



Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u krvi bolesnika sa ehinokokusnom bolesti jetre

Activity of antioxidative defense enzymes in the blood of patients with liver echinococcosis

Aleksandar Lilić*, Srđan Denčić*, Sladan Z. Pavlović†, Duško P. Blagojević†,
Mihajlo B. Spasić†, Nebojša S. Stanković‡, Zorica S. Saičić†

Zdravstveni centar, *Hirurško odeljenje, **Pirot**; Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, †Odeljenje za fiziologiju, **Beograd**; Vojnomedicinska akademija, ‡Klinika za abdominalnu i endokrinu hirurgiju, **Beograd**

Apstrakt

Uvod/Cilj. Ehinokokusna bolest je parazitno oboljenje koje nastaje prodorom larvene forme pseće pantljičare (*Echinococcus granulosus*) u jetru čoveka, pri čemu dolazi do reakcije domaćina koji se brani od infektivnog agensa aktivacijom sistema komplementa i komplement-zavisnim imunim odgovorom. Cilj ovog rada bio je da se utvrdi da li razvoj larvenog oblika pseće pantljičare (*Echinococcus granulosus*) u jetri ima uticaja na aktivnost enzima sistema zaštite od oksidacionih oštećenja u krvi obolelih pre i posle operativnog zahvata. **Metode.** Ispitivane su promene aktivnosti enzima sistema zaštite od oksidacionih oštećenja: bakar/cink sadržavajuće superoksid-dismutaze (CuZn SOD), katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px), glutation-reduktaze (GR) i glutation-S-transferaze (GST) u krvi obolelih od ehinokokusne bolesti jetre pre i posle operacije u odnosu na kontrolne, klinički zdrave osobe. **Rezultati.** Ustanovljen je statistički značajan pad aktivnosti enzima GSH-Px u plazmi bolesnika obolelih od ehinokokusne bolesti jetre pre operacije u odnosu na kontrolu. Aktivnost enzima GST bila je statistički značajno povećana u krvi obolelih od hronične ehinokokusne bolesti jetre posle operacije u odnosu na kontrolne vrednosti. **Zaključak.** Hronična ehinokokusna bolest jetre izaziva promene aktivnosti nekih enzima sistema zaštite od oksidacionih oštećenja, pre svega Se-zavisnog enzima GSH-Px, što može predstavljati dobar biomarker u daljoj biohemijskoj evaluaciji ove bolesti. Prema dostupnim podacima ovaj rad predstavlja prvu studiju aktivnosti enzima sistema zaštite od oksidacionih oštećenja kod obolelih od hronične ehinokokusne bolesti jetre pre i posle operacije u odnosu na kontrolne, klinički zdrave osobe.

Ključne reči:

echinococcus granulosus; jetra; krv; katalaza; glutation peroksidaza; glutation reduktaza; glutation-S-transferaza; superoksid dismutaza; oksidativni stres.

Abstract

Background/Aim. Chronic echinococcal disease is the parasite human disease caused by the penetration of larval (asexual) stages of the canine tapeworm (*Echinococcus granulosus*) in the liver of humans. After the penetration of the parasite, the host organism react by activating complement-dependent immune response. The aim of this study was to elucidate the influence of larval form of *Echinococcus granulosus* in the liver on the activity of antioxidative defense enzymes in the blood of patients before and after the surgical intervention. **Methods.** We investigated the activity of antioxidative defense enzymes: copper/zinc containing superoxide dismutase (CuZn SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST) in the blood of patients before and after the surgical intervention in respect to the controls, clinically healthy persons. **Results.** Our results showed that the activity of the GSH-Px was significantly decreased in the plasma of the patients with echinococcal disease before the surgery in respect to the controls. The activity of GST was significantly higher in the blood of the patients after the surgery in comparison to the controls. **Conclusion.** Chronic liver echinococcal disease caused significant changes of some antioxidative defense enzymes, first of all Se-dependent enzyme GSH-Px, which could be a suitable biomarker in the biochemical evaluation of the disease. This work represents a first comprehensive study of the activity of antioxidative defense enzymes in chronic liver echinococcosis in the patients before and after the surgical intervention in respect to the clinically healthy persons.

