



## THE ROLE OF CANNABINOID RECEPTOR 1 IN THE DEVELOPMENT OF OXIDATIVE/NITROSATIVE STRESS IN MICE WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

### ULOGA KANABINOIDNIH CB<sub>1</sub> RECEPTORA U RAZVOJU OKSIDATIVNOG/NITROZATIVNOG STRESA U TOKU NEALKOHOLNE MASNE BOLESTI JETRE KOD MIŠEVA

Dušan Brkić<sup>1</sup>, Bojan Jorgačević<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

<sup>2</sup> Institut za patološku fiziologiju "Ljubodrag Buba Mihailovic", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Correspondence: dusanbrkic@orion.rs

#### Abstract

**Introduction:** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is hepatic manifestation of metabolic syndrome. It represents a spectrum of diseases ranging from steatosis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), that may progress to fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma.

**Aim:** The aim of the study was to investigate the influence of CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor blockade on the intensity of oxidative/nitrosative stress in mice liver with NAFLD. Therefore, we used rimonabant, selective CB<sub>1</sub> antagonist.

**Material and Methods:** Male mice C57BL/6 (n = 28) were divided into following groups: <sup>1</sup>) Control group - fed with control chow diet 20 weeks (C group; n = 7), <sup>2</sup>) Group fed with high saturated fat diet 20 weeks (HF group; n = 7), <sup>3</sup>) Group fed with standard chow diet and treated with rimonabant after 18 weeks (R group; n = 7), <sup>4</sup>) Group fed with high saturated fat diet and treated with rimonabant after 18 weeks (HFR group; n = 7). The activity of liver transaminases was measured in serum. The concentrations of malondialdehyde (MDA), nitrites and nitrates (NO<sub>x</sub>), and the activity of superoxide dismutase (SOD), copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and manganese superoxide dismutase (MnSOD) were measured in the liver.

**Results:** Rimonabant induced decrease in transaminase activity in R group compared to control, as well as in HFR group compared to HF group (p < 0.01, respectively). Concentrations of MDA and NO<sub>x</sub> were lower in HFR compared to HF group (p < 0.01). We found decrease in SOD, Cu/ZnSOD and MnSOD activities in HFR group compared to HF group (p < 0.01).

**Conclusion:** According to the results of this study, it can be concluded that blockade of CB<sub>1</sub> receptors causes useful effects in the treatment of NAFLD. Rimonabant reduced hepatocellular injury, which was proved by decreased transaminase activities. The reduction of oxidative/nitrosative stress and lipid peroxidation may also contribute to the protective effects of rimonabant, which has been shown as decrease in MDA and NO<sub>x</sub> concentration.

#### Keywords:

NAFLD,  
CB<sub>1</sub> receptors,  
endocannabinoid system,  
rimonabant,  
oxidative/nitrosative stress



## Sažetak

**Uvod:** Nealkoholna masna bolest jetre (eng. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) je hepatična manifestacija metaboličkog sindroma koja se ispoljava širokim spektrom bolesti jetre, od steatoze do nealkoholnog steatohepatitisa (engl. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*, NASH), fibroze i ciroze jetre, sa mogućnošću razvoja hepatocelularnog karcinoma.

**Cilj rada:** Cilj istraživanja je da se ispita uticaj blokade CB<sub>1</sub> kanabinoidnih receptora na intenzitet oksidativnog/nitrozativnog stresa u jetri miševa sa NAFLD. Zarad toga upotrebljen je rimonabant, selektivni antagonist CB<sub>1</sub> receptora.

**Materijal i metode:** Mužjaci miševa C57BL/6 soja (n = 28) podeljeni su u sledeće grupe: <sup>1)</sup> Kontrolna grupa - životinje na standardnoj ishrani, u trajanju od 20 nedelja (C grupa; n = 7); <sup>2)</sup> Grupa životinja hranjenih dijetom bogatom mastima, u trajanju od 20 nedelja (HF grupa; n = 7); <sup>3)</sup> Grupa životinja na standardnoj ishrani, tretirana rimonabantom nakon 18 nedelja (R grupa; n = 7) i <sup>4)</sup> Grupa životinja hranjenih dijetom bogatom mastima, tretirana rimonabantom nakon 18 nedelja (HFR grupa; n = 7). Nakon 20 nedelja merena je aktivnost transaminaza u serumu. U jetri su određene koncentracije malondialdehida (MDA), nitrita i nitrata (NO<sub>x</sub>) i aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (SOD), bakar/cink-superoksid dismutaze (Cu/ZnSOD) i mangan-superoksid dismutaze (MnSOD).

**Rezultati:** Primena rimonabanta dovela je do smanjenja aktivnosti transaminaza u R grupi u odnosu na kontrolu, kao i u HFR grupi u odnosu na HF grupu (p < 0,01, respektivno). Koncentracija MDA i NO<sub>x</sub> u HFR grupi bila je snižena u poređenju sa HF grupom (p < 0,01). Aktivnosti ukupne SOD, Cu/ZnSOD i MnSOD u HFR grupi bile su statistički značajno smanjene u odnosu na HF grupu (p < 0,01).

