

Efecto de la exposición crónica al aluminio sobre indicadores de estrés oxidativo en hígados regenerantes

González, M. A¹; Contini, M. C.¹; Mahieu, S.¹; Carrillo, M. C.²; Bernal, C.³

1- Cátedra de Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. Universidad Nacional del Litoral

2- Instituto de Fisiología Experimental. Universidad Nacional de Rosario.

3- Cátedra de Bromatología y Nutrición. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. Universidad Nacional del Litoral.

Resumen: El objetivo del siguiente trabajo fue estudiar el efecto de la exposición crónica al Aluminio (Al) sobre parámetros relacionados al estrés oxidativo en hígados regenerantes de ratas Wistar machos, a los 0 y 2 días post-hepatectomía parcial (65%). Se analizaron las actividades enzimáticas catalasa, glutatión peroxidasa, el contenido de glutatión y el índice de lipoperoxidación. A los 0 y 2 días de la hepatectomía parcial, se observó, a nivel hepático, un aumento en el índice de lipoperoxidación y una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes, lo que reflejaría un aumento en la producción de radicales libres, sin modificación de los niveles de glutatión. El Al *per se* provoca cambios similares, con disminuciones muy significativas en catalasa y en los niveles de glutatión. En animales expuestos crónicamente al Al y hepatectomizados se observó un efecto aditivo, detectándose una acentuada lipoperoxidación. Esto puede estar directamente relacionado con la disminución de glutatión. Por otro lado el Al provocaría una inhibición importante en la actividad catalasa que contribuiría a explicar el marcado aumento en lipoperoxidación. El presente estudio, puede potencialmente, tener un importante impacto clínico debido a la posibilidad de alta exposición al Al en pacientes con hepatectomía parcial.

Palabras claves: hepatectomía- aluminio- estrés oxidativo- hígado

Summary: «Effect of the chronic exposure to aluminum on indicators of oxidative stress on liver regeneration. González M. A¹, Contini M. C.¹, Mahieu S.¹, Carrillo M. C.², Bernal C.³. The aim of the present study was to investigate the effect of chronic exposure to Aluminium (Al) on parameters related to oxidative stress on liver regeneration of male Wistar rats, at 0 and 2 days after partial hepatectomy (65%). The catalase and glutatión peroxidase activities, the content of glutatión and lipoperoxidation were analyzed. In animals with partial hepatectomy, an increase in the lipoperoxidation index and a decrease in the activity of antioxidant enzymes, was observed which would reflect an increase in the production of free radicals, without modification of the levels of glutatión. The Al «per se» causes similar changes, with very significant decreases in catalase activity and the levels of glutatión. In hepatectomized animals an addition of the effects is observed, a considerable lipoperoxidation being detected. This can be directly related to the decrease in glutatión. On the other hand, Al would cause an important inhibition of catalase activity, which would contribute to explain the marked increase in lipoperoxidation.

These study may have an important clinical impact due to the potential high exposure to aluminium of patients with partial hepatectomy.

Key words: Hepatectomy – aluminium- oxidative stress- liver

* **Correspondencia:**

Bioq. Marcela González. maidagon@fcb.unl.edu.ar.
4 de Enero 1186. Santa Fe. TE: 0342-4594763.

Recibido: 08-07-04

Aceptado: 09-09-04

Introducción

El aluminio (Al) es un contaminante conocido tanto de soluciones de diálisis como de soluciones de nutrición parenteral, antiácidos digestivos, etc. La introducción del Al en productos alimenticios, farmacéuticos y en el tratamiento de aguas, ha incrementado la exposición y en paralelo la biodisponibilidad del mismo.

Una exposición crónica al Al puede producir efectos adversos en humanos y en animales de experimentación. En estos últimos, ha sido demostrado que la exposición crónica al Al ha estado asociada a una acumulación de dicho elemento en riñón, estómago, cerebro e hígado (1,2).