Key words:

echinococcus granulosus; liver; blood; catalase; glutathione peroxidase; glutathione reductase; superoxide dismutase; glutathione-S-transferase; oxidative stress.

Uvod

Ehinokokusna bolest je parazitar, cistična bolest koja nastaje invazijom i razvojem larvene forme pseće pantljičare (*Echinococcus granulosus*) u organizmu čoveka. Početkom osamdesetih godina prošlog veka zapadnoevropske zemlje su iskorenile ovu bolest na svojim teritorijama. Ona se zadržala na prostoru južnog dela Balkanskog poluostrva, uključujući i našu zemlju, zatim na području Mediterana, Bliskog istoka, Australije, Kine i Južne Amerike, odnosno na područjima sa umerenom klimom i razvijenim stočarstvom, u prvom redu, ovcarstvom^{1,2}.

Incidencija humane infekcije je oko dva obolela na 1 000 stanovnika, ali je sigurno i veća u ruralnim područjima najugroženijih regiona³. Kod ljudi, cistična ehinokokusna bolest se najčešće razvija u jetri i plućima^{4,5}.

Imuni odgovor domaćina stimulišu larveni antigeni (onkosfere, germinativna i hidatidna membrana i protoskoleksi). U toku rane infekcije, parazit aktivira sistem komplementa, kao i komplement-zavisni imuni odgovor. Prilikom diferencijacije u hidatidnu cistu, cistični zid aktivira domaćinov komplement. Reakcija nije jaka zbog mehanizama na cističnom zidu koji inhibišu aktivaciju komplementa⁶. Bolesnici sa ehinokokom imaju povišene vrednosti IgG i IgM za specifične antigene ciste. Hirurška intervencija dovodi do povećanja količine antitela sa maksimumom od druge do šeste nedelje postoperativno, a nakon 6 do 12 meseci nivo antitela se vraća na normalu, ako je egzereza bila kompletna.

Slobodni radikali i druge reaktivne vrste kiseonika najvećim delom nastaju u mitohondrijama ćelija, ali i u ćelijskim membranama, peroksidomima, mikrozmomima, inflamatornim ćelijama i fagocitima i odgovorni su za nastanak mnogih oštećenja u ćeliji. Postoje tri mehanizma koji dovode do toga: 1) interakcija slobodnih radikala sa biološkim strukturama pri čemu nastaju kovalentne modifikacije makromolekula, prvenstveno proteina i nukleinskih kiselina, 2) razaranje membranskih lipida u procesu lipidne peroksidacije i 3) formiranje neradikalnih produkata koji specifično deluju na različite ciljeve u ćeliji. Pored neorganskih, u ćelijama mogu nastati i različite forme organskih radikala^{7,8}.

U normalnim uslovima, u ćelijama postoji ravnoteža između produkcije slobodnih radikala i njihove eliminacije. Međutim, povećanje produkcije slobodnih radikala ili smanjenje antioksidativne zaštite ćelije izaziva oksidativni stres koji može biti indukovano različitim faktorima spoljašnje sredine, kao što su uticaj teških metala⁹, sezonski uticaji^{10,11}, uticaj tireodnih hormona^{12,13}, UV zračenje, mikroorganizmi, malnutricija, stres i sl.⁸. Ćelije koje su naročito osetljive na antioksidativni stres su eritrociti. Zbog stvaranja hidroksil radikala i njima izazvane peroksidacije membranskih lipida, smanjuje se propustljivost membrane eritrocita i ometa prenos kiseonika u tkiva, sa svim posledicama koje iz toga proizilaze.

Polazeći od činjenice da se ingestija parazita dešava u mnogo slučajeva i da, zahvaljujući dejstvu imunog sistema domaćina od trećeg do petog meseca od infestacije mnoge larve ne prežive, postavljen je cilj ovog rada: da se utvrdi da li razvoj živog (preživelog) larvenog oblika pseće pantljičare

(*Echinococcus granulosus*) u jetri ima uticaja na aktivnost enzima sistema zaštite od oksidativnih oštećenja u krvi obolelih pre i posle operativnog zahvata.