**Zaključak:** Na osnovu rezultata studije može se zaključiti da blokada CB<sub>1</sub> receptora ispoljava potencijalno korisne efekte u tretmanu NAFLD. Rimonabant je doveo do smanjenja stepena hepatocelularnog oštećenja, na šta ukazuje smanjena aktivnost transaminaza u serumu miševa. Primena rimonabanta dovela je do smanjenja intenziteta oksidativnog/nitrozativnog stresa i lipidne peroksidacije, što je pokazano smanjenjem koncentracije MDA i NO<sub>x</sub>.

### Ključne reči:

NAFLD;  
CB<sub>1</sub> receptori;  
endokanabinoidni sistem;  
rimonabant;  
oksidativni/nitrozativni  
stres

## Uvod

Nealkoholna masna bolest jetre (eng. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) je hepatična manifestacija metaboličkog sindroma koja se ispoljava širokim spektrom bolesti jetre, od steatoze do nealkoholnog steatohepatitisa (eng. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*, NASH), fibroze i ciroze jetre, sa mogućnošću razvoja hepatocelularnog karcinoma (1). Procenjuje se da prevalencija NAFLD u razvijenim zemljama varira između 20-30 %, pri čemu se kod morbidno gojaznih osoba povećava i do 90 % (2).

Iako svi patogenetski mehanizmi, uključeni u razvoj NAFLD, nisu još uvek u potpunosti razjašnjeni, predložena je hipoteza „dva udara“. Prvi udar bi podrazumevao insulinsku rezistenciju (IR), koja kod osoba sa visceralnim tipom gojaznosti povećava intenzitet lipolize, preuzimanje slobodnih masnih kiselina (SMK) od strane jetre, *de novo* lipogenezu masnih kiselina i nakupljanje triacilglicerola (TAG) u hepatocitima. Ove inicijalne promene čine jetru osetljivom na dejstvo oksidativnog/nitrozativnog stresa, lipotoksičnosti i proinflamatornih citokina, koji bi predstavljali drugi udar (3-5).

Utvrđeno je da kod obolelih od NAFLD dolazi do preteranog stvaranja prooksidativnih faktora i smanjenja kapaciteta antioksidativne zaštite. Reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) predstavljaju jedinjenja kiseonika koja su reaktivnija od molekularnog kiseonika i obuhvataju slobodne radikale i

vodonik-peroksid. Slobodni radikali su hemijske vrste sa jednim nesparenim elektronom koje potiču od molekula kiseonika, kao što su superoksid anjon i hidroksi radikal (5). Poznato je da ROS stimulišu inducibilni enzim azot-monoksid sintazu (iNOS), dovodeći do povećanja nivoa azot-monoksida (NO). Glavni izvor oksidativnog stresa u toku NASH je pojačano dopremanje i katabolizam SMK u hepatocitima, usled gojaznosti i IR. Beta oksidacija SMK vrši se u mitohondrijama i peroksizomima, a ω-oksidacija u endoplazmatskom retikulumu, posredovana CYP4A mikrozomalnim enzimskim sistemom (4).

Značajni faktori koji doprinose nastanku oksidativnog stresa su su i aktivnost ciklooksigenaze i lipooksigenaze, kao i mitohondrijalna disfunkcija (5). Osim toga, komponente antioksidativne zaštite od velikog su značaja u ćelijskom odgovoru na oksidativni stres. Stoga, smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima, poput SOD, katalaze i glutation peroksidaze (GSH-Px), kao i neenzimskih primaoca elektrona, kao što je redukovani glutation (GSH), mogu da doprinesu razvoju oksidativnog stresa (6,7). Usled porasta koncentracije ROS dolazi do peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, što dovodi do stvaranja aldehidnih nusproizvoda, kao što su MDA i 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), koji nam ukazuju na intenzitet lipidne peroksidacije (5).

Endokanabinoidni sistem (ES) se sastoji iz kanabinoidnih receptora (kanabinoidni receptori tipa 1 /CB<sub>1</sub>/ i tipa 2 /CB<sub>2</sub>/), endokanabinoida (anandamid /ANA/ i

2-arahidonoil-glicerol /2-AG/), kao i enzima uključenih u sintezu i razgradnju endokanabinoida (8). Kanabinoidi čine klasu raznolikih hemijskih jedinjenja koja aktiviraju kanabinoidne receptore u koje spadaju fitokanabinoidi (izolovani iz kanabisa), endokanabinoidi i sintetički kanabinoidi (9,10). Dosadašnja istraživanja su potvrdila prisustvo CB<sub>1</sub> receptora, kao i ANA i 2-AG, kako u hepatocitima, tako i u stelatnim ćelijama (11). Pokazano je da ES ima ulogu u razvoju NAFLD i drugim poremećajima povezanim sa gojaznošću (10). Disregulacija ES, koja nastaje kod gojaznih, dovodi do porasta unosa hrane, porasta telesne težine i akumulacije TAG u hepatocitima, sa posledičnim razvojem steatoze i IR (12,13). Dosadašnja istraživanja ukazuju da su hepatični CB<sub>1</sub> receptori uključeni u razvoj NAFLD, dislipidemije, kao i drugih poremećaja indukovanih primenom dijeta bogate mastima (engl. *High Fat Diet*, HFD) (tabela 1) (14,15).