Las alteraciones producidas por exposición crónica con Al en la función secretoria biliar han sido descriptos anteriormente (3), entre ellas ratas expuestas entre 1-14 días al Al (5mg/kg p.c. por día, i.v), incrementan la concentración de sales biliares en suero, lo que estaría asociado a una reducción en el flujo biliar (4) y a una alteración en la relación glicina/taurina en sales biliares (5). Jeffery y col. (6), encontraron una reducción en los niveles de citocromo P450, enzima de la fase uno de detoxificación en microsomas hepáticos (6).

El hígado desempeña un papel vital en la digestión, así como también en degradar fármacos y sustancias extrañas que pueden formar productos metabólicos que dañan la célula hepática e interfieren con sus funciones. Dentro de las sustancias tóxicas metabolizadas por el hígado se encuentran los radicales libres generados a través del oxígeno (7).

Bajo condiciones fisiológicas normales, las células producen especies de oxígeno reducidas como peróxido de hidrógeno, anión superóxido e hidroxilo. Es ampliamente aceptado que la supervivencia celular depende de las defensas antioxidantes que se encargan de la remoción de especies de oxígeno tóxicas. Estos radicales pueden causar una gran variedad de alteraciones nocivas en las células incluyendo peroxidación de lípidos de membrana, inactivación de enzimas y daño al DNA.

La injuria producida por el efecto tóxico del oxígeno a través de la generación de los radicales libres debe ser prevenida por los mecanismos generados por el hígado. Estudios experimentales han demostrado claramente como la injuria hepática está

asociada al estrés oxidativo. El desarrollo celular produce un incremento en el índice de la producción de oxidantes que pueden causar la expresión de nuevas proteínas y la supresión de genes expresados durante las anteriores etapas de desarrollo (8).

El Al interfiere con las enzimas involucradas en la eliminación de radicales libres incrementando la actividad de la enzima xantina oxidasa y disminuyendo la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) (9). No obstante, no existe, al menos a nuestro conocimiento, información sobre el efecto del Al en animales parcialmente hepatectomizados. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la exposición crónica al Aluminio (Al) sobre parámetros relacionados al estrés oxidativo en hígados regenerantes de animales de experimentación.

Materiales y métodos

Animales y tratamiento

Se utilizaron ratas Wistar machos, peso promedio 300g (n = 6 en cada grupo experimental). Los animales fueron sometidos a dieta estándar (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina) *agua ad libitum* y mantenidos a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), con un ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas.

Luego de 7-10 días de aclimatación, los animales fueron sometidos a diferentes tratamientos según el protocolo ilustrado en Fig. 1. Los grupos experimentales fueron:

1- Al(+): ratas que recibieron 3 veces por semana durante 90 días, aluminio elemental (i.p.) en dosis de 27 mg/kg p.c. bajo la forma de Hidróxido de Aluminio (10-11).

2- Al(-): ratas que recibieron idéntico volumen de vehículo en forma i.p. durante el período y frecuencia descriptos en las ratas Al(+).

3- Al(+)+HP: ratas que posterior a los 90 días de tratamiento con aluminio se les realizó la resección del 65% del hígado y fueron evaluadas a los 2 días de la cirugía.

4- Al(-)+HP: ratas con una resección del 65% del hígado y evaluadas a los 2 días de la cirugía.

Protocolo experimental

Las hepatectomías parciales se realizaron según la técnica de Higgins y Anderson (12), luego de 90 días de tratamiento o no con Al.

A los 0 y 2 días luego de las hepatectomías, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50mg / Kg p.c). Los animales fueron sacrificados y los hígados removidos, pesados y lavados con solución fisiológica fría.

Determinación de ^3H -Timidina al DNA

Para evaluar la eficiencia de la regeneración hepática se midió la incorporación de ^3H -timidina al DNA en los animales que fueron sometidos a hepatectomía parcial.

Determinación del contenido de aluminio en plasma e hígado

El contenido de aluminio en plasma e hígado se determinó por espectroscopia de absorción atómica (AAS) (Horno de grafito y Espectrómetro Perkin-Elmer 5000).

