavlja svoju fiziološku funkciju, katalizira tiolizaciju terminalnih produkata LPO (reaktivne intermedijere i lipidne aldehide) i konverziju ROOH, te je porast LPO vjerovatno rezultat dejstva Fe i ROS. Prethodne studije su zabilježile oprečne efekte na aktivnost GST usljed akutne/subakutne ekspozicije etanolu, kako smanjenje (Nordmann, 1992) tako i porast aktivnosti (Das i Vasudevan, 2005), što je u vezi sa administriranim dozama i vremenom ekspozicije.

Različite studije su zabilježile i odsustvo efekta (Nordmann, 1992) ili smanjenje aktivnosti GPx (Das i Vasudevan, 2005) u jetri pacova nakon akutne/subakutne ekspozicije etanolu.

Rezultati naše studije su pokazali nepromijenjenu aktivnost GR koja je u nivou kontrolne vrijednosti tokom cijelog tretmana (Grafik 17). Ovo odgovara zabilježenom smanjenom nivou GSSG, odnosno odsustvu potrebe za obrtom GSSG-a u GSH. Publikovano je i smanjenje aktivnosti GR nakon intoksikacije alkoholom, što može biti u vezi sa administriranom dozom i vremenom ekspozicije (Das i Vasudevan, 2005).

Smanjenje aktivnosti tSOD zabilježeno je kao rezultat koekspozicije Cd i etanola ($p < 0,0001$ u odnosu na kontrolnu vrijednost) (Grafik 7). Redukcija aktivnosti enzima je istog nivoa kao i usljed individualne ekspozicije Cd ili etanolu, odnosno njihov efekat nije zbirni. Rezultati sadržaja Cu u jetri ukazuju da je usljed kombinovanog tretmana manji stepen zamjene Cu i Cd jona, što dovodi i do manje redukcije tSOD aktivnosti.

Suprimirana aktivnost enzima je u skladu sa zabilježenim porastom nivoa $O_2^{\bullet-}$ ($p < 0,0001$) (Grafik 9), koji je značajno veći u odnosu na porast u Cd_{1-21} grupi ($p < 0,006$), dok se ne razlikuje značajno od porasta zabilježenog u A_{1-21} grupi. Koekspozicija zapravo dovodi

do većeg porasta nivoa $O_2^{\bullet-}$ nego individualna ekspozicija Cd ili etanolu, iako efekat nije zbirni.

Za razliku od smanjenja aktivnosti CAT tokom individualne ekspozicije Cd ili etanolu, koekspozicija je rezultirala značajnim porastom aktivnosti enzima ($p < 0,0001$) (Grafik 10), što ostaje nerazjašnjeno. Visoka aktivnost enzima ukazuje na nizak sadržaj H_2O_2 što smanjuje mogućnost stvaranja potentnog $\cdot OH$ radikala kroz Fentonovu reakciju i umanjuje stepen LPO, što je i potvrđeno našim rezultatima. Porast nivoa MDA zabilježen je od početka tretmana ($p < 0,0001$) (Grafik 8) i značajno je iznad porasta zabilježenog u Cd₁₋₂₁ gupi ($p < 0,0001$), dok je istog nivoa kao i u A₁₋₂₁ grupi, odnosno efekat nije zbirni.

Koekspozicija Cd i etanola nije dovela do promjene GSH što se značajno razlikuje u poređenju sa pojedinačno intoksiciranim Cd₁₋₂₁ i A₁₋₂₁ grupama ($p < 0,0001$) (Grafik 11). Za očekivati je bilo da će Cd uzrokovati pražnjenje rezervi GSH u jetri, kao što je zabilježeno kod individualne ekspozicije Cd, budući da individualna ekspozicija etanolu nije pokazala efekat. Navedeno upućuje da ipak nije došlo do većeg stepena vezivanja Cd za -SH grupu glutationa. Vjerovatno je došlo do izmjene dijela sadržaja Cd sa dvovalentnim jonima Fe u različitim citoplazmatskim i membranskim proteinima (ferritin i Fe-S proteini), budući da je zabilježen najveći porast sadržaja Fe u jetri nakon koekspozicije (Grafik 3), dok je sadržaj drugih bioelemenata pretrpio manje promjene. Nivo GSSG-a je po završetku tretmana u nivou kontrolne vrijednosti (Grafik 12), odnosno nije ozbiljno narušen odnos GSSG/GSH (Grafik 16).

Glutationski status je potvrđen i zabilježenom aktivnosti GR, koja je po završetku tretmana u nivou kontrolne vrijednosti, odnosno odsustvo obrta GSSG u GSH (Grafik 17). Ostaje nerazjašnjeno zašto kombinacija Cd i etanola, od kojih su obje supstance induktori jetrenog P450IIE1 enzima (Muller, 1986; Dey i Cederbaum, 2006), ne smanjuje značajno NADPH, donora redukcionih ekvivalenata za GR, odnosno ne inhibira aktivnost GR. S druge strane, indukcija P450IIE1 enzima može biti uzrok većeg porasta $O_2^{\bullet-}$ u poređenju sa individualnom ekspozicijom Cd ili etanolu.

Aktivnost GST je povišena nakon koekspozicije Cd i etanolu ($p < 0,0001$ u odnosu na kontrolnu vrijednost), iako je kod individualne ekspozicije Cd uzrokovao smanjenje aktivnosti GST ($p < 0,0001$) (Grafik 18). Dovoljne rezerve GSH, koji je substrat za GST, omogućavaju normalnu funkciju enzima.

Ekspozicija disulfiramu: Postepeni pad tSOD aktivnosti ($p < 0,0001$) (Grafik 7) praćen je postepenim značajnim porastom $O_2^{\bullet-}$ ($p < 0,0001$) (Grafik 9), usljed nedovoljne sekvestracije radikala, u čemu se ogleda prooksidativni učinak DSF. Inhibirana aktivnost

Cu/Zn SOD posljedica je formiranja Cu-DDC-a (Stohs i sar., 2000; Brady i sar., 1991; Ishiyama i sar., 2000). Prekomjerna produkcija $O_2^{\bullet-}$ nije rezultat isključivo inhibicije tSOD aktivnosti. Mogući putevi produkcije $O_2^{\bullet-}$ uključuju: a) intramolekularno kruženje radikala tiolnih molekula (uključujući GSH, DDC, itd.), što rezultira prekomjernom produkcijom tiil radikala (GSS^{\bullet}) i $O_2^{\bullet-}$ ($O_2^{\bullet-}$ je negativno koreliran sa GSSG kod Cd₁₋₄₂ i DSF grupa) (Prilog 4); b) inhibiciju ALDH (Spiazzi i sar., 2013; Casalino i sar., 2002) i c) efekat na jetreni P450IIE1 enzim (Ishiyama i sar., 2000; Spiazzi i sar., 2013; Muller, 1986).

Aktivnost CAT je povišena u DSF grupama (DSF₁₋₂₁: $p < 0,0001$) (Grafik 10). Nedovoljna sekvestracija $O_2^{\bullet-}$ podrazumijeva smanjenju produkciju H_2O_2 , stoga ostaje nerazjašnjeno zašto je zabilježena povišena aktivnost CAT.

Ekspozicija DSF nije imala uticaj na sadržaj GSH, a zabilježen je i porast GST aktivnosti (DSF₁₋₂₁: $p < 0,0001$) (Grafik 18).

Lipidna peroksidacija nije nastala kao posljedica smanjenja sadržaja GSH u DSF grupama, za razliku od Cd grupa, što je ujedno i potvrda snažne uloge DSF u antioksidativnoj zaštiti glutaciona (očuvanju glutaciona). Takođe je po završetku tretmana zabilježen nizak nivo GSSG-a (DSF₁₋₂₁: $p < 0,0001$) (Grafik 12), što je potvrda očuvanja GSH. Oksidacija GSH se dešava u reakcijama u kojima je GSH donor redukcionih ekvivalenata (kao što je reakcija koju katalizira GPx). Dobiveni rezultati su u saglasnosti sa profilom GSSG/GSH odnosa i smanjenom GR aktivnosti po završetku tretmana (Grafik 17). Primjećena nedosljednost trenda GSSG/GSH odnosa tokom 21 dana tretmana DSF odgovara promjenama odnosa DSF/DDC, koji čine redoks par aktivan u biološkom medijumu (Grafik 19) (DDC prestaje biti dostupan u slobodnoj formi usljed vezivanja za metale ili kroz reakcije tiolizacije, odnosno postaje dostupan oslobađanjem iz veze sa metalima) (Liu i sar., 2008). Bez obzira na promjene u GSSG/GSH odnosu tokom tretmana DSF, dati odnos je po završetku tretmana značajno niži u odnosu na kontrolnu vrijednost (četiri puta niža vrijednost), što takođe potvrđuje protektivnu ulogu DSF.

Kontrolna grupa kojoj je administrirano maslinovo ulje, koje se koristi kao otapalo prilikom pripreme DSF za *per os* administriranje, pokazalo je značajno niži sadržaj MDA i određene razlike u aktivnosti enzima AOS (niža aktivnost SOD i GST, te veća aktivnost GR) u poređenju sa kontrolnom grupom kojoj je administrirana fiziološka otopina (Tabela 8, 9, 10, 11).