Metode

U našoj studiji korišćena je krv dobijena od kontrolne grupe ispitanika (klinički zdrave osobe), kao i od obolelih od ehinokokusne bolesti jetre koja je potvrđena klinički, ultrazvukom, kompjuterizovanim tomografijom i serološki. Uzorci krvi su dobijeni od bolesnika lečenih u hirurškom odeljenju Zdravstvenog centra Pirot, kao i u Klinici za opštu i vaskularnu hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Svi ispitanici su podeljeni u tri grupe: kontrolna – klinički zdrave osobe (n = 18), oboleli od ehinokokusne bolesti jetre pre operacije, od kojih su uzorci krvi uzeti jedan dan pre operacije (n = 8) i oboleli od ehinokokusne bolesti jetre koji su operisani i od kojih su uzorci krvi uzeti prvi dan posle operacije (n = 10).

Zbog uvida u efekat operativnog zahvata na aktivnost enzima sistema zaštite od oksidativnih oštećenja u grupu bolesnika posle operacije uključeni su svi ispitanici kojima je izvršen hirurški zahvat i koji su bili dostupni za našu studiju.

Određivane su aktivnosti sledećih enzima: bakar/cink sadržavajuće superoksid-dismutaze (CuZn SOD, EC 1.15.1.1), katalaze (CAT, EC 1.11.1.6), glutation-peroksidaze (GSH-Px, EC 1.11.1.9) i glutation-reduktaze (GR, EC 1.6.4.2) u lizatu eritrocita, kao i aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST, EC 2.5.1.18) u plazmi ispitanika.

Centrifugiranjem krvi na 5 000 rpm u trajanju od 15 minuta, odvajana je plazma od eritrocita, koji su zatim ispirani tri puta sa po 2 ml fiziološkog rastvora i centrifugirani tri puta po 10 minuta na 5 000 rpm¹⁴. Ovako isprani eritrociti su lizirani hladnom destilovanom vodom. U pripremljenom lizatu određivana je cijanmethemoglobinskom metodom koncentracija hemoglobina¹⁵. Lizat je razblaživan do koncentracije 5%, a zatim je određivana aktivnost enzima GSH-Px. U lizatu eritrocita određivana je aktivnost enzima bakar/cink sadržavajuće superoksid-dismutaze (CuZn SOD), metodom koja se zasniva na praćenju inhibicije adrenalina u adrenohrom¹⁶. Za određivanje aktivnosti ovog enzima iz eritrocita je prethodno uklonjen hemoglobin metodom Tsuchihashi¹⁷. Aktivnost CuZn SOD je izražavana u jed./g Hb. Aktivnost CAT u lizatu eritrocita određivana je praćenjem brzine dekompozicije vodonik peroksida i izražavana je u $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/g Hb} \times 10^4$ i u $\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{min/ml krvi}$ ¹⁸.

Aktivnost enzima GSH-Px u lizatu eritrocita određivana je Maral metodom¹⁹ koja predstavlja modifikovanu Gunzler metodu²⁰, a zasniva se na praćenju oksidacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u prisustvu t-butilhidroperoksida i izražavana je kao $\text{nmol NADPH}/\text{min/g Hb}$. Aktivnost GR određivana je metodom koju su opisali Glatzle i sar.²¹ i izražavana je u $\mu\text{mol NADPH}/\text{min/g Hb}$.

Aktivnost enzima GST u plazmi ispitanika određivana je korišćenjem 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) kao supstrata, a izražavana je u $\text{nmol GSH}/\text{min/ml plazme}$ ²².

Rezultati u tabeli i na slikama prikazani su kao srednja vrednost \pm SD (standardna devijacija). Statistički značajna

razlika ispitivanih grupa bolesnika upoređivana je u odnosu na kontrolne, klinički zdrave osobe.

Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je analizom varijanse (ANOVA). *Post-hoc* poređenje je urađeno korišćenjem standardizovnog Tuckey *t* testa^{23,24}.

Rezultati

Kod obolelih od ehinokokusne bolesti jetre pre i posle operacije konstatovana je manja koncentracija hemoglobina u odnosu na kontrolnu grupu klinički zdravih osoba (tabela 1).