Determinación de actividades enzimáticas

Se prepararon los homogenados hepáticos utilizando un homogenizador tipo Potter. Se obtuvo el citosol y la fracción microsomal por dos centrifugaciones sucesivas (10.000g por 10 minutos y 100.000g por 60 minutos) con buffer conteniendo 0,001 M EDTA; 0,03 M Na_2HPO_4 y 0,25 M de sacarosa (pH 7,4). De estos homogenados se tomó una alícuota para las distintas determinaciones.

La actividad enzimática de catalasa (CAT) fue determinada por el método de Beers y col. (13), basado en la disminución de la absorbancia entre los 45 y 60 segundos, midiendo el consumo del sustrato H_2O_2 a 240nm y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) midiendo a 340 nm, la cantidad de NADPH consumidos en la reacción, por el método de Paglia y Valentine (14).

La actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) fue determinada usando como sustrato 1-cloro-2,4- dinitrobenzenu (CDNB) según el método de Goldstein y Coombes (15) adicionando glutatión 0,5 mM a un buffer KH_2PO_4 0,1 M pH = 6,5 a 25 °C) registrando las absorbancias a 340 nm.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (16) para expresar los resultados de las actividades enzimáticas por mg de proteínas.

Contenido de glutatión hepático

El contenido de glutatión (GSH) se evaluó espectrofotométricamente en homogenados hepáticos preparados con ácido tricloroacético al 5% en CIH 0,01 M por el método colorimétrico de Ellman (17)

Peroxidación lipídica

La lipoperoxidación se midió en homogenados de hígado en KCl 1,15 % en la proporción 1:10 en peso, como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando como testigo externo 1,1,3,3-tetrametoxipropano, de acuerdo al método de Ohkawa y col. (18). Los productos resultantes de la reacción entre TBA y el hidrolizado, fueron extraídos con n-butanol y el color fue medido a 532 nm. Los TBARS fueron expresados en términos de niveles de malonildialdehído (MDA) en nmoles / g de tejido húmedo.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron expresados como la media \pm SEM. Las variables fueron analizadas en un 2 x 2 factorial ANOVA seguidos por un test LSD. Un valor con $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Luego de los 90 días de tratamiento con AI, como así también luego de realizadas las hepatectomías parciales, no se registraron muertes de los animales de experimentación como tampoco signos evidentes de toxicidad tanto en los grupos AI(+) como en los grupos AI(-).

Al finalizar el tratamiento con AI, los pesos corporales de los animales no fueron significativamente diferentes comparados con los animales no tratados (AI(+) 350 \pm 4 g vs 325 \pm AI(-) 10 g en $p > 0.05$).

La incorporación de ^3H -timidina al DNA fue usada como medida de la capacidad de regeneración hepática. En la Fig. 2 se observa un marcado grado de regeneración hepática al primer día luego de la HP, mostrando una mayor tendencia en los animales tratados con AI. El segundo día post-hepatectomía, el grado de regeneración hepática disminuye alcanzando niveles semejantes en ambos grupos.

La Tabla 1 muestra los niveles de aluminio en plasma e hígado alcanzados al final de los 90 días de tratamiento y posterior a la hepatectomía. Como se

puede observar, en forma totalmente previsible, los animales tratados con Al, mostraron elevados niveles de Al en plasma e hígado. Además, tanto la albuminemia como el contenido de Al en tejido hepático no mostraron influencia por la hepatectomía.

Las actividades enzimáticas CAT, GSH-Px y GST en homogenados hepáticos de animales tratados con Al o hepatectomizados, mostraron una disminución significativa. Cuando analizamos ambos tratamientos en forma conjunta (Al (+) + HP), las actividades de las enzimas CAT y GSH-Px no mostraron efecto aditivo, mientras que la actividad GST tiende a una mayor disminución (Fig. 3).

El contenido de glutatión hepático (Fig. 4) disminuyó significativamente por el tratamiento con Al en los animales no hepatectomizados. No obstante en animales parcialmente hepatectomizados no fueron observadas diferencias significativas en los niveles de glutatión por efecto del Al. A los 2 días de la hepatectomía parcial, no se observaron modificaciones de los niveles de GSH hepáticos.