Ekspozicija etanolu i disulfiramu: Po završetku kombinovanog tretmana tSOD aktivnost je na istom stepenu inhibicije kao i nakon individualne ekspozicije etanolu (Grafik 7), dok je od početka uvođenja DSF u tretman zabilježeno smanjenje nivoa $O_2^{\bullet-}$ ($p < 0,009$). Sadržaj

$O_2^{\bullet-}$ je po završetku tretmana i dalje povišen u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,0001$) (Grafik 9).

Uvođenje DSF u tretman je dovelo do značajnog porasta aktivnosti CAT (A_{1-21}/DSF_{22-42} : $p < 0,0001$) (Grafik 10), što je suprotno od efekta samog DSF. Smanjenje sadržaja $O_2^{\bullet-}$ omogućilo je obnovu funkcije CAT (inaktiviran enzim kod individualne ekspozicije etanolu zbog visokog nivoa $O_2^{\bullet-}$). Smanjena produkcija $O_2^{\bullet-}$ može biti rezultat oprečnog uticaja etanola kao induktora i DSF kao inhibitora jetrenog P450IIE1 enzima, pri čemu DSF smanjuje produkciju $O_2^{\bullet-}$ u poređenju sa individualnom ekspozicijom etanolu.

Iako u padu u odnosu na A_{1-21} grupu (A_{1-21}/DSF_{22-42} : $p < 0,0001$), zabilježeni nivo MDA je ipak iznad kontrolne vrijednosti po završetku kombinovanog tretmana (29%) ($p < 0,012$) (Grafik 8). Značajno umanjena LPO (djelimično zbog aktivnosti CAT koja smanjuje mogućnost nastanka $\cdot OH$, i dijelom zbog efikasne funkcije GST) ukazuje na djelimično protektivni efekat DSF.

Uvođenje DSF u tretman nakon subakutne ekspozicije etanolu dovodi zapravo do smanjenja nivoa GSH u poređenju sa individualnom ekspozicijom etanolu ($p < 0,0001$) pri kojoj nije zabilježena promjena GSH (Grafik 11). Zabilježeni nivo GSSG-a ispod kontrolne vrijednosti ($p < 0,0001$) (Grafik 12), potvrđuje razlog aktivnosti GR u nivou kontrole (Grafik 17). Dakle, smanjenje nivoa GSH ne dešava se na račun oksidacije u GSSG, nego zbog reakcija tiolizacije, što je potvrđeno visokom aktivnosti GST u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,0001$) (Grafik 18). Lipidna peroksidacija ne nastaje usljed praznjenja rezervi GSH čime se potvrđuje antioksidativno delovanje DSF.

Ekspozicija kadmijumu i disulfiramu: Po završetku kombinovanog tretmana, tSOD aktivnost je u nivou kontrolnih vrijednosti (aktivnost je inhibirana nakon individualne ekspozicije Cd) (Grafik 7), dok je sadržaj $O_2^{\bullet-}$ i dalje povišen (Grafik 9). Može se pretpostaviti da je reakcija između DDC-a i Cd prevladala reakciju formiranja Cu-DDC-a, što je omogućilo restauraciju topografije SOD (tSOD aktivnost je značajno povišena u Cd_{1-42}/DSF_{22-42} u odnosu na Cd_{1-42} grupu: $p < 0,0001$) (Grafik 7).

Inhibicija CAT aktivnosti (Cd_{1-42}/DSF_{22-42} : $p < 0,01$) (Grafik 10) nastaje vjerovatno usljed vezivanja Cd za imidazolne ostake His-74 u strukturi CAT, kao što je slučaj i kod individualne ekspozicije Cd.

Povećana produkcija $O_2^{\bullet-}$ uključuje iste puteve nastanka kao i ekspozicija samo Cd ili DSF. Jedan od navedenih puteva produkcije $O_2^{\bullet-}$, efekat na jetreni P450IIE1 enzim, može služiti u svrhu objašnjenja za status GR aktivnosti prilikom individualne/kombinovane ekspozicije Cd i DSF.

Kadmijum inducira jetreni P450IIE1 enzim, usljed čega može smanjiti dostupnost NADPH koji je donor redukcionih ekvivalenata za GR, stoga i inhibirati aktivnost GR (Muller, 1986). Protivno tome, DSF inhibira jetreni P450IIE1 enzim, i na taj način sprečava/umanjuje CYP2E1- posredovanu toksičnost ksenobiotika i posljedično stvaranje $O_2^{\bullet-}$, odnosno iniciranje lančane reakcije radikala koja vodi nastanku OS (Mankhetkorn i sar., 1994). Prethodno inhibirana GR aktivnost, usljed ekspozicije Cd, vraćena je na nivo kontrolne vrijednosti po završetku kombinovanog tretmana (GR aktivnost je značajno povišena u Cd_{1-42}/DSF_{22-42} u odnosu na Cd_{1-42} grupu: $p < 0,0001$) (Grafik 17).

Iako smanjen u odnosu na Cd_{1-42} grupu (Cd_{1-42}/DSF_{22-42} : $p < 0,0001$), zabilježeni nivo MDA je ipak iznad kontrolne vrijednosti po završetku kombinovanog tretmana (56%) ($p < 0,0001$) (Grafik 8). Značajno umanjena LPO ukazuje na djelimično protektivni efekat DSF.

Smanjen sadržaj GSH usljed ekspozicije Cd tokom prvog dijela tretmana (21 dan) je korigovan 10 dana nakon uvođenja DSF u tretman. Međutim, po završetku tretmana sadržaj GSH je značajno niži u odnosu na kontrolnu vrijednost (Cd_{1-42}/DSF_{22-42} : $p < 0,0001$) (Grafik 11). Povećana aktivnost GST (Cd_{1-42}/DSF_{22-42} : $p < 0,0001$) (Grafik 18), ukazuje da se smanjenje sadržaja GSH dešava na račun reakcija tiolizacije, te da preovladava formiranje Cd-DDC u odnosu na Cd-GS₂ kompleks.

Lipidna peroksidacija ne nastaje usljed praznjenja rezervi GSH (Grafik 8), čime je potvrđena antioksidativna uloga DSF. Kao što je zabilježeno i kod individualne ekspozicije DSF, sadržaj GSSG-a je značajno niži u odnosu na kontrolnu vrijednost (Cd_{1-42}/DSF_{22-42} : $p < 0,0001$) (Grafik 12). Dati nivo GSSG-a je značajno niži i u odnosu na vrijednost u Cd_{1-42} grupi ($p < 0,0001$) (Grafik 12), što je rezultiralo i skoro dvostruko nižom vrijednosti GSSG/GSH odnosa. Rezultati su saglasni sa prethodnim izvještajima o protektivnoj ulozi DDC-a kod Cd inducirane hepatotoksičnosti, zahvaljujući formiranju Cd-DDC helata. Navedeni kompleks nema veliki terapijski značaj zbog brze razgradnje *in vivo* (Jurczuk i sar., 2004), stoga je i njegova protektivna uloga djelimična.

Ekspozicija kadmijumu, etanolu i disulfiramu: Po završetku kombinovanog tretmana tSOD aktivnost je i dalje ispod nivoa kontrolne vrijednosti ($p < 0,0001$), iako značajno iznad vrijednosti zabilježene nakon koekspozicije Cd i etanola ($p < 0,01$) i Cd_{1-42} grupe ($p < 0,012$) (Grafik 7). Djelimična restauracija aktivnosti SOD, u ovom slučaju nije isključivo rezultat reakcije između DDC-a i Cd, budući da visok sadržaj Cu u jetri ukazuje da ipak dolazi do izmjene jona Cu i Cd ($p < 0,0001$ u odnosu na koekspoziciju Cd i etanola) (Grafik 2). Uvođenje DSF u tretman dovelo je do značajnog smanjenja nivoa $O_2^{\bullet-}$ u odnosu na

individualnu ekspoziciju/koeekspoziciju Cd i etanola ($p < 0,0001$), iako je sadržaj i dalje iznad kontrolne vrijednosti (59%) ($p < 0,0001$) (Grafik 9).

Iako koeekspozicija Cd i etanola dovodi do porasta aktivnosti CAT, uvođenje DSF u tretman je rezultiralo smanjenom aktivnosti, koja je u nivou vrijednosti zabilježene nakon individualne ekspozicije Cd tokom 42 dana (Grafik 10), što ukazuje na to da inhibicija CAT aktivnosti nastaje vjerovatno usljed vezivanja Cd za imidazolne ostake His-74 u strukturi CAT, kao što je slučaj i kod individualne ekspozicije Cd.

Iako smanjen u odnosu na individualnu ekspoziciju/koeekspoziciju Cd i etanola ($p < 0,0001$), zabilježeni nivo MDA je iznad kontrolne vrijednosti po završetku kombinovanog tretmana (29%) ($p < 0,0001$) (Grafik 8). Značajno umanjena LPO ukazuje na djelimično protektivni efekat DSF.