Tabela 1

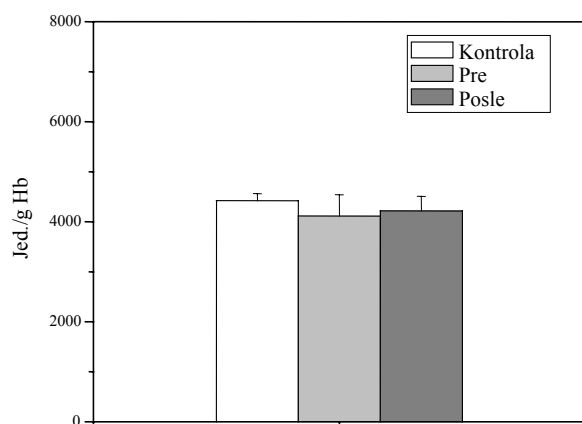
Koncentracija hemoglobina (Hb) izražena u g Hb/100 mL krvi u eritrocitima kontrolnih klinički zdravih osoba, kao i grupama bolesnika pre operacije i posle operacije

	g Hb/100 ml krvi
Kontrola	7,21 ± 0,13
Pre operacije	6,49 ± 0,27*
Posle operacije	6,74 ± 0,17*
ANOVA	$p < 0,0001$

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD

* značajna razlika prema kontrolnoj grupi

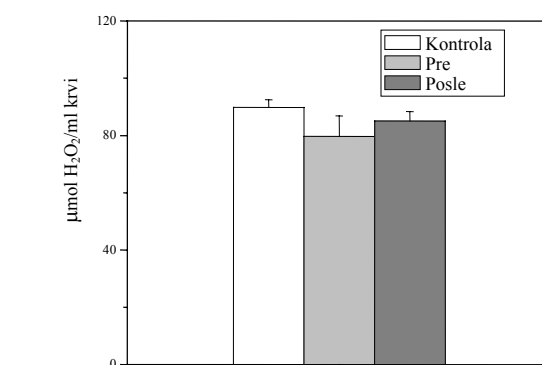
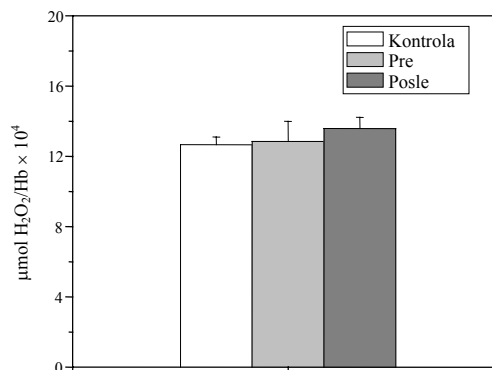
Aktivnosti enzima CuZn SOD i CAT (slike 1 i 2) nisu statistički značajno promenjene u krvi obolelih od ehinokokusne bolesti jetre pre i posle operacije u odnosu na kontrolnu grupu.



Sl. 1 – Aktivnost bakara/cink sadržavajuće superoksid-dismutaze (CuZn SOD, Jed/g Hb) u eritrocitima kontrolnih klinički zdravih osoba, kao i bolesnika pre operacije (Pre) i posle operacije (Posle).

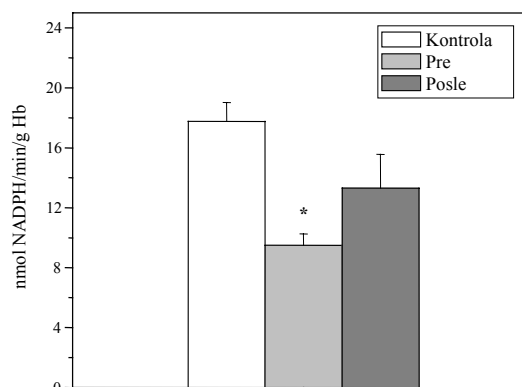
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

Aktivnost enzima GSH-Px je statistički značajno smanjena kod obolelih od ehinokokusne bolesti jetre pre operacije ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu (slika 3). Posle operacije u krvi obolelih od ehinokokusne bolesti dolazi do povećanja aktivnosti GSH-Px u odnosu na bolesnike pre operacije (bez statističke značajnosti), tako da pretpostavljamo da postoji izvestan uticaj ehinokokusne ciste na aktivnost ovog enzima u krvi.