**Tabela 1.** Sastav dijeta sa povećanim sadržajem masti (HFD)

Nutrijenti	%
Prečišćeni kazein	20
DL-metionin	0,30
Saharoza	30,58
Kukuruzni skrob	20
Kokosovo ulje	20
Alfacel, nenutritivna masa	5
DL- $\alpha$ -tokoferol u prahu (250 IV/gr)	0,12
AIN-76 mineralna mešavina	4
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>

Do sada nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi kojim ES utiče na inicijaciju i progresiju oksidativnog/nitrozativnog stresa u hepatocitima u toku NAFLD. Imajući to u vidu, cilj ovog istraživanja je da se ispita uticaj blokade CB<sub>1</sub> receptora na intenzitet oksidativnog/nitrozativnog stresa u jetri miševa sa NAFLD. U te svrhe upotrebljen je rimonabant, selektivni antagonist CB<sub>1</sub> receptora.

## Materijal i metode

### Životinje

Istraživanje je sprovedeno na mužjacima miševa C57BL/6 soja, starosti 8 nedelja, prosečne težine 21-25 g, uzgajanim na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu. Životinje su držane u pojedinačnim kavezima, u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (ambijentalna temperatura 22 ± 2°C; relativna vlažnost vazduha 50 ± 10%; ciklus svetlost/tama 12/12h, pri čemu su svetla paljena u 9 h ujutru), sa dostupnom vodom i hranom *ad libitum*. Tokom trajanja istraživanja vršeno je merenje dnevnog unosa hrane. Sve eksperimentalne procedure su u punoj saglasnosti

sa Direktivom Evropskog parlamenta (2010/63EU) i odobrene su od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta u Beogradu (dozvola broj 476/1).

### Eksperimentalni dizajn

Pre samog eksperimenta sve životinje (n = 28) bile su hranjene kontrolnom dijetom (standardnom peletiranom hranom za miševe). Sa navršenih 8 nedelja starosti nasumično su podeljene u sledeće grupe: <sup>1</sup>) Kontrolna grupa - životinje na standardnoj ishrani, u trajanju od 20 nedelja (C grupa; n = 7); <sup>2</sup>) Grupa životinja hranjena dijetom bogatom mastima, u trajanju od 20 nedelja (HF grupa; n = 7), <sup>3</sup>) Grupa životinja na standardnoj ishrani, tretirana rimonabantom nakon 18 nedelja (R grupa; n = 7), <sup>4</sup>) Grupa životinja hranjena dijetom bogatom mastima, tretirana rimonabantom nakon 18 nedelja (HFR grupa; n = 7). Sastav dijeta sa visokim sadržajem masti (*MP Biochemicals*, Kalifornija, SAD) prikazan je u tabeli 1. Dnevne doze rimonabanta (10 mg/kg) bile su administrirane HFR i R grupi orogastričnom sondom svakodnevno u toku poslednje dve nedelje. Istovremeno, C i HF grupa su dobijale fiziološki rastvor (0,9% NaCl), na isti način. Rimonabant je, pre administracije, rastvoren u 0,1% *Tween 80* u destilovanoj vodi, nakon čega je sonifikovan na ledu u trajanju od 20 sekundi pomoću digitalnog *Branson* sonifikatora.

Nakon 20. nedelje sve životinje su bile žrtvovane iskrvarenjem u opštoj anesteziji izazvanoj ketaminom (100 mg/kg, intraperitonealno /i.p./).

Uzorci krvi uzeti su punkcijom desne komore srca u cilju određivanja parametara oštećenja hepatocita (alanin aminotransferaze /ALT/ i aspartat aminotransferaze /AST/).

Uzorci tkiva jetre uzeti su u cilju određivanja parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa i antioksidativne zaštite.

### Priprema uzoraka za analizu

Uzorci tkiva jetre za biohemijsku analizu homogenizovani su na ledu, u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25 M/L saharoza, 10 mmol/L K/NaPO<sub>4</sub> pufer pH 7 i 1 mmol/L etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina /EDTA/) (*Serva, Feinbiochemica*, Hajdelberg, Njujork). Homogenati su zatim centrifugirani na 2000 obrtaja/min u trajanju od 15 minuta na 4 °C. Sediment je rastvoren u saharoza medijumu i potom centrifugiran. Supernatant je prebačen u epruvete, a zatim centrifugiran na 3200 obrtaja/min. u trajanju od 30 minuta na 4 °C. Izdvojeni sediment je rastvoren u dejonizovanoj vodi. Nakon sat vremena inkubacije, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 3000 obrtaja/min. na 4 °C, a izdvojeni supernatanti su čuvani na -70 °C. Proteini su određeni po Lovrijevoj metodi (Lowry), gde je goveđi serumski albumin upotrebljen kao standard (16).

### Biohemijski parametri

Aktivnosti AST i ALT merene su spektrofotometrijski na BTS-330 spektrofotometru prema uputstvu proizvođača. Rezultati su izraženi u jedinicama na litar (U/L).

Stepen lipidne peroksidacije je određen merenjem koncentracije MDA. Malondialdehid je određen spektrofotometrijski prema metodi koju su opisali Điroti (*Girotti*) i sar. (17). Rezultati su izraženi kao nmol MDA po miligramu proteina (nmol/mg proteina).