Uvođenje DSF u tretman je nakon 10 dana korigovalo smanjen sadržaj GSH nakon koeekspozicije Cd i etanola (42% iznad kontrolne vrijednosti). Međutim, po završetku tretmana sadržaj GSH je značajno niži u odnosu na kontrolnu vrijednost ($p < 0,0001$) (Grafik 11). Smanjena aktivnost GST u poređenju sa koeekspozicijom Cd i etanola ($p < 0,0001$) (Grafik 18), iako i dalje dvostruko iznad kontrolne vrijednosti, ukazuje da se smanjenje sadržaja GSH ne dešava isključivo na račun reakcija tiolizacije, te da prvobitni porast sadržaja GSH nastaje zbog formiranja Cd-DDC kompleksa, dok po završetku tretmana vjerovatno prevladava formiranje Cd-GS₂ kompleksa čime je i sadržaj GSH značajno niži (ref).

Iako je povišen sadržaj GSSG-a do 10. dana od uvođenja DSF u kombinovani tretman, po završetku tretmana je sadržaj GSSG-a značajno niži i u poređenju sa kontrolnom grupom i koeekspozicijom Cd i etanolu ($p < 0,0001$) (Grafik 12). Kombinovani tretman rezultira i dvostruko nižim odnosom GSSG/GSH (Grafik 22). Nije zabilježena razlika u GR aktivnosti ni nakon uvođenja DSF u tretman (Grafik 17).

6. ZAKLJUČAK

Sprovedena studija imala je primarno za cilj utvrđivanje mogućih zajedničkih mehanizama toksičnih efekata Cd i etanola na jetru, te potencijalne zaštitne uloge DSF, sa fokusom na predviđenu interferenciju tiolnih grupa metabolita DSF sa glutationskim odgovorom na OS indukovani ispitivanim agensima, u čemu se ogleda i doprinos u oblasti izučavanja štetnih efekata slobodnih radikala i antioksidativne zaštite. Dodatni cilj bila je analitika održavanja obje forme glutaciona.

U saglasnosti sa rezultatima studije izvedeni su sljedeći zaključci:

1. u nastanku OS, pri odabranoj dozi i vremenu ekspozicije Cd, aktivno učešće glutationskog ciklusa je potvrđeno povišenim GSSG/GSH odnosom, dok snižena aktivnost GST upućuje na to da se iscrpljivanje zaliha GSH u jetri ne dešava na račun reakcija tiolizacije, nego oksidacije u disulfidnu formu i formiranja Cd-GS₂ kompleksa;

2. GSSG/GSH odnos nije narušen pri odabranoj dozi i vremenu ekspozicije etanolu, što ukazuje na to da u nastanku OS učestvuju radikali generisani tokom njegovog metabolizma, koji sa katalitički aktivnim Fe, oslobođenim iz feritina, u Fentonovoj reakciji dovode do nastanka LPO;

3. koekspozicija Cd i etanola nije ozbiljno narušila GSSG/GSH odnos, što ukazuje na to da nije došlo do većeg stepena vezivanja Cd za -SH grupu glutaciona za razliku od pojave nakon individualne ekspozicije Cd, odnosno visok sadržaj Fe u jetri (iznad vrijednosti zabilježene nakon individualne ekspozicije Cd i etanolu) ukazuje na izmjenu iona Cd i Fe, pri čemu oslobođeno Fe reaguje sa H₂O₂ generisanim dismutacijom O₂^{•-} čiji je sadržaj povišen u odnosu na individualnu ekspoziciju;

4. hepatoprotektivni antioksidativni efekat DSF se ostvaruje kroz očuvanje homeostaze glutaciona (LPO ne nastaje kao posljedica smanjenja sadržaja GSH), odnosno promjene u GSSG/GSH odnosu odgovaraju promjenama odnosa redoks para DSF/DDC, što je i potvrda veze metabolita DSF sa glutationskim odgovorom;

5. uvođenje DSF u tretman nakon ekspozicije etanolu dovelo je do smanjenja produkcije O₂^{•-} i manjeg stepena LPO, koja ne nastaje usljed praznjenja rezervi GSH čime je potvrđena antioksidativna uloga DSF (smanjenje GSH se dešava na račun reakcija tiolizacije usljed visoke aktivnosti GST);

6. uvođenje DSF u tretman nakon ekspozicije Cd i nastavak koekspozicije rezultira nižim odnosom GSSG/GSH, odnosno djelimičnim očuvanjem rezervi GSH, što ukazuje na to da preovladava formiranje Cd-DDC u odnosu na Cd-GS₂ kompleks;

7. kombinovani tretman Cd, etanola i DSF rezultira nižim odnosom GSSG/GSH, što ukazuje na protektivni efekat DSF usljed formiranja Cd-DDC kompleksa, koji brzo podliježe razgradnji *in vivo*, stoga i pruža djelimično protektivni efekat.

8. za procjenu učešća glutationskog ciklusa u nastanku OS kao važnog mehanizma toksičnosti mnogih ksenobiotika, kao i patoloških stanja, od izuzetnog je značaja analitika merenja obje forme glutaciona, GSH i GSSG, te je njihovo direktno i simultano određivanje jednostavnom HPLC-UV metodom koju smo postavili od izuzetnog značaja i doprinos našeg istraživanja rutinskoj analizi bioloških uzoraka.

7. LITERATURA

Adikwu E, Deo O, Geoffrey OBP. Hepatotoxicity of Cadmium and Roles of Mitigating Agents. *Br J Pharmacol Toxicol*. 2013; 4:222-231.

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.

Arroyo VS, Flores KM, Ortiz LB, Gomez-Quiroz LE, Gutierrez-Ruiz MC. Liver and Cadmium Toxicity. *J Drug Metab Toxicol*. 2012; S5

ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2012.

Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Florida. 1985. p. 123-32.

Badawy A, Bano S. Elevation of Kynurenine Metabolites in Rat Liver and Serum: A Potential Additional Mechanism of the Alcohol Aversive and Anti-cancer Effects of Disulfiram? *Alcohol Alcohol*. 2016; 51:20-26.

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.

Barth KS, Malcolm RJ. Disulfiram: An Old Therapeutic with New Applications. *CNS Neurol. Dis. – Drug Targets*. 2010; 9:5-12.

Bauman JW, Liu YP, Klaassen CD. Increase in metallothionein production by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991; 110:347-354.

Begic A, Djuric A, Gobeljic B, Stevanovic I, Lukic V, Stanojevic I, Ninkovic M, Saso L, Vojvodic D, Djukic M. The simple isocratic HPLC-UV method for the simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in animal tissue. *Acta Chromatographica* DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/1326.2017.29.1.5>

Begic A, Djuric A, Ninkovic M, Stevanovic I, Djurdjevic D, Pavlovic M, Jelic K, Pantelic A, Zebic G, Saso L, Dejanovic B, Stanojevic I, Vojvodic D, Milosavljevic P, Djukic M. Disulfiram moderately restores impaired hepatic redox status of rats subchronically exposed to cadmium. *J Enz Inh Med Chem*. 2017;32 (1):478-489.

Begrache K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol*. 2011; 54(4):773-94.

Bjornsson E, Nordlinder H, Olsson R. Clinical characteristics and prognostic markers in disulfiram-induced liver injury. *J Hepatol.* 2006; 44(4):791-7.

Blahova L, Kohoutek J, Lebedova J, Blaha L, Vecera Z, Buchtova M, Misek I, Hilscherova K. *Anal Bioanal Chemistry.* 2014; 406(24):5867-5876.

Brady JF, Xiao F, Wang MH, Li Y, Ning SM, Gapac JM, Yang CS. Effects of Disulfiram on Hepatic P450IIE1, Other Microsomal Enzymes, and Hepatotoxicity in Rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 108:366-373.

Brewer C, Meyers RJ, Johnsen J. Does disulfiram help to prevent relapse in alcohol abuse? *CNS Drugs.* 2000; 14(5):329-341.

Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 204(3):274-308.

Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Galazyn-Sidorczuk M, Rogalska J. Effect of short-term ethanol administration on cadmium retention and bioelement metabolism in rats continuously exposed to cadmium. *Alcohol Alcohol.* 2000; 35(5):439-445.

Casalino E, Calzaretti G, Sablano C, Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology.* 2002; 179(1-2):37-50.

Casarett LJ, Amdur MO, Klaassen CD, Doull J. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5th edition. 2012.

Cederbaum AI. Introduction: Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Radic Biol Med.* 1989; 7:537-539.

Cereser C, Guichard J, Draï J, Bannier E, Garcia I, Boget S, Parvaz P, Revol A. Sensitive and selective determination of glutathione in probiotic bacteria by capillary electrophoresis- laser induced fluorescence. *J Chromatogr B.* 2001; 752:123-132.

Checconi P, Squarabanti R, Celestino I, Limonqi D, Amatore D, Iuvara A, Alimonti A, Garaci E, Palamara AT, Nencioni L. The Environmental Pollutant Cadmium Promotes Influenza Virus Replication in MDCK Cells by Altering Their Redox State. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(2):4148-4162.

Chen L, Jin T, Huang B, Chang X, Lei L, Nordberg GF, Nordberg M. Plasma metallothionein antibody and cadmium-induced renal dysfunction in an occupational population in China. *Toxicol Sci.* 2006; 91(1):104-12.

Chick J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. *Drug Safety.* 1999; 20(5):427-435.

Cohn VH, Lyle J. A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochemistry*. 1966; 14:434-440.

Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:1511-1526.

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.

Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*. 2006; 43(2):S63-74.