Sl. 2 – Aktivnost katalaze (CAT) u eritrocitima kontrolnih, klinički zdravih osoba, kao i bolesnika pre operacije (Pre) i posle operacije (Posle)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.



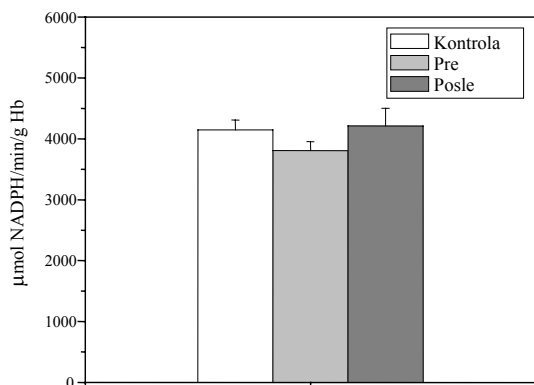
Sl. 3 – Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) izražena u nmol NADPH/min/g Hb u eritrocitima kontrolnih klinički zdravih osoba, kao i bolesnika pre operacije (Pre) i posle operacije (Posle). Statistička značajnost je određivana analizom varijanse (ANOVA, $p < 0,001$).

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

* značajna razlika prema kontroli

Kao što je prikazano na slici 4 nema statistički značajnih promena aktivnosti GR u zavisnosti od prisustva larvenog oblika *Echinococcus granulosus* i konstatovana akti-

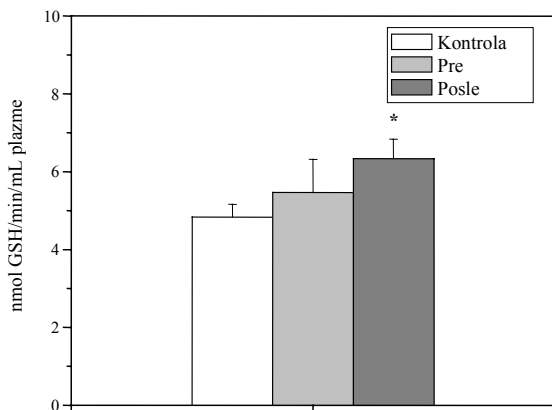
vnost ovog enzima u sve tri grupe ispitanika je nepromenjena.



Sl. 4 – Aktivnost glutation-reduktaze (GR) izražena u μmol NADPH/min/g Hb u eritrocitima kontrolnih klinički zdravih osoba, kao i bolesnika pre operacije (Pre) i posle operacije (Posle).

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

Značajne razlike su zabeležene u aktivnosti enzima GST u plazmi ispitanika (slika 5). Konstatovano je značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u plazmi obolelih posle operacije u odnosu na kontrolnu grupu klinički zdravih osoba ($p < 0,05$). Kod bolesnika pre operacije nema značajne različitosti u poređenju sa zdravim ispitanicima i bolesnicima posle operacije.



Sl. 5 – Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u plazmi izražena u nmol GSH/ml plazme u plazmi kontrolnih klinički zdravih osoba, kao i bolesnika pre operacije (Pre) i posle operacije (Posle). Statistička značajnost je određivana analizom varijanse (ANOVA, $p < 0,05$).

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD.

* značajna razlika prema kontroli

Diskusija

Posle prodora heksakantičnog embriona parazita u zid tankog creva, ulaska u portnu cirkulaciju i lociranja u lobulima jetre, kod čoveka se aktivira imunološki sistem odbrane. Efektorski mehanizmi uključuju oslobađanje toksičnih molekula iz granula imflamatornih ćelija i produkciju slobod-