Koncentracija NO<sub>x</sub> kao mera produkcije NO, određena je spektrofotometrijski na 492 nm, korišćenjem Grisovog (*Griess*) reagensa (18). Rezultati su izraženi kao nmol NO<sub>x</sub> po miligramu proteina (nmol/mg protein).

Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (EC1.15.1.1. SOD) u jetri merena je spektrofotometrijski, kao inhibicija autooksidacije adrenalina na 480 nm, nakon dodavanja 10 mM adrenalina. Uzorci za određivanje MnSOD su prethodno tretirani sa 8 mM KCN (*Sigma*, Sent Luis, SAD) i zatim analizirani na prethodno opisan način (19). Aktivnost Cu/ZnSOD je određena kao razlika između aktivnosti ukupne SOD i MnSOD. Sve enzimske aktivnosti su izražene kao jedinice po miligramu proteina (U/mg proteina).

### Statistička analiza

Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD. Normalna distribucija parametara je potvrđena Kolmogorov-Smirnovljevim testom, dok je za procenu statističke značajnosti razlike između grupa korišćena analiza varijanse (ANOVA) sa Takijevim (*Tuckey*) *post hoc* testom. Razlika je smatrana statistički značajnom ako je vrednost  $p < 0,05$ . Za statističku analizu korišćen je kompjuterski program SPSS 15.0.

## Rezultati

### 1. Efekat blokade CB<sub>1</sub> receptora na aktivnost AST i ALT u serumu

U ovoj studiji uočili smo porast aktivnosti AST u serumu miševa HF grupe (242,30 ± 17,99 U/L) u odnosu na kontrolu (185,06 ± 7,25 U/L) ( $p < 0,01$ ). Primena rimonabanta dovela je do pada aktivnosti AST u R grupi (151,00 ±

11,15 U/L) u poređenju sa kontrolom (185,06 ± 7,25 U/L) ( $p < 0,01$ ). Slično tome, došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti AST u HFR grupi (122,44 ± 6,71 U/L) u poređenju sa HF grupom (242,30 ± 17,99 U/L) ( $p < 0,01$ ) (**grafikon 1**).

Rezultati studije pokazali su porast serumske aktivnosti ALT u HF grupi (62,71 ± 0,87 U/L) u odnosu na C grupu (46,22 ± 1,58 U/L) ( $p < 0,01$ ). Primena rimonabanta dovela je do pada aktivnosti ALT u R grupi (32,42 ± 0,98 U/L) u odnosu na kontrolu (46,22 ± 1,58 U/L) ( $p < 0,01$ ). Došlo je i do pada aktivnosti ALT u serumu životinja HFR grupe (31,44 ± 1,88 U/L) u poređenju sa HF grupom (62,71 ± 0,87 U/L) ( $p < 0,01$ ) (**grafikon 1**).

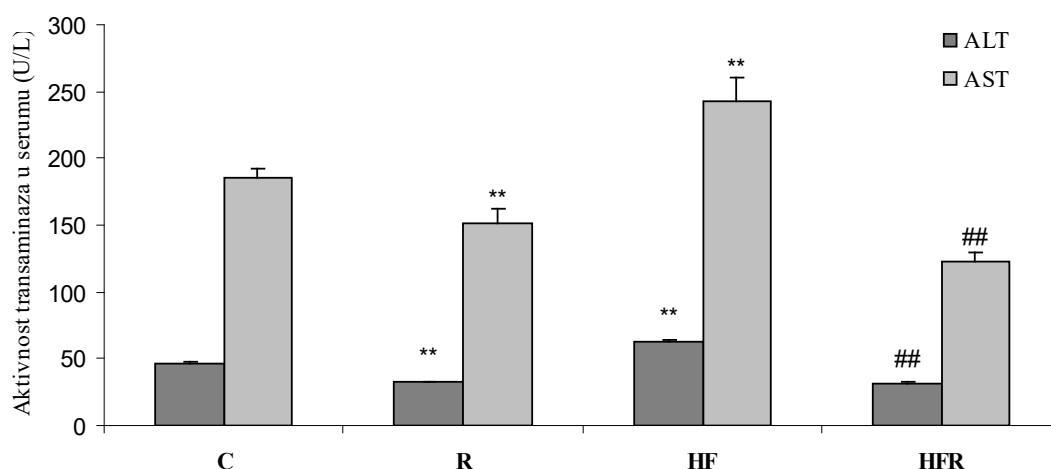
### 2. Efekat blokade CB<sub>1</sub> receptora na parametre oksidativno/nitrozativnog stresa u jetri

#### Koncentracija MDA u tkivu jetre

Uočeno je povećanje hepatične koncentracije MDA u HF grupi (764,59 ± 71,74 nmol/mg prot.) u odnosu na C grupu (684,10 ± 96,32 nmol/mg prot.) ( $p < 0,05$ ). Primena rimonabanta dovela je do smanjenja koncentracije MDA u R grupi (443,14 ± 22,29 nmol/mg prot.) u odnosu na kontrolu (684,10 ± 96,32 nmol/mg) ( $p < 0,01$ ). Slično tome, došlo je do pada koncentracije MDA u HFR grupi (181,11 ± 15,29 nmol/mg prot.) u odnosu na HF grupu (764,59 ± 71,74 nmol/mg prot.) ( $p < 0,01$ ) (**grafikon 2**).