Djukic M, Miljkovic B, Nedeljkovic M, Pokrajac M, Antonijevic B. Concentrations of two disulfiram metabolites: diethyldithiocarbamic acid and copper bis(diethyldithiocarbamate) in plasma samples of alcoholics after oral single dose of disulfiram. *Toxicol Lett*. 1998; 95(1):76.

Djukic M, Jovanovic M, Ninkovic M, Stevanovic I, Ilic K, Curcic M, Vekic J. Protective role of glutathione reductase in paraquat induced neurotoxicity. *Chem Bio Inter*. 2012; 199:74-86.

Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40:1889-1899.

EHC. Cadmium- Environmental health criteria (EHC) 134. International programme on Chemical safety. 1992. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>

Filipic M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat Res*. 2012; 733(1-2):69-77.

Frye RF, Tammara B, Cowart TD, Bramer SL. Effect of Disulfiram-Mediated CYP2E1 Inhibition on the Disposition of Vesnarinone. *J Clin Pharmacol*. 1999; 39:1177-1183.

Funakoshi T, Ueda K, Shimada H, Kojima S. Effects of dithiocarbamates on toxicity of cadmium in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicology*. 1997; 116:99-107.

Gao B, Bataller R. Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. *Gastroenterology*. 2011; 141:1572-1585.

Giles NM, Watts AB, Giles GI, Fry FH, Littlechild JA, Jacob C. Metal and Redox Modulation of Cysteine Protein Function. *Chem Biol*. 2003; 10:677-693.

Girotti M, Khan N, McLellan B. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma*. 1991; 31:32-5.

Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35:1365-72.

Gonzalez-Reimers E, Martinez-Riera A, Santolaria-Fernandez F, Mas-Puscual A, Rodriguez-Moreno F, Galindo-Martin L, Molina-Perez M, Barros-Lopez N. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, copper, and manganese contents in different organs and urinary and fecal excretion. *Alcohol.* 1998; 16:7-12.

Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.* 1991; 196(2-3):143-51.

Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterization of rat brain synaptic membrane. *J Neurochem.* 1974; 22:281-90.

Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. Metallothionein-Null Mice Are More Sensitive than Wild-Type Mice to Liver Injury Induced by Repeated Exposure to Cadmium. *Toxicol Sci.* 2000; 55:223-232.

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.

He X, Chen MG, Ma Q. Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(7):1375-83.

Honma T, Suda M. Correlation of lethal doses of industrial chemicals between oral or intraperitoneal administration and inhalation exposure. *Ind Health.* 1998; 36:273-281.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*; IARC Scientific publications 1993; 58:119-237.

Iljin K, Ketola K, Vainio P, Halonen P, Kohonen P, Fey V, Grafström RC, Perälä M, Kallioniemi O. High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(19):6070-8.

Ishiyama H, Hoglen NC, Sipes IG. Diethyldithiocarbamate enhances production of nitric oxide and TNF-alpha by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells. *Toxicol Sci.* 2000; 55: 206-14.

Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002; 65:166-176.

Jurczuk M, Brzóška MM, Rogalska J, Moniuszko-Jakoniuk J. Iron body status of rats chronically exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol*. 2003; 38(3):202-7.

Jurczuk M, Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Galazyn-Sidorczuk M, Kulikowska-Karpińska E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol*. 2004; 42(3):429-38.

Kalsi SS, Wood DM, Waring WS, Dargan PI. Does cytochrome P450 liver isoenzyme induction increase the risk of liver toxicity after paracetamol overdose? *Open Access Emerg Med*. 2011; 3:69-76.

Kayama F, Yoshida T, Elwell MR, Luster MI. Role of Tumor Necrosis Factor- α in Cadmium-Induced Hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995; 131:224-234.

Kessova IG, Cederbaum AI. Mitochondrial alterations in livers of SOD 1 $-/-$ mice fed alcohol. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42:1470-1480.

Kini RD, Tripathi Y, Raghuveer CV, Pai SR, Ramaswamy C, Kamath P. Role of Vitamin C as an antioxidant in cadmium chloride induced testicular damage. *Int J Appl Biol Pharm Techn*. 2011; 2(3):484-488.

Koyu A, Gokcimen A, Ozguner F, Bayram DS, Kocak A. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol Cell Biochem*. 2006; 284:81-85.

Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The Role of Cellular Glutathione Peroxidase Redox Regulation in the Suppression of Tumor Cell Growth by Manganese Superoxide Dismutase. *Cancer Res* 2000; 60:3927.

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.

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.

Lihua L, Huanjie Y, Chen D, Cui C, Ping Dou Q. Disulfiram promotes the conversion of carcinogenic cadmium to a proteasome inhibitor with pro-apoptotic activity in human cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 229:206-214.

Liu J, Kershaw WC, Klaassen CD. Rat primary hepatocyte cultures are a good model for examining metallothionein-induced tolerance to cadmium toxicity. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1990; 26:75-79.

Liu J, Qian SY, Guo Q, Jiang J, Waalkes MP, Mason RP, Kadiiska MB. Cadmium generates reactive oxygen- and carbon centered- radical species in rats: Insights from in vivo spin-trapping studies. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45:475-481.

Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxic Appl Pharmacol.* 2009; 238:209-214.

Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Canadas S, Gonzalez MP. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40:940-951.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.

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

Majkic Singh N. *Klinička enzimologija.* Aid Publikum, Beograd. 1993.

Mankhetkorn S, Abedinzadeh Z, Houee-Levin C. Antioxidant action of sodium diethyldithiocarbamate: reaction with hydrogen peroxide and superoxide radical. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17:517-527.

Maret W, Wedd A. Binding, transport and storage of metal ions in biological cells. *RSC Metallobiology.* 2014.

Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie.* 2006; 88:1807-1814.

Martin B, Mangum L, Beresford TP. Use of court-ordered supervised disulfiram therapy at DVA Medical Centers in the United States. *Am J on Addictions.* 2005; 14:208-212.

McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol.* 1998; 35:5-12.

Moffatt P, Denizeau F. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab Rev.* 1997; 29:261-307.

Moore T, Le A, Niemi AK, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Enns GM, Cowan TM. *J Chromatogr B.* 2013; 929:51-55.

Moura CF, Ribeiro FA, Handan BA, Aguiar O, Oshima CT, Ribeiro DA. Grape Juice Concentrate Protects Rat Liver Against Cadmium Intoxication: Histopathology, Cytochrome C and Metalloproteinases Expression. *Drug Res.* 2016; 66(7):339-344.

Muller L. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology.* 1986; 40:2855-295.

Nabekuraa T, Koizumia Y, Nakaoa M, Tomohirob M, Inomatac M, Itoa Y. Delay of cataract development in hereditary cataract UPL rats by disulfiram and aminoguanidine. *Exp Eye Res.* 2003; 76:169–174.

Nagamine T, Nakazato K, Suzuki K, Kusakabe T, Sakai T, Oikawa M, Satoh T, Kamiya T, Arakawa K. Analysis of tissue cadmium distribution in chronic cadmium-exposed mice using in-air micro-PIXE. *Biol Trace Elem Research.* 2007; 117(1-3):115-126.

Nair AR, Degheselle O, Smeets K, Van Kerkhove E, Cuypers A. Cadmium Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)? *Int J Mol Sci.* 2013; 14(3):6116-43.

Nation JR, Burkey RT, Grover CA, Bratton GR. The effects of cadmium exposure on ethanol pharmacokinetics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 48(2):543-6.

National Toxicology Program, Tenth report on carcinogenesis, Research Triangle Park, NC: Department of Health and Human Services. 2000; 3:42-44.

Nigam D, Shukla GS, Agarwal AK. Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicol Lett.* 1999; 106:151–157.

Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238(3):192-200.

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

Ogasawara Y, Takeda Y, Takayama H, Nishimoto S, Ichikawa K, Ueki M, Suzuki T, Ishii K. Significance of the rapid increase in GSH levels in the protective response to cadmium exposure through phosphorylated Nrf2 signaling in Jurkat T-cells. *Free Radic Biol Med.* 2014; 69:58-66.

Ognjanovic BI, Markovic SD, Pavlovic SZ, Zikic RV, Stajn AS, Saicic ZS. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effects of selenium. *Physiol Res.* 2008; 57:403-411.

Ostrovskii S. Effect of disulfiram on the free amino acids pool of the brain tissue of the rats. *Farmakol Toksicol.* 1987; 50:30-3.

Pike MG, Mays DC, Macomber DW, Lipsky JJ. Metabolism of a disulfiram metabolite, S-methyl N,N-diethyldithiocarbamate, by flavin monooxygenase in human renal microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(2):127-32.

Raggi MA, Nobile L, Giovannini AG. Spectrophotometric determination of glutathione and of its oxidation product in pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Analysis*. 1991; 9:1037-1040.

Renugadevi J, Prabu SM. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Exp Toxicol Pathol*. 2010; 62(2):171-81.

Rikans LE, Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000; 13:110-117.

Rodriguez-Ariza A, Toribio F, Lopez-Barea J. Glutathione (GSH) Determination by a Very Simple Electrochemical Method. *J Chromatogr B*. 1994; 656:311.

Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, Di Simplicio P. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chemica*. 2003; 48:742-753.

Rüegg MA, Meinen S. Histopathology in Hematoxylin & Eosin stained muscle sections. In: SOP (ID) Number MDC1A_M.1.2.004. Biozentrum, Basel, Switzerland 2014.