nih radikala kiseonika i azota. Citotoksični proteini, koje sekretuju efektorske ćelije imunog sistema, oštećuju membrane parazita, dok radikali kiseonika i azota mogu direktno inaktivirati ili uzrokovati denaturaciju intracelularnih proteina, degradaciju nukleinskih kiselina, kao i peroksidaciju membranskih lipida²⁵. *Echinococcus granulosus* se adaptira na oksidativni stres da bi se odbranio, što se može zaključiti po povećanju sinteze antioksidativnih enzima koje protoskoleksi izlučuju u cistični zid i hidatidni fluid, kao i po sintezi enzima tioredoksin-peroksidaze (TPx), za koji se smatra da ima ključnu ulogu u detoksikaciji vodonik peroksida (H_2O_2). U citosolu protoskoleksa zabeležena je povećana aktivnost GST čija je uloga u detoksikaciji elektrofila, kao i tioredoksina (TRX), koji obezbeđuje ćelijsku zaštitu reaktiviranjem denaturisanih proteina koji sadrže pogrešno sparene disulfidne veze ili uklanja reaktivne vrste kiseonika (naročito H_2O_2 i hidroksil radikala – OH^{*})²⁶.

U literaturi postoji malo podataka o aktivnosti enzima CuZn SOD i CAT u krvi obolelih od hronične ehinokokusne bolesti jetre. Međutim, pokazano je da u svim ispitivanim ekstraktima *Echinococcus granulosus* postoji aktivnost CuZn SOD koja je najveća u protoskoleksima. Aktivnost mangansadržavajuće superoksid-dismutaze (Mn SOD) je detektovana samo u protoskoleksima i iznosi oko 15% ukupne SOD aktivnosti. Zanimljiv je i podatak da ekstrakti zida hidatidne ciste i hidatidne tečnosti nefertilnih cisti nemaju merljive aktivnosti SOD²⁷.

Ozen i sar.²⁸ su utvrdili da postoji smanjenje koncentracije selena u serumu bolesnika sa hidatidnom cistom u odnosu na koncentraciju selena u serumu zdravih osoba ($60,24 \pm 1,96$ μg/l u serumu zdravih, a $41,30 \pm 1,94$ μg/l u serumu obolelih). S obzirom da je GSH-Px selen-zavistan enzim, to može biti uzrok smanjenja aktivnosti ovog enzima, odnosno smanjenje koncentracije Se u serumu bolesnika se može povezati sa smanjenjem aktivnosti ovog enzima. Kod visceralne lajšmanijaze takođe je zabeleženo smanjenje aktivnosti GSH-Px²⁹. Pokazano je da kod malarije izazvane parazitom *Plasmodium vivax* dolazi do smanjenja aktivnosti enzima GSH-Px u lizatu eritrocita³⁰. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na postojanje pozitivne korelacije između koncentracije Se u plazmi i aktivnosti GSH-Px, odnosno postojanje zavisnosti aktivnosti ovog enzima od koncentracije Se u krvi³¹.

Glutation-reduktaza održava ravnotežu između redukovanog i oksidovanog glutationa. Može se zapaziti (slika 4) da nije došlo do statistički značajnih promena aktivnosti GR u zavisnosti od prisustva larvenog oblika *Echinococcus granulosus* i da je aktivnost ovog enzima u sve tri grupe ispitanika nepromenjena. Sies³² je ukazao na čestu promenu aktivnosti GR sa promenom GSH-Px, a Lopez-Torres i sar.³³ su takođe ukazali na promene GR sa promenama u aktivnosti SOD. Kod visceralne lajšmanijaze konstatovano je smanjenje aktivnosti GR²⁹. Međutim, u našem radu je pokazano da se aktivnost ovog enzima ne menja kod ispitivanih grupa, što ukazuje na uspostavljanje specifičnih homeostatskih mehanizama kod obolelih od ehinokokusne bolesti jetre.

Značajne razlike su takođe zabeležene i u aktivnosti enzima GST u plazmi ispitanika (slika 5). Konstatovano je značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u plazmi bolesnika

posle operacije u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Može objašnjenje za povećanje aktivnosti GST u plazmi bolesnika posle operacije je efekat operativnog zahvata, uticaj anestetika i otvaranje abdomena, što sve predstavlja stresnu situaciju za organizam. Postoji malo podataka o aktivnosti GST u domaćinu parazita *Echinococcus granulosus*, ali pojedini autori su ispitivanjem aktivnosti ovog enzima u cisti parazita ustanovili da tretman konvencionalnim preparatima, kao što je na primer mebendazol, indukuje smanjenje aktivnosti GST u zidu ciste, a to može dovesti do poremećaja u funkcionisanju sistema zaštite od antioksidativnih oštećenja u organizmu parazita³⁴.