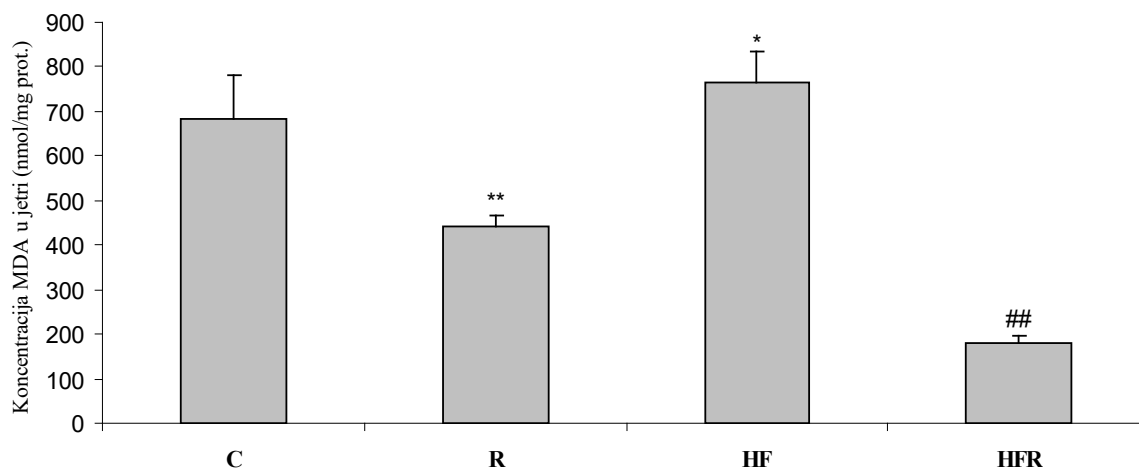
#### Koncentracija NO<sub>x</sub> u tkivu jetre

Primena HFD dovela je do porasta koncentracije NO<sub>x</sub> u HF grupi (19,15 ± 2,47 nmol/mg prot.) u odnosu na C grupu (14,56 ± 2,05 nmol/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Nasuprot tome, primena rimonabanta dovela je do smanjenja njegove koncentracije u HFR grupi (9,11 ± 1,16 nmol/mg prot.) u odnosu na HF grupu (19,15 ± 2,47 nmol/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Nije uočena statistički značajna razlika koncentracije NO<sub>x</sub> između R grupe (14,26 ± 1,44 nmol/mg prot.) i kontrole (14,56 ± 2,05 nmol/mg prot.) ( $p > 0,05$ ) (**grafikon 3**).

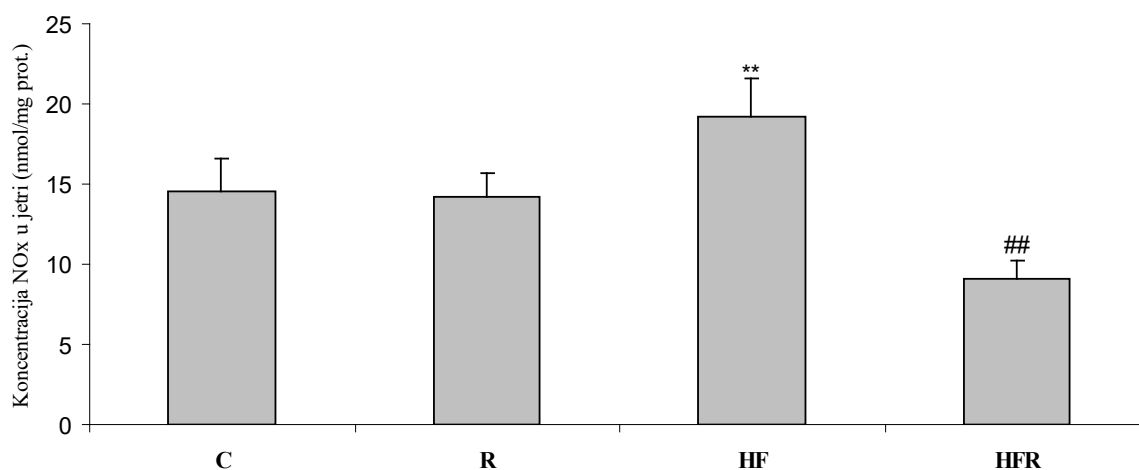


**Grafikon 1.** Aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) u serumu izražena u U/L. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. C - standardna ishrana; R - standardna ishrana uz tretman rimonabantom; HF - dijeta sa povećanim sadržajem masti; HFR - dijeta sa povećanim sadržajem masti uz tretman rimonabantom. Statistička značajnost razlike određivana je korišćenjem jednosmerne analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim *post hoc* testom. \*\* $p < 0,01$  u poređenju sa C grupom. ## $p < 0,01$  u poređenju sa HF grupom.