Schuckit MA. Rehabilitation. In *Drug and alcohol abuse: A clinical guide to diagnosis and treatment* (6th ed., pp. 334–383). New York: Springer. 2006.

Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999; 154(3):2256-263.

Shaw S. Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Radic Biol Med*. 1989; 7:541-547.

Shaw S, Jayatilleke E. Ethanol-induced iron mobilization: role of acetaldehyde-aldehyde oxidase generated superoxide. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9:11-17.

Shen ML, Lipsky JJ, Naylor S. Role of Disulfiram in the In vitro Inhibition of Rat Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *Biochem Pharmacol*. 2000; 60:947-953.

Smith CJ, Livingston SD, Doolittle DJ. An international literature survey of "IARC group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. *Food Chem Toxicol*. 1997; 35:1107-1130.

Spiazzi CC, Manfredini V, Barcellos da Silva FE, Flores EMM, Izaguirry AP, Vargas LM, Soares MB, Santos FW. c-Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. *Food Chem Toxicol*. 2013; 55:526-532.

Squellerio I, Caruso D, Porro B, Veglia F, Tremoli E, Cavalca V. *J Pharm Biomed Analysis*. 2012; 71:111-118.

Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(3):321-336.

Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000; 19:201-213.

Stoll RE, White JF, Miya TS, Bousquet WF. Effects of cadmium on nucleic acid and protein synthesis in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1976; 37:61-74.

Radosavljević T, Mladenović D, Ninković M, Vučević D, Boričić I, Ješić-Vukićević R, Šljivančanin T, Lopičić S, Todorović V. Oxidative stress in rat liver during acute cadmium and ethanol intoxication. *J Serb Chem Soc.* 2012; 77(2):159–176.

Tietze F. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione. *Anal Biochemistry.* 1969; 27:502-522.

Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol.* 2011; 9:54.

Thorne PS. Occupational Toxicology, in Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 6th Ed. Klaassen CD (Ed.) McGraw-Hill, New York 2001; 1123-1140.

Treatment Improvement Protocol (TIP) Series, No. 49. Incorporating Alcohol Pharmacotherapies Into Medical Practice, Center for Substance Abuse Treatment, Rockville (MD): Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US). 2009.

Tsui JI, Cheng DM, Libman H, Briden C, Saitz R, Samet JH. Risky Alcohol Use and Serum Aminotransferase Levels in HIV-Infected Adults With and Without Hepatitis C. *J Stud Alcohol Drugs.* 2013; 74(2):266-270.

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

Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:303-308.

UNEP. Final review of scientific information on cadmium. 2010. http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/Interim_reviews/UNEP_GS26_INF_11_Add_2_Final_UNEP_Cadmium_review_and_appendix_Dec_2010.pdf

U.S. National Library of Medicine, National Institute of Diabetes and Digestive, and Kidney Diseases. <http://www.livertox.nlm.nih.gov/Disulfiram.htm>.

Watson WH, Chen Y, Jones DP. Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *Biofactors.* 2003; 17:307-314.

Webb M. Role of metallothionein in cadmium metabolism, in: E.C. Foulkes (Ed.), Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 80: Cadmium, Springer Verlag, New York 1986; pp. 281-355.

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.

WHO. Global status report on alcohol and health. 2014. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msb_gsr_2014_1.pdf

Williams SH. Medications for treating alcohol dependence. American Family Physician. 2005; 72:1775-1780.

Yamano T, Kosanke SD, Rikans LE. Attenuation of Cadmium-induced Liver Injury in Senescent Male Fischer 344 Rats: Role of Metallothionein and Glutathione. Toxicol Appl Pharmacol. 1999; 161:225-230.

8. PRILOZI

Prilog 1.

PRIRAST TJELESNE MASE ŽIVOTINJA

Tabela 1. Prirast tjelesne mase *Wistar* pacova kontrolne i eksperimentalnih grupa.

Grupa	Parametar
kontrola 0 dan	0
kontrola 1-21 dan	117,2 ± 22,73
kontrola 1-42 dana	239,2 ± 21,39
Cd ₁₋₁₀	41,2 ± 7,68
Cd ₁₋₂₁	70,7 ± 13,92
Cd ₁₋₃₁	86,2 ± 16,82
Cd ₁₋₄₂	127,5 ± 19,67
A ₁₋₁₀	61,7 ± 8,07
A ₁₋₂₁	86,3 ± 10,33
A ₁₋₁₀ /Cd ₁₋₁₀	32,2 ± 5,53
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₂₁	65,8 ± 5,04
DSF ₁₋₁₀	26,7 ± 5,47
DSF ₁₋₂₁	55,2 ± 9,11
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₃₁	104,5 ± 9,83
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	96,3 ± 18,69
Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	64 ± 12,05
Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	97 ± 18,97
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	53,7 ± 63,83
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	7,2 ± 12,29

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za 6 uzoraka (n = 6).

Prilog 2.

SADRŽAJ METALA U JETRI WISTAR PACOVA

Tabela 1. Status metala – kadmijum u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	Cd ($\mu\text{g Cd/g tkiva}$)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola/ Cd_1	55,85 \pm 5,48					
Cd_{1-42}		54,22 \pm 9,0 d,e,f	57,59 \pm 8,69 d,e,f	107,31 \pm 5,93 b,c,f	123,91 \pm 18,83 b,c,f	166,51 \pm 26,3 b,c,d,e
$\text{Cd}_{1-42}/\text{DSF}_{22-42}$	133,03 \pm 19,46 d	106,64 \pm 13,8 c,d	152,3 \pm 29,48 b,d	235,4 \pm 11,46 a,b,c		
$\text{A}_{1-21}/\text{Cd}_{1-21}$	9,63 \pm 0,57 b,c,d	21,64 \pm 3,37 a,c,d	54,01 \pm 10,21 a,b,d	122,6 \pm 5,83 a,b,c		
$\text{A}_{1-21}/\text{Cd}_{1-42}/\text{DSF}_{22-42}$	91,23 \pm 11,89 c,d	99,9 \pm 11,69 c,d	124,19 \pm 5,29 a,b,d	149,61 \pm 21,2 a,b,c		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri $p < 0,05$.

Tabela 2. Status metala – bakar u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	Cu ($\mu\text{g Cu/g tkiva}$)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	3,32 \pm 0,28					
OIO₂₂₋₄₂						3,39 \pm 0,35
DSF₁₋₂₁	3,98 \pm 0,63 d	5,63 \pm 0,98 d	5,76 \pm 1,18 d	9,0 \pm 1,74 a,b,c		
A₁₋₂₁	3,52 \pm 0,58	3,69 \pm 0,3	3,19 \pm 0,2	3,51 \pm 0,38		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	5,69 \pm 0,4 d	6,0 \pm 1,12 d	6,6 \pm 0,89 d	3,76 \pm 0,6 a,b,c		
Cd₁₋₄₂	5,66 \pm 0,94 d,e,f	5,38 \pm 0,44 d,e,f	6,4 \pm 0,39 d,e,f	8,49 \pm 1,64 a,b,c	8,51 \pm 1,04 a,b,c	8,66 \pm 1,19 a,b,c
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	5,8 \pm 0,74 b,c	14,0 \pm 1,62 a,c,d	9,43 \pm 1,49 a,b,d	5,62 \pm 0,29 b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	4,36 \pm 0,35 b	2,67 \pm 0,5 a,c,d	4,0 \pm 0,8 b	4,48 \pm 0,89 b		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	6,16 \pm 0,95 c,d	6,43 \pm 1,0 c,d	10,05 \pm 1,96 a,b	10,6 \pm 1,44 a,b		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 3. Status metala – željezo u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	Fe ($\mu\text{g Fe/g tkiva}$)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	66,09 \pm 12,13					
OIO₂₂₋₄₂						70,05 \pm 10,13
DSF₁₋₂₁	64,24 \pm 11,65 d	57,58 \pm 9,51 d	62,13 \pm 6,87 d	100,11 \pm 14,31 a,b,c		
A₁₋₂₁	64,7 \pm 8,44 d	61,28 \pm 12,22 c,d	79,96 \pm 11,27 b	83,64 \pm 5,3 a,b		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	58,89 \pm 9,13 c,d	74,5 \pm 12,59 d	84,84 \pm 11,38 a	95,05 \pm 6,69 a,b		
Cd₁₋₄₂	69,48 \pm 9,53 e,f	58,59 \pm 7,33 d,e,f	77,4 \pm 10,21 e,f	87,2 \pm 7,03 b,e,f	132,28 \pm 17,55 a,b,c,d	138,54 \pm 11,95 a,b,c,d
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	94,79 \pm 13,35 d	94,46 \pm 6,24 d	102,45 \pm 10,69 d	197,63 \pm 11,5 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	54,41 \pm 10,85 d	62,92 \pm 8,87 d	66,16 \pm 12,11 d	130,11 \pm 2,06 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	102,19 \pm 7,48 d	91,61 \pm 8,11 c,d	110,69 \pm 7,38 b,d	130,5 \pm 2,07 a,b,c		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 4. Status metala – cink u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	Zn ($\mu\text{g Zn/g tkiva}$)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	37,6 \pm 4,44					
OIO₂₂₋₄₂						45,0 \pm 7,44
DSF₁₋₂₁	42,58 \pm 3,53 b,c,d	67,94 \pm 11,44 a	69,39 \pm 12,38 a	65,67 \pm 6,4 a		
A₁₋₂₁	34,24 \pm 4,69	34,38 \pm 6,01	34,44 \pm 3,74	39,57 \pm 3,03		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	52,59 \pm 2,98 b	66,73 \pm 9,23 a,d	60,87 \pm 9,78 d	48,52 \pm 2,65 b,c		
Cd₁₋₄₂	54,45 \pm 8,69 c,d,e,f	58,16 \pm 5,48 c,d,e,f	78,1 \pm 6,66 a,b,d,f	96,77 \pm 12,6 a,b,c	79,2 \pm 8,85 a,b	96,27 \pm 16,94 a,b,c
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	108,61 \pm 7,32 c,d	114,31 \pm 11,24 c,d	145,52 \pm 9,88 a,b	156,19 \pm 14,22 a,b		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	54,16 \pm 4,19 c,d	65,53 \pm 4,51 d	66,81 \pm 3,65 a,d	94,31 \pm 12,54 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	88,46 \pm 13,46 b,c,d	117,12 \pm 22,94 a,d	142,21 \pm 19,04 a	154,05 \pm 4,72 a,b		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri $p < 0,05$.