El tratamiento con Al aumentó significativamente el grado de lipoperoxidación hepática tanto en los animales hepatectomizados como en aquellos no intervenidos quirúrgicamente. Asimismo se observaron importantes incrementos de la lipoperoxidación hepática por efecto de la hepatectomía. Las dos variables analizadas, Al y HP, mostraron claramente un efecto aditivo (Fig. 5).

Discusión

El hígado está especialmente preparado para metabolizar fármacos y sustancias tóxicas que recoge de la circulación portal. Este posee mecanismos de defensa que actúan contra una gran variedad de tóxicos, llevando a la inactivación del agente. Bajo circunstancias normales los hepatocitos son células que cumplen una variedad de funciones específicas, entre las que particularmente nos referimos, que son la biotransformación de xenobióticos y la formación de la bilis.

Luego de una hepatectomía parcial, cuando el hígado se está regenerando, pacientes en diálisis, hemodiálisis, transplantados o consumidores de antiácidos pueden estar expuestos crónicamente a niveles relativamente elevados de aluminio.

Nuestro protocolo experimental contempla dos variables experimentales: tratamiento con Al y tiempos de regeneración hepática (0 y 2 días).

Oleaga y col. (19) han demostrado que animales expuestos a una hepatectomía parcial pueden recuperar el peso normal hepático luego de 7 a 10 días de la cirugía. La incorporación de timidina al DNA, indicador de la regeneración hepática, claramente demuestra que los hígados están regenerándose a lo largo del período experimental hasta alcanzar su tamaño original (20). Nosotros encontramos máxima regeneración en el primer día post-hepatectomía (en el presente trabajo se muestran solo los valores correspondientes a los dos primeros días post-HP).

Por otro lado, en trabajos preliminares hemos encontrado que la exposición crónica al Al en animales de experimentación, produce una reducción del 30% del flujo biliar, datos coincidentes con Klein y col. (4), así como también una alteración en el transporte hepático de aniones orgánicos, como la BSP (6).

El análisis del fenómeno secretorio a los 2 días post-hepatectomía parcial sugiere que el hígado no ha recuperado aún el funcionalismo observado antes de la resección. Una compensación parcial de la masa hepática perdida ha sido observada en distintos aspectos. Este fenómeno ha sido descrito en varias ocasiones por distintos autores (21,22). El nivel de estrés oxidativo (balance entre pro-oxidante y antioxidante) aumenta con la diferenciación celular y envejecimiento. También depende de la tasa de generación de antioxidantes, entre ellos el GSH, CAT y GSH-Px (8).

El glutatión juega un importante papel en diversos fenómenos biológicos tales como la detoxificación de metabolitos electrofílicos, de xenobióticos y protección contra daño oxidativo a lípidos y proteínas de membranas que resultan de la formación de peróxido de hidrógeno, superóxidos y otros radicales libres. Sustancias tóxicas son conjugadas con glutatión dentro de los hepatocitos en un proceso catalizado por GST y luego excretada con la bilis (21).

Debido a la resección hepática hay un aumento de la proliferación celular, principalmente hay un incremento del índice mitótico, lo cual está modifican-

do la eficiencia secretoria del hígado (23, 24), en este caso disminuyéndola.

Ha sido reportado(25) una elevación de la lipoperoxidación microsomal acompañado de una disminución en la actividad de la enzima antioxidante CAT en el hígado de ratas tratadas con una administración intraperitoneal de $AlCl_3$.

Esta información resulta muy relevante ya que los sistemas de transporte involucrados en la eliminación de estas sustancias son también los sistemas que eliminan compuestos potencialmente tóxicos, endo-xenobióticos, incluyendo bilirrubina, sales biliares glucuronizadas y sulfatadas, medicamentos, etc. (26).