**Grafikon 2.** Koncentracija MDA u jetri miševa izražena u nmol/mg proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD. C - standardna ishrana; R - standardna ishrana uz tretman rimonabantom; HF - dijeta sa povećanim sadržajem masti; HFR - dijeta sa povećanim sadržajem masti uz tretman rimonabantom. Statistička značajnost razlike određivana je korišćenjem jednosmerne analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim *post hoc* testom. \* $p < 0,05$  u poređenju sa C grupom. \*\* $p < 0,01$  u poređenju sa C grupom. ## $p < 0,01$  u poređenju sa HF.



**Grafikon 3.** Koncentracija NO<sub>x</sub> u jetri miševa izražena u nmol/mg proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD. C - standardna ishrana; R - standardna ishrana uz tretman rimonabantom; HF - dijeta sa povećanim sadržajem masti; HFR - dijeta sa povećanim sadržajem masti uz tretman rimonabantom. Statistička značajnost razlike određivana je korišćenjem jednosmerne analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim *post hoc* testom. \*\* $p < 0,01$  u poređenju sa C grupom. ## $p < 0,01$  u poređenju sa HF grupom.

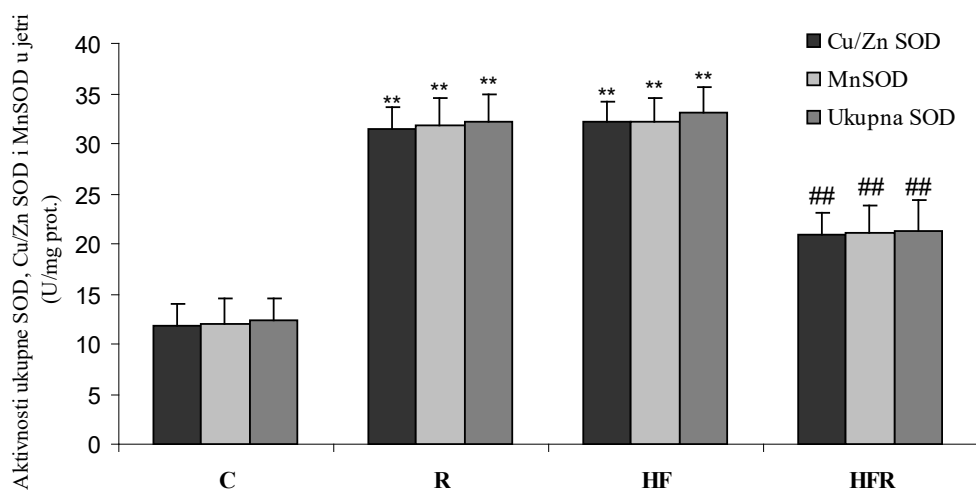
#### Aktivnosti ukupne SOD, Cu/ZnSOD i MnSOD u tkivu jetre

U ovoj studiji uočili smo povećanje aktivnosti ukupne SOD u jetri miševa HF grupe ( $33,12 \pm 2,55$  U/mg prot.) u odnosu na C grupu ( $12,38 \pm 2,16$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Primena rimonabanta dovela je do porasta aktivnosti ukupne SOD u R grupi ( $32,14 \pm 2,86$  U/mg prot.) u odnosu na kontrolu ( $12,38 \pm 2,16$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Nasuprot tome, uočili smo pad aktivnosti ukupne SOD u HFR grupi ( $21,24 \pm 3,08$  U/mg prot.) u odnosu na HF grupu ( $33,12 \pm 2,55$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ) (**grafikon 4**).

U ovoj studiji, analiza izoenzima SOD pokazala je porast aktivnosti Cu/ZnSOD u jetri životinja HF grupe ( $32,17 \pm 2,09$  U/mg prot.) u odnosu na C grupu ( $11,77 \pm 2,24$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Primena rimonabanta dovela

je do porasta njegove aktivnosti u R grupi ( $31,50 \pm 2,21$  U/mg prot.) u odnosu na kontrolu ( $11,77 \pm 2,24$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Nasuprot tome, rimonabant je doveo do smanjenja aktivnosti Cu/ZnSOD u HFR grupi ( $20,88 \pm 2,27$  U/mg prot.) u odnosu na HF grupu ( $32,17 \pm 2,09$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ) (**grafikon 4**).

Rezultati studije pokazali su porast aktivnosti MnSOD u jetri miševa HF grupe ( $32,24 \pm 2,31$  U/mg prot.) u odnosu na C grupu ( $11,96 \pm 2,51$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Primena rimonabanta dovela je do porasta aktivnosti MnSOD u R grupi ( $31,88 \pm 2,62$  U/mg prot.) u poređenju sa kontrolom ( $11,96 \pm 2,51$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ). Nasuprot tome, uočeno je smanjenje aktivnosti ovog enzima u HFR grupi ( $21,11 \pm 2,76$  U/mg prot.) u odnosu na HF grupu ( $32,24 \pm 2,31$  U/mg prot.) ( $p < 0,01$ ) (**grafikon 4**).



**Grafikon 4.** Aktivnosti ukupne SOD, Cu/Zn SOD i MnSOD u jetri miševa izražene u U/mg proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD. C - standardna ishrana; R - standardna ishrana uz tretman rimonabantom; HF - dijeta sa povećanim sadržajem masti; HFR - dijeta sa povećanim sadržajem masti uz tretman rimonabantom. Statistička značajnost razlike određivana je korišćenjem jednosmerne analize varijanse (ANOVA) sa Takijevim *post hoc* testom. \*\* $p < 0,01$  u poređenju sa C grupom. ### $p < 0,01$  u poređenju sa HF grupom.