Tabela 5. Status metala – magnezijum u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	Mg ($\mu\text{g Mg/g tkiva}$)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	240,26 \pm 17,36					
OIO₂₂₋₄₂						243,55 \pm 12,36
DSF₁₋₂₁	242,89 \pm 19,46	244,44 \pm 24,41	233,86 \pm 34,33	219,76 \pm 16,81		
A₁₋₂₁	232,1 \pm 21,66	243,16 \pm 17,61	243,95 \pm 14,81	248,06 \pm 5,53		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	254,29 \pm 14,08	239,61 \pm 18,17	251,69 \pm 30,07	241,32 \pm 30,92		
Cd₁₋₄₂	240,57 \pm 22,62	240,07 \pm 11,22	261,95 \pm 48,31	239,75 \pm 31,11	239,25 \pm 8,08	242,03 \pm 29,96
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	241,68 \pm 16,62	230,65 \pm 7,72	241,24 \pm 14,38	242,57 \pm 31,55		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	242,57 \pm 12,58	260,79 \pm 6,64	245,88 \pm 10,02	253,37 \pm 17,92		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	260,33 \pm 23,45	241,84 \pm 26,19	252,43 \pm 38,02	236,75 \pm 2,87		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 6. Status metala – selen u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	Se (ng Se/g tkiva)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	15,23 ± 0,39					
OIO₂₂₋₄₂						16,03 ± 0,47
DSF₁₋₂₁	18,47 ± 0,52 b,c,d	34,89 ± 6,44 a,d	43,57 ± 7,78 a	44,78 ± 8,13 a,b		
A₁₋₂₁	19,61 ± 2,39 c,d	15,8 ± 2,97	14,53 ± 2,58 a	14,48 ± 2,26 a		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	16,63 ± 1,68 b,c,d	21,8 ± 3,67 a	23,83 ± 3,32 a	25,37 ± 3,68 a		
Cd₁₋₄₂	41,88 ± 1,95 b,c,d	32,23 ± 4,97 a,d	28,36 ± 1,13 a,d	22,6 ± 2,44 a,b,c		
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	21,98 ± 0,61	22,27 ± 3,14	23,28 ± 2,03	24,16 ± 0,99		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	34,94 ± 3,45 d	34,36 ± 1,83 d	30,99 ± 2,29	29,19 ± 4,41 a,b		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	45,16 ± 3,77 c,d	47,94 ± 2,3	57,37 ± 11,15 a	58,3 ± 8,59 a		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Prilog 3.

PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA U JETRI WISTAR PACOVA

Tabela 1. Parametar antioksidativnog sistema zaštite – superoksid dismutaza u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	SOD (U SOD/mg proteina)					
Grupe	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	2,34 ± 0,17					
OIO₂₂₋₄₂						2,12 ± 0,11
DSF₁₋₂₁	1,42 ± 0,14 c,d	1,39 ± 0,13 c,d	1,19 ± 0,02 a,b	0,9 ± 0,07 a,b		
A₁₋₂₁	2,31 ± 0,29 c,d	2,22 ± 0,38 c,d	1,71 ± 0,17 a,b	1,68 ± 0,24 a,b		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	1,72 ± 0,21	1,55 ± 0,14	1,53 ± 0,28	1,51 ± 0,09		
Cd₁₋₄₂	2,34 ± 0,33 d,e,f	2,18 ± 0,42 e,f	1,89 ± 0,26	1,71 ± 0,15 a	1,5 ± 0,14 a,b	1,44 ± 0,29 a,b
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	1,51 ± 0,28 b,c,d	2,13 ± 0,26 a	2,16 ± 0,08 a	2,27 ± 0,28 a		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	2,27 ± 0,41 b,c,d	1,82 ± 0,11 a	1,65 ± 0,18 a	1,54 ± 0,18 a		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	1,52 ± 0,17 d	1,38 ± 0,27 d	1,48 ± 0,16 d	1,84 ± 0,14 a,b,c		