Dobijeni rezultati idu u prilog našoj pretpostavci da prisustvo larve parazita *Echinococcus granulosus* kod čoveka dovodi do smanjenja koncentracije seleno u serumu obolelih kao i smanjenja aktivnosti Se-zavisnog enzima GSH-Px u lizatu eritrocita, čime se tumači slabljenje efekata imunog odgovora, što može biti novi biomarker za prisustvo ehinokokne ciste u jetri. Lipidi su dominantni gradivni elementi membrane ćelija, koji regulišu transport hranljivih materija i učestvuju u prenosu signala. Nažalost, većina lipida podložna je lipidnoj peroksidaciji u uslovima oksidativnog stresa, kome su posebno izložena crvena krvna zrnca. Ako ćelijski odbrambeni sistem (AOS) ne može da ukloni problem indukovanih lipidnom peroksidacijom, ćelije funkcionišu abnormalno. Kada je aktivnost enzima GSH-Px smanjena, kao u ovom

slučaju, štetne sistemske posledice su sigurne. Zbog toga je neophodna suplementacija selenom u cilju restitucije aktivnosti enzima GSH-Px. Pošto Se-zavisnost metabolizma parazita nije poznata, suplementacija selenom može se preporučiti bez bojazni u postoperativnoj fazi.

Zaključak

Naši rezultati pokazuju da dolazi do promene aktivnosti enzima GSH-Px i GST u krvi obolelih od ehinokokusne bolesti jetre, ali da nije zabeležena statistički značajna promena aktivnosti enzima CuZn SOD, CAT i GR, kao ni koncentracije hemoglobina.

Povećana aktivnost GST u plazmi bolesnika posle operacije najverovatnije je posledica oksidativnog stresa indukovanih operativnim zahvatom, odnosno uticajem anestetika i/ili otvaranjem abdomena.

Prema podacima dostupnim u literaturi, za ovaj rad se može reći da predstavlja prvu studiju aktivnosti enzima sistema zaštite od oksidativnih oštećenja kod bolesnika sa hroničnom ehinokokusnom bolešću jetre pre i posle operacije u odnosu na kontrolne, klinički zdrave osobe.

Zahvalnica – Ovaj rad je finansiralo Ministarstvo nauka i zaštite životne sredine Republike Srbije, broj Projekta: 143035B.