## Diskusija

Rezultati naše studije su pokazali da primena HFD izaziva hepatocelularno oštećenje, što se vidi na osnovu porasta aktivnosti transaminaza u serumu eksperimentalnih životinja (**grafikon 1**). Nasuprot tome, primena rimonabanta dovela je do značajnog smanjenja aktivnosti AST i ALT u obe tretirane grupe (**grafikon 1**). Razvoj oksidativnog stresa u našoj studiji potvrđen je porastom koncentracije MDA u jetri miševa koji su bili na dijeti bogatoj mastima (**grafikon 2**). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije koju su sproveli *Fakhoury-Sayegh* i sar., koji su na istom eksperimentalnom modelu pokazali da HFD dovodi do razvoja NAFLD i hepatocelularnog oštećenja (20). Uzimajući u obzir predloženu hipotezu „dva udara“, rezultati studije koju su sproveli *Jorgačević* i sar. pokazali su da oksidativno/nitrozativni stres igra značajnu ulogu u razvoju NAFLD (3). S tim u vezi, naša studija ukazuje da endokanabinoidi pogoršavaju stepen oksidativnog stresa u toku NAFLD i to posredstvom CB<sub>1</sub> receptora. Do ovakvih rezultata došli su *Gary-Bobo* i sar. koji su, pored navedenog, dokazali i potencijalno korisne efekte blokade CB<sub>1</sub> receptora u toku NAFLD (21).

Jedan od značajnijih izvora slobodnih radikala u NAFLD su mitohondrije. Usled primene HFD dolazi do intenzivnije  $\beta$ -oksidacije u mitohondrijama, što posledično dovodi do povećane mitohondrijalne proizvodnje ROS (2). Pokazano je da je odnos oksidativnog stresa i inflamacije u toku NASH bidirekcion (22). Naime, porast ekspresije oksidaze redukovane nikotinamid adenin dinukletotid fosfata (NADPH) u Kupferovim ćelijama takođe predstavlja jedan od značajnih mehanizama koji dovodi do porasta produkcije ROS u toku NASH (23). Ovom studijom smo pokazali da ES u toku NAFLD ispoljava prooksidativne efekte, koje smo potvrdili smanjenjem koncentracije MDA nakon primene rimonabanta (**grafikon 2**). Porast

produkcije ROS dovodi do mitohondrijalne disfunkcije koja doprinosi razvoju oksidativnog stresa. S tim u vezi, *Fakhoury-Sayegh* i sar. pokazali su da se u toku NASH mitohondrijalna disfunkcija s vremenom samo pogoršava, i to usled strukturnih promena u mitohondrijalnoj membrani, kao i respiratornom lancu (24). Sledeći značajan izvor ROS u NAFLD predstavlja povećana ekspresija gena za *CYP2E1*. Do porasta aktivnosti navedenog enzima može doći usled povećanog dopremanja SMK u hepatocite, kao i postojanja IR (25). Brojne eksperimentalne i kliničke studije su pokazale da ES umnogome doprinosi razvoju NAFLD, kako stimulacijom prooksidativnih mehanizama, tako i pogoršavanjem stepena IR i povećanjem intenziteta *de novo* lipogeneze u jetri (26,27). Ovom studijom smo pokazali da blokada CB<sub>1</sub> receptora u značajnoj meri smanjuje intenzitet lipidne peroksidacije (smanjenje koncentracije MDA) (**grafikon 2**). Slično tome, *Hussien* i sar. su na istom animalnom modelu potvrdili da rimonabant smanjuje koncentraciju MDA u jetri (28). U našoj studiji primena HFD je dovela do porasta koncentracije NO<sub>x</sub> u HF grupi (**grafikon 3**). Studija koju su sproveli *Pankaj* i sar. pokazala je da primena HFD dovodi do indukcije hepatocelularnog oštećenja stimulacijom produkcije NO<sub>x</sub> (29). Porast koncentracije MDA u ovim grupama govori u prilog citoskičnom dejstvu NO, ali i drugih slobodnih radikala (29). Pokazano je, naime, da NO<sub>x</sub> ispoljava citotoksične efekte porastom produkcije peroksinitrita usled reakcije NO i superoksidnog anjona (29). U ovoj studiji smo uočili značajan porast aktivnosti ukupne SOD i njenih izoformi u HF grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (**grafikon 4**). Ovo bi se moglo objasniti adaptivnim odgovorom hepatocita na porast produkcije slobodnih radikala. S druge strane, uočen je značajan pad aktivnosti ukupne SOD i njenih izoformi u HFR grupi u odnosu na HF grupu. Ovo bi se moglo objasniti protektivnim efektom rimonabanta, koji se ogleda u smanjenju oksidativnog stresa,

a samim tim i smanjenom potrebom za aktivnošću ovih enzima. Porast aktivnosti MnSOD koji smo uočili u ovoj studiji (**grafikon 4**) nije iznenađujući, imajući u vidu da su mitohondrije u toku NAFLD jedan od značajnijih izvora ROS (23). Slično našim rezultatima, porast aktivnosti Cu/ZnSOD uočili su i *Hardwick* i sar. (30). Oni su, proučavajući aktivnost različitih mehanizama antioksidativne zaštite u toku NAFLD, došli do zaključka da je povećana aktivnost enzima antioksidativne zaštite u pozitivnoj korelaciji sa stepenom oštećenja jetre (30).