Post-hoc Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 2. Parametar oksidativnog statusa – malondialdehid u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	MDA (nmol MDA/mg proteina)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	63,58 ± 7,16					
OIO₂₂₋₄₂						58,49 ± 5,16
DSF₁₋₂₁	65,48 ± 11,51 d	77,79 ± 11,45 d	77,31 ± 3,31 d	107,87 ± 10,04 a,b,c		
A₁₋₂₁	85,49 ± 2,23 b,c,d	161,63 ± 4,42 a	162,28 ± 11,11 a	169,92 ± 31,51 a		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	164,42 ± 4,4 b,c,d	84,39 ± 9,9 a	81,61 ± 9,52 a	81,76 ± 11,49 a		
Cd₁₋₄₂	101,6 ± 17,63 b,c,d,e,f	123,85 ± 17,78 a	123,11 ± 8,95 a	134,2 ± 5,69 a	135,93 ± 10,61 a	138,13 ± 2,45 a
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	132,37 ± 7,1 b,c,d	112,76 ± 10,51 a	103,07 ± 9,98 a	99,11 ± 11,64 a		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	102,61 ± 20,12 b,c,d	136,67 ± 8,48 a,c,d	161,36 ± 9,28 a,b	162,83 ± 8,66 a,b		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	159,61 ± 10,71 c,d	156,68 ± 7,31 c,d	112,97 ± 9,74 a,b,d	82,33 ± 14,83 a,b,c		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 3. Parametar oksidativnog statusa – superoksid anjon radikal u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	SAR (nmol red NBT/min/mg proteina)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	67,3 ± 6,7					
OIO₂₂₋₄₂						69,1 ± 5,5
DSF₁₋₂₁	131,78 ± 25,79 c,d	146,09 ± 26,65 c,d	311,27 ± 10,64 a,b,d	672,58 ± 14,84 a,b,c		
A₁₋₂₁	63,34 ± 2,02 b,c,d	127 ± 5,32 a,c	138,66 ± 12,36 a,b,d	178,76 ± 30,36 a,b,c		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	170,9 ± 28,44 c,d	140,98 ± 18,49	138,07 ± 17,33 a	135,67 ± 11,6 a		
Cd₁₋₄₂	116,41 ± 1,59 e,f	127,87 ± 25,2 e,f	134,42 ± 11,4 e,f	139,53 ± 21,73 e,f	169,44 ± 18,46 a,b,c,d	179,23 ± 12,04 a,b,c,d
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	140,89 ± 17,39 d	127,19 ± 12,4	127,14 ± 12,49	106,68 ± 10,97 a		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	125,63 ± 20,22 d	150,03 ± 16,31 d	153,75 ± 19,62 d	202,29 ± 38,03 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	143,97 ± 3,47 d	136,01 ± 18,28 d	136,16 ± 17,43 d	107,26 ± 1,36 a,b,c		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 4. Parametar antioksidativnog sistema zaštite – katalaza u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	CAT (U CAT/mg proteina)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	279,23 ± 44,1					
OIO₂₂₋₄₂						284,25 ± 51,2
DSF₁₋₂₁	196,7 ± 30,59 b,c,d	335,98 ± 23,92 a,c,d	434,68 ± 21,25 a,b,d	515,7 ± 49,45 a,b,c		
A₁₋₂₁	183,45 ± 5,17 c,d	146,29 ± 27,77 c	82,4 ± 4,25 a,b	116,13 ± 20,03 a		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	472,73 ± 92,17 b	371,45 ± 52,44 a,d	382,66 ± 28,61 d	526,75 ± 54,15 b,c		
Cd₁₋₄₂	351,74 ± 21,79 d,e,f	327,85 ± 47,27 d,e,f	300,02 ± 50,74 d,e,f	209,77 ± 11,12 a,b,c	194,55 ± 19,58 a,b,c	168,21 ± 2,17 a,b,c
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	245,39 ± 30,29 b	388,59 ± 57,69 a,c,d	221,7 ± 12,95 b	216,38 ± 3,35 b		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	315,33 ± 37,02 b,d	153,56 ± 23,27 a,c,d	324,15 ± 62,85 b,d	400,76 ± 32,45 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	269,71 ± 34,21 d	224,55 ± 34,39 d	212,71 ± 38,53	158,98 ± 19,1 a,b		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 5. Parametar antioksidativnog sistema zaštite – redukovani glutation u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	GSH (nmol GSH/mg proteina)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	32,76 ± 3,41					
OIO₂₂₋₄₂						35,44 ± 2,41
DSF₁₋₂₁	32,54 ± 5,46 b	21,71 ± 3,89 a,c,d	38,04 ± 3,86 b	31,75 ± 4,9 b		
A₁₋₂₁	32,58 ± 4,04 c	28,61 ± 5,24	24,37 ± 3,25 a,d	32,43 ± 2,04 c		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	21,07 ± 3,27 b,c	29,58 ± 3,07 a,c	36,86 ± 4,99 a,b,d	23,65 ± 2,6 c		
Cd₁₋₄₂	25,57 ± 2,57 d,e,f	23,49 ± 2,42 d,e,f	22,22 ± 4,0 f	18,27 ± 2,01 a,b,f	17,52 ± 1,67 a,b,f	12,47 ± 2,56 a,b,c,d,e
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	10,78 ± 1,94 b,c,d	26,45 ± 0,42 a,d	28,09 ± 4,24 a,d	16,27 ± 2,35 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	27,07 ± 4,78	27,46 ± 3,27	27,32 ± 4,64	27,39 ± 0,35		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	20,23 ± 2,95 b,c	37,66 ± 6,89 a,c,d	46,61 ± 0,59 a,b,d	20,46 ± 3,85 b,c		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 6. Parametar oksidativnog statusa – oksidirani glutation u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	GSSG (nmol GSSG/mg proteina)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	1,83 ± 0,09					
OIO₂₂₋₄₂						1,92 ± 0,05
DSF₁₋₂₁	4,2 ± 0,77 b,d	0,61 ± 0,07 a,c	4,52 ± 0,35 b,d	0,69 ± 0,1 a,c		
A₁₋₂₁	1,57 ± 0,02 c	1,44 ± 0,03 c	1,25 ± 0,19 a,b,d	1,49 ± 0,05 c		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	1,27 ± 0,19 b	1,85 ± 0,21 a,c,d	1,06 ± 0,1 b	1,21 ± 0,15 b		
Cd₁₋₄₂	2,12 ± 0,13 b,c	3,7 ± 0,32 a,c,d,e,f	4,7 ± 0,38 a,b,d,e,f	2,11 ± 0,13 b,c	1,82 ± 0,2 b,c	1,71 ± 0,23 b,c
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	1,95 ± 0,22 c,d	1,9 ± 0,27 c,d	1,28 ± 0,01 a,b	1,09 ± 0,09 a,b		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	1,49 ± 0,16 b,d	1,07 ± 0,02 a,c,d	1,48 ± 0,09 b,d	1,83 ± 0,25 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	2,81 ± 0,42 c,d	2,96 ± 0,3 c,d	2,05 ± 0,11 a,b,d	0,79 ± 0,15 a,b,c		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 7. Parametar homeostaze glutationa – odnos oksidiranog i redukovanog glutationa u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	GSSG/GSH					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	0,056 ± 0,005					
OIO ₂₂₋₄₂						
DSF ₁₋₂₁	0,132 ± 0,029	0,028 ± 0,003	0,12 ± 0,019	0,022 ± 0,007		
A ₁₋₂₁	0,049 ± 0,006	0,052 ± 0,011	0,052 ± 0,006	0,046 ± 0,002		
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	0,062 ± 0,014	0,063 ± 0,005	0,029 ± 0,007	0,052 ± 0,008		
Cd ₁₋₄₂	0,084 ± 0,012	0,158 ± 0,011	0,219 ± 0,051	0,117 ± 0,018	0,105 ± 0,019	0,138 ± 0,012
Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	0,187 ± 0,049	0,072 ± 0,01	0,046 ± 0,007	0,069 ± 0,014		
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₂₁	0,057 ± 0,014	0,04 ± 0,006	0,055 ± 0,009	0,067 ± 0,009		
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	0,14 ± 0,017	0,082 ± 0,022	0,044 ± 0,002	0,039 ± 0,004		

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6).

Tabela 8. Parametar antioksidativnog sistema zaštite – glutation reduktaza u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	GR (U GR/mg proteina)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	0,0024 ± 0,0001					
OIO₂₂₋₄₂						0,0024 ± 0,0001
DSF₁₋₂₁	0,0015 ± 0,0002 b,c,d	0,002 ± 0,0003 a,c	0,0029 ± 0,0001 a,b,d	0,0021 ± 0,0003 a,b,c		
A₁₋₂₁	0,0023 ± 0,0003	0,0023 ± 0,0002	0,0023 ± 0,00002	0,0022 ± 0,0002		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	0,0021 ± 0,0003 c	0,0023 ± 0,0004 c	0,0035 ± 0,0006 a,b,d	0,0026 ± 0,0002 c		
Cd₁₋₄₂	0,0019 ± 0,0002	0,0019 ± 0,0001	0,0018 ± 0,0004	0,0017 ± 0,0002	0,0016 ± 0,0003	0,0015 ± 0,0001
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	0,0014 ± 0,00001 b,c,d	0,0028 ± 0,0004 a	0,0029 ± 0,0003 a	0,0026 ± 0,0005 a		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	0,0018 ± 0,0004 d	0,0023 ± 0,0003	0,0025 ± 0,0008	0,0028 ± 0,0005 a		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	0,0019 ± 0,0002 c,d	0,0022 ± 0,0004	0,0026 ± 0,0003 a	0,0026 ± 0,0002 a		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Tabela 9. Parametar antioksidativnog sistema zaštite – glutation-*S*-transferaza u jetri *Wistar* pacova.

Parametar	GST (U GST/mg proteina)					
	1. dan	3. dan	10. dan	21. dan	31. dan	42. dan
kontrola	0,0439 ± 0,0031					
OIO₂₂₋₄₂						0,0419 ± 0,0027
DSF₁₋₂₁	0,045 ± 0,0057 c,d	0,0578 ± 0,0037 d	0,0594 ± 0,0013 a,d	0,1096 ± 0,016 a,b,c		
A₁₋₂₁	0,0777 ± 0,0133 d	0,0817 ± 0,0066 d	0,0924 ± 0,0076 d	0,1431 ± 0,0188 a,b,c		
A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂	0,0669 ± 0,0098 c,d	0,0707 ± 0,0101 d	0,0883 ± 0,0153 a,d	0,1121 ± 0,0187 a,b,c		
Cd₁₋₄₂	0,043 ± 0,0072 c,d,e,f	0,0373 ± 0,0062 c,d,e,f	0,0173 ± 0,0025 a,b	0,0144 ± 0,0026 a,b	0,0135 ± 0,0022 a,b	0,012 ± 0,0017 a,b
Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	0,087 ± 0,005	0,087 ± 0,011	0,0876 ± 0,0168	0,0893 ± 0,0011		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁	0,0897 ± 0,013 d	0,0983 ± 0,0077 d	0,1096 ± 0,0106 d	0,1349 ± 0,0188 a,b,c		
A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂	0,1451 ± 0,0216 c,d	0,1441 ± 0,0141 c,d	0,1002 ± 0,0136 a,b	0,0832 ± 0,0078 a,b		

Post-hok Tukey-ev test – poređenje unutar eksperimentalne grupe; oznake za termine ekspozicije: 1 dan (a), 3 dana (b), 10 dana (c), 21 dan (d), 31 dan (e) i 42 dana (f). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 6). Statistička značajnost razmatrana pri p < 0,05.

Prilog 4.

KORELACIJA IZMEĐU PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I ODGOVARAJUĆIH METALA U JETRI WISTAR PACOVA

Tabela 1. Spearman-ova korelacija između parametara oksidativnog stresa i odgovarajućih metala u jetri *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.