L I T E R A T U R A

1. *El Mufti M.* The simple hydatid cyst. In: *El Mufti M*, editor. Surgical management of hydatid disease. London: Butterworths; 1989. p. 1–55.
2. *Stanković N.* The new approach in surgical treatment of liver hydatid disease [dissertation]. Belgrade: Military Medical Academy; 1992. (Serbian)
3. *Petrović M, Dugalić D, Popović M, Miličević M, Stefanović B, Žuvela M*, et al. Occurrence of echinococcosis in Yugoslavia. *Acta Chir Jugosl* 1989; 36 Suppl 2: 532–6. (Serbian)
4. *Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K.* Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int J Parasitol* 2000; 30(12–13): 1283–94.
5. *Brumpt E.* *Precis de parasitologie*. 6-ieme edition. Paris: Masson & Cie; 1949. (French)
6. *Ferreira AM, Irigoin F, Breijo M, Sim RB, Diaz A.* How *Echinococcus granulosus* deals with complement. *Parasitol Today* 2000; 16(4): 168–72.
7. *Hallinell B, Gutteridge JMC.* *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press; 1999.
8. *Žikić R, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR.* Toxicological significance of protection against oxidative damage. Kragujevac: Prirodnomatemički fakultet; 2000. (Serbian)
9. *Ognjanović BI, Marković SD, Pavlović SZ, Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS.* Combined effects of coenzyme Q₁₀ and vitamin E in cadmium induced alterations of antioxidant defense system in the rat heart. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 22(2): 219–24.
10. *Pavlović SZ, Belić D, Blagojević DP, Radojičić RM, Žikić RV, Saičić ZS*, et al. Seasonal variations of cytosolic antioxidant enzyme activities in the liver and white muscle of thinlip gray mullet (*Liza ramada* Risso) from the Adriatic Sea. *Cryo Letters* 2004; 25(4): 273–85.
11. *Borković SS, Šaponjić JS, Pavlović SZ, Blagojević DP, Milošević SM, Kovačević TB*, et al. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005; 141(4): 366–74.
12. *Saičić ZS, Mijalković DN, Nikolić AL, Blagojević DP, Spasić MB, Petrović VM.* Effect of thyroxine on antioxidant defense enzyme activities and glutathione content in brain of different matured rats. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* 2005; 41(1): 1–11.
13. *Saičić ZS, Mijalković DN, Nikolić AL, Blagojević DP, Spasić MB.* Effect of thyroxine on antioxidant defense system in the liver of different aged rats. *Physiol Res* 2006; 55(5): 561–8.
14. *McCord JM, Fridovich I.* Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6049–55.
15. *Drabkin D, Austin H.* Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *J Biol Chem* 1935; 112: 51–5.
16. *Misra HP, Fridovich I.* The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170–5.
17. *Tsuchibashi M.* Zur Kenntnis der Blutkatalase. *Biochem Z* 1923; 140: 65–74. (German)
18. *Beutler E.* Catalase. In: *Beutler E*, editor. *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton Inc; 1982. p. 105–6.
19. *Maral J, Puget K, Michelson AM.* Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77(4): 1525–35.
20. *Ganzler WA, Vergin H, Muller I, Flohe L.* Glutathione peroxidase VI: the reaction of glutathione peroxidase with various hydroperoxides. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1972; 353(6): 1001–4. (German)
21. *Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K.* Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the

- assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30(6): 665–7.
22. *Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB*. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22): 7130–9.
23. *Hinkle ED, Wiersma W, Jurs GS*. Applied statistics for behavioral sciences. 3rd ed. Boston: Houghton Mifflin Company; 1994.
24. *Manley BFJ*. Multivariate statistical methods: a primer. London: Chapman and Hall; 1986.
25. *Chalar C, Martinez C, Agorio A, Salinas G, Soto J, Ehrlich R*. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin gene from *Echinococcus granulosus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262(1): 302–7.
26. *Fernandez V, Chalar C, Martinez C, Musto H, Zaba A, Fernandez C*. *Echinococcus granulosus*: molecular cloning and phylogenetic analysis of an inducible glutathione S-transferase. *Exp Parasitol* 2000; 96(3): 190–4.
27. *Salinas G, Cardozo S*. *Echinococcus granulosus*: heterogeneity and differential expression of superoxide dismutases. *Exp Parasitol* 2000; 94(1): 56–9.
28. *Ozgen N, Celik C, Ozkan K, Malazgirt Z, Isimer A, Sayal A*. Trace elements in hydatid disease. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1992; 6(2): 67–70.
29. *Sen G, Mukhopadhyay R, Ghosal J, Biswas T*. Oxidative damage of erythrocytes: a possible mechanism for premature hemolysis in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. *Ann Hematol* 2001; 80(1): 32–7.
30. *Sarin K, Kumar A, Prakash A, Sharma A*. Oxidative stress and antioxidant defence mechanism in *Plasmodium vivax* malaria before and after chloroquine treatment. *Indian J Malariol* 1993; 30(3): 127–33.
31. *Rukgauer M, Nengebauer RJ, Plecko T*. The relation between selenium, zinc and copper concentration and the trace element dependent antioxidative status. *J Trace Elem Med Biol* 2001; 15(2–3): 73–8.
32. *Sies H*. Oxidative stress: Introductory remarks. In: *Marr J, Muller M*, editors. *Oxidative stress*. New York: Academic Press; 1995.
33. *Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G*. Simultaneous induction of sod, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. *Free Radic Biol Med* 1993; 15(2): 133–42.
34. *Feng JJ, Guo HF, Yao MY, Xiao SH*. Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on glutathione S-transferase and superoxide dismutase of *Echinococcus granulosus* cyst wall harbored in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1995; 16(4): 297–300.

Rad je primljen 5. XII 2006.