## Zaključak

Na osnovu rezultata naše studije može se zaključiti da blokada CB<sub>1</sub> receptora dovodi do smanjenja stepena hepatocelularnog oštećenja smanjenjem aktivnosti ALT i AST u serumu miševa u odnosu na kontrolnu grupu. Došlo je i do smanjenja intenziteta oksidativnog/nitrozativnog stresa i lipidne peroksidacije, što je pokazano značajnim smanjenjem koncentracije MDA i aktivnosti ukupne SOD i njenih izoformi u grupama tretiranim rimonabantom.

Buduće studije bi trebalo da budu usmerene u cilju daljeg objašnjenja i dopune naših dosadašnjih saznanja o ulozi ES u patogenezi NAFLD. Takve studije bi trebalo da detaljnije ispituju protektivne efekte rimonabanta u razvoju oksidativno/nitrozativnog stresa na molekularnom nivou, kao i genetsku i epigenetsku osnovu potencijano terapijski korisnih efekata.

## Literatura

1. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:145-171.
2. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016; 65(8):1038-1048.
3. Jorgačević B, Mladenović D, Ninković N, Prokić V, Stanković MN, Aleksić V et al. Dynamics of oxidative/nitrosative stress in mice with methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Exp Toxicol.* 2014; 33 (7):701-709.
4. Jennie Ka CL, Xiang Z, Jun Y. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol.* 2017; 241:36-44.
5. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52:59-69.
6. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(11):26087-26124.
7. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta.* 2011; 412:1297-1305.
8. Jorgačević B, Vučević D, Đuričić I, Šobajić S, Mladenović D, Vesković M et al. The effect of cannabinoid receptor 1 blockade on hepatic free fatty acid profile in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Chem Phys Lipids.* 2017; 204:85-93.
9. Tam J, Liu J, Mukhopadhyay B, Cinar R, Godlewski G, Kunos G. Endocannabinoids in liver disease. *Hepatology* 2011; 53:346-355.
10. Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, Manin S, Lotersztajn. The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings. *Br J Pharmacol.* 2011; 163:1432-1440.
11. Hanus L, Avraham Y, Ben-Shushan D, Zolotarev O, Berry EM, Mechoulam R. Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain. *Brain Res.* 2003; 983:144-151.
12. Bermudez-Silva FH, Cardinal D, Cota D. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J Psychopharmacol.* 2012; 26:114-124.
13. Vettor R, Pagano C. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23:51-63.
14. Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ. Cannabinoids, eating behaviour, and energy homeostasis. *Drug Test Anal.* 2014; 6:52-58.
15. Di Marzo V, Despres JP. CB1 antagonists for obesity-what lessons have we learnt from rimonabant? *Nat Rev Endocrinol.* 2009; 5:633-638.
16. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
17. Girotti M, Khan N, McLellan B. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma.* 1991; 31:32-35.
18. Hibbs JB, Taintor R, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 157:87-94.
19. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autooxidation. *Anal Biochem.* 1978; 90:81-90.
20. Fakhoury-Sayegh N, Trak-Smayra V, Khazzaka A, Esseily F, Obeid O, Lahoud-Zouein M, Younes H. Characteristics of nonalcoholic fatty liver disease induced in wistar rats following four different diets. *Nutr Res Pract.* 2015; 9(4):350-357.
21. Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, et al. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology.* 2007; 46:122-129.
22. Petta S, Muratore C, Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future. *Dig Liver Dis.* 2009; 41:615-625.
23. Videla LA. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanism. *World J Hepatol.* 2009; 1(1):72-78.
24. Fakhoury-Sayegh N, Trak-Smayra V, Khazzaka A, Esseily F, Obeid O, Lahoud-Zouein M et al. Characteristics of nonalcoholic fatty liver disease induced in wistar rats following four different diets. *Nutr Res Pract.* 2015; 9(4):350-357.
25. Aubert J, Begriche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in

- non-alcoholic fatty liver disease: Mechanism and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011; 35:630-637.
26. Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P. CB<sub>1</sub> antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2010; 59:926–934.
27. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S RIO-Europe Study Group. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. 2005; 365:1389–1397.
28. Hussien NI, El-Kerdasy HI, Ibrahim ME. Protective effect of rimonabant, a cannabinoid receptor 1 antagonist, on non-alcoholic fatty liver disease in a rat model through modulation of the hepatic expression of activin A and follistatin. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017; 95(12):1433-1441.
29. Pankaj GJ, Sanjay SJ. Isolation, characterization and hypolipidemic activity of ferulic acid in high-fat-diet-induced hyperlipidemia in laboratory rats. *Excli J*. 2016; 15: 599-613.
30. Hardwick RN, Fisher CD, Canet MJ, Lake AD, Cherrington NJ. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38:2293-2301.