Grupe	Parametri														
	MDA	CAT	Fe												
Kontrola	Se	GPx	Mg												
Spearmanov koeficijent r	0,9429	0,9429	-0,8857												
P (vrijednost)	0,0167	0,0167	0,0333												
DSF21	O ₂ ⁻			GSSG	GPx		GSSG/GSH								
	GSSG	GPx	Zn	Zn	MDA	Zn	O ₂ ⁻	GSSG	Zn						
	Spearmanov koeficijent r	-0,8697	0,9429	1	-0,8697	-0,9429	0,9429	-0,9276	0,9412	-0,9276					
P (vrijednost)	0,0333	0,0167	0,0028	0,0333	0,0167	0,0167	0,0167	0,0167	0,0167						
A21	O ₂ ⁻		SOD	CAT	GSSG	GSSG/GSH									
	GR	Fe	Zn	GST	Mg	Se									
	Spearmanov koeficijent r	-0,8804	-0,8857	1	0,9429	-0,8676	-0,9258								
P (vrijednost)	0,0333	0,0333	0,0028	0,0167	0,0333	0,0167									
A21+DSF21	O ₂ ⁻		SOD	GSH		GSSG/GSH	Fe								
	GSH	GSSG/GSH	Se	GSSG/GSH	GR	GR	Mg								
	Spearmanov koeficijent r	0,8857	-0,8857	-0,8804	-0,8857	0,9411	-0,8804	1							
P (vrijednost)	0,0333	0,0333	0,0333	0,0333	0,0167	0,0333	0,0028								
Cd21	SOD	GPx	GSSG/GSH												
	GPx	MDA	GSH	GSSG											
	Spearmanov koeficijent r	0,9276	-0,2899	-0,9429	0,9429										
P (vrijednost)	0,0167	0,0167	0,0167	0,0167											
Cd42	MDA	O ₂ ⁻	GST												
	Cd	GSSG	Mg												
	Spearmanov koeficijent r	-0,9429	-0,9429	-0,8827											
P (vrijednost)	0,0167	0,0167	0,0333												
Cd42+DSF21	MDA		O ₂ ⁻	SOD		CAT	GSH		GSSG		GSSG/GSH				
	SOD	GR	Zn	GSH	GR	Fe	MDA	GR	MDA	GR	MDA	SOD	GSH	GSSG	GR
	Spearmanov koeficijent r	-0,8857	0,9856	0,8986	0,9429	-0,9276	0,8857	-0,9429	-0,9856	0,8986	0,8676	1	-0,8857	-0,9429	0,8986
P (vrijednost)	0,0333	0,0028	0,0333	0,0167	0,0167	0,0333	0,0167	0,0028	0,0333	0,0333	0,0028	0,0333	0,0167	0,0333	0,0028
Cd21+A21	MDA	O ₂ ⁻	GSSG		GSSG/GSH		GR	GST	Fe	Zn					
	Fe	CAT	GSSG/GSH	Fe	Fe	Mg	Se	Cu	Mg	Mg					
	Spearmanov koeficijent r	-0,8857	0,9429	0,9856	-0,8857	-0,9276	0,8986	-0,8857	1	-0,8857	0,8857				
P (vrijednost)	0,0333	0,0167	0,0028	0,0333	0,0167	0,0333	0,0333	0,0028	0,0333	0,0333					
A21+Cd42+DSF21	O ₂ ⁻	GSSG		Cu	Fe										
	Cu	Fe	Mg	Zn	Mg										
	Spearmanov koeficijent r	-0,9429	-0,8986	0,8986	-0,8857	-0,8857									
P (vrijednost)	0,0167	0,0333	0,0333	0,0333	0,0333										

Korelacija je procijenjena između svih parametara za odabrane vremenske intervale ekspozicije (Cd: 21 i 42 dana; A: 21 dan; DSF: 21 dan; Cd 21 i A 21 dan koekspozicije; A 21 i DSF 21 dan kombinovane ekspozicije; Cd 42 i DSF 21 dan kombinovane ekspozicije i A 21, Cd 42 i DSF 21 dan kombinovane ekspozicije). *Wistar* pacovi su izloženi *i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan, *per os* 3 ml 20 % etanola/dan i *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan. Spearman-ov koeficijent korelacije (r) $> \pm 0,70$ je razmatran. Parametri su izraženi u sljedećim jedinicama: malondialdehid (MDA): nmol MDA/mg proteina; superoksidni anion radikal (O₂^{•-}): nmol red NBT/min/mg proteina; superoksidna dismutaza (SOD): U SOD/mg proteina; katalaza (CAT): U CAT/mg proteina; glutation – redukovani i oksidirani (GSH i GSSG): nmol GSH i GSSG/mg proteina; glutation reduktaza (GR): U GR/mg proteina; glutation-S-transferaza (GST): U GST/mg proteina; glutation peroxidaza (GPx): U GPx/mg proteina; i koncentracija metala – bakar (Cu): µg Cu/g tkiva; željezo (Fe): µg Fe/g tkiva; cink (Zn): µg Zn/g tkiva; magnezijum (Mg): µg Mg/g tkiva i selen (Se): ng Se/g tkiva. Razmatrane su razlike statističke značajnosti za $p < 0,05$.

Biografija autora

Aida Begić je rođena 30.08.1985. godine u Derventi, BiH. Osnovnu školu „Slavinovići“ završila je kao učenik generacije u Tuzli, BiH. Zapažene rezultate postigla je na opštinskim i kantonalnim takmičenjima iz oblasti fizike i matematike. Prestižnu tuzlansku gimnaziju „Meša Selimović“ završila je sa prosjekom ocjena 5,0 i tokom srednjoškolskog perioda takođe osvajala i nagrade iz literarnog stvaralaštva. Školske 2004./2005. godine upisala je Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli. Diplomirala je 2009. godine sa prosječnom ocjenom 8,89 kao 6. diplomant od osnivanja fakulteta, i stekla zvanje magistra farmacije (magistar u struci). Eksperimentalni dio diplomskog rada izvela je u fabrici za proizvodnju i promet lijekova „Zada pharmaceuticals“ d.o.o., kao stipendista navedene kompanije, pod mentorstvom Mire Zečević, redovnog profesora na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Diplomski rad pod naslovom „Ispitivanje stabilnosti enalapril maleata u farmaceutskim preparatima“, iz oblasti Analiza i kontrola lijekova, odbranila je sa ocjenom 10 na diplomskom ispitu. Takođe je tokom studija bila stipendista Ministarstva obrazovanja, nauke, kulture i sporta tuzlanskog kantona. U školskoj 2008./09. godini angažovana je kao demonstrator-saradnik na nastavnom predmetu „Analiza i kontrola lijekova“, a od 2010. godine kao spoljni saradnik u zvanju asistenta na nastavnom predmetu „Toksikologija sa analitikom“ na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Tuzli. Po isteku zvanja 2014. godine nastavila je saradnju sa matičnim fakultetom kao stručnjak iz prakse na nastavnim predmetima „Toksikologija sa analitikom“, „Biohemija“ i „Farmaceutska hemija“ na Farmaceutskom i Medicinskom fakultetu u Tuzli.

Pripravnički staž obavila je u kompaniji „Zada pharmaceuticals“ d.o.o. u sektoru kontrole kvaliteta, na poziciji glavnog analitičara za biofarmaceutsko – tehnološki laboratorij, nakon čega je stekla i licencu za samostalan rad. Tokom radnog staža takođe je bila rukovodilac nekoliko ogranaka apoteka u privatnim zdravstvenim ustanovama. Na izornoj skupštini Komore magistara farmacije tuzlanskog kantona izabrana je na funkciju predsjednika Komore, kao najmlađi predsjednik farmaceutske komore u BiH. Uloga predsjednika Komore uključivala je saradnju sa institucijama od značaja za struku, organizaciju stručnih predavanja i organizaciju Prvog simpozijuma magistara farmacije TK sa međunarodnim sudjelovanjem na temu „Uloga farmaceuta u savremenom zdravstvu“ 2014. godine u Tuzli. Nakon ostavke na datu funkciju, saradnju sa Komorom je nastavila na poziciji predsjednika Komisije za edukaciju, validaciju i bodovanje stručnih predavanja i

učestvovala u organizaciji Drugog simpozijuma magistara farmacije TK sa međunarodnim sudjelovanjem na temu „Farmaceut – stručnjak u različitim oblastima“ 2015. godine i Trećeg simpozijuma magistara farmacije TK sa međunarodnim sudjelovanjem na temu „Pomicanje granica i novi izazovi u farmaciji“ 2016. godine. U 2014. godini bila je član Komisije za lijekove u sastavu Ministarstva zdravstva tuzlanskog kantona, i kao ekspert iz oblasti farmacije sudjelovala u formiranju esencijalne i pozitivne kantonalne liste lijekova. Takođe je prošla obuku od strane državne Agencije za sertifikaciju i akreditiranje u zdravstvu.

Doktorske studije, modul Toksikološka hemija upisala je školske 2010./2011. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Aida Begić je objavila ukupno 18 radova i saopštenja. Istraživački interes: oksidativni stres i analitička toksikologija.

Jezici: engleski, njemački, španski.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Аида Бегић

Број индекса: 20/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**ИНТЕРФЕРЕНЦИЈА ТИОЛНИХ ГРУПА МЕТАБОЛИТА ДИСУЛФИРАМА СА
ГЛУТАТИОНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС ИНДУКОВАН
КАДМИЈУМОМ И/ИЛИ АЛКОХОЛОМ У ЈЕТРИ ПАЦОВА**

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

Потпис аутора

У Београду, 11. април 2017.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Аида Бегић

Број индекса: 20/10

Студијски програм: Докторске студије (Изборни модул: Токсиколошка хемија)

Наслов рада:

ИНТЕРФЕРЕНЦИЈА ТИОЛНИХ ГРУПА МЕТАБОЛИТА ДИСУЛФИРАМА СА
ГЛУТАТИОНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС ИНДУКОВАН
КАДМИЈУМОМ И/ИЛИ АЛКОХОЛОМ У ЈЕТРИ ПАЦОВА

Ментор: Проф. др Мирјана Ђукић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 11. април 2017.

Изјава о коришћењу

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

ИНТЕРФЕРЕНЦИЈА ТИОЛНИХ ГРУПА МЕТАБОЛИТА ДИСУЛФИРАМА СА
ГЛУТАТИОНСКИМ ОДГОВОРОМ НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС ИНДУКОВАН
КАДМИЈУМОМ И/ИЛИ АЛКОХОЛОМ У ЈЕТРИ ПАЦОВА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 11. април 2017.