Los datos obtenidos en este modelo de exposición prolongada a altas dosis de Al, muestran una manifiesta toxicidad en varios aspectos. El aluminio *per se* provoca cambios similares a la hepatectomía parcial con disminución muy significativa en la actividad de la enzima catalasa y en los niveles de glutatión celular. La actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa disminuyeron en ambos tiempos de hepatectomía. En los animales hepatectomizados expuestos al Al, se observa un efecto aditivo de ambas variables, detectándose una marcada lipoperoxidación. Esto puede estar directamente relacionado con la disminución del contenido de glutatión y la inhibición importante que realizan ambos tratamientos sobre la actividad de enzimas detoxificadoras. La inducción de esta condición oxidativa en el tejido hepático podría ser atribuida a un efecto directo del metal sobre la activación o en la síntesis enzimática y/o consecuencia de un aumento en la producción de radicales libres

debido al metabolismo elevado en el proceso de regeneración hepática.

Nuestros datos podrían mostrar, por un lado, la posible hepatotoxicidad producida por el aluminio a través de la producción de estrés oxidativo, indicado por el aumento de la lipoperoxidación y un decrecimiento de los niveles de defensas antioxidantes, incluyendo GSH y enzimas antioxidantes como CAT y GSH-Px, datos coincidentes con otros autores los cuales con administración de dosis más pequeñas de aluminio y en períodos más cortos de tiempo inducen significativos incrementos en la producción de especies oxígeno reactivas (27). Estos efectos están asociados con un decrecimiento en los niveles hepáticos de defensas antioxidantes incluyendo GSH (28,29), CAT (28) and GSH-Px (29). Además, el decrecimiento en la actividad de la enzima detoxificadora GST, en ambos tratamientos, puede ser un factor que contribuya a disminuir la detoxificación de hidroperóxidos de lípidos (29).

Las alteraciones observadas en el estrés oxidativo a nivel hepático luego de ambos tratamientos (Al y HP), podrían ser compatibles con un arresto de la transcitosis vesicular que media tanto la movilización al polo apical como la secreción de componentes lipídicos y proteicos biliares. Estudios más profundos de transportadores canaliculares responsables de la transferencia a bilis, tanto del flujo biliar dependiente como independiente de sales biliares, y su asociación con el estrés oxidativo podrían explicar los mecanismos involucrados en las alteraciones de la transcitosis vesicular.

El presente estudio puede potencialmente tener un importante impacto clínico debido a la posibilidad de alta exposición al Al en pacientes con hepatectomía parcial.

Tabla 1: Contenido de aluminio en plasma y tejido hepático en los grupos experimentales: Al(-), Al(+), Al(-)+HP y Al(+)+HP. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM (6 animales / grupo). Valores que no comparten el mismo subíndice son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

	Al(-)	Al(+)	Al(-)+HP	Al(+)+HP
Contenido de Al en plasma (mg/l)	8,5 \pm 4 ^a	750 \pm 50 ^b	7,5 \pm 8 ^a	818 \pm 4 ^b
Contenido de Al en hígado (mg/g)	26.0 \pm 8.5 ^a	121.7 \pm 12.1 ^b	15.0 \pm 9.5 ^a	145.7 \pm 10.1 ^b

Figura 1: Protocolo experimental

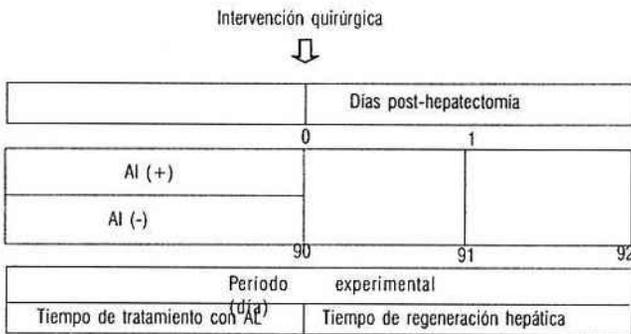


Figura 2: Incorporación de ³H-Timidina al DNA en hígados regenerantes de los grupos Al(-) y Al(+). Resultados expresados como la media \pm SEM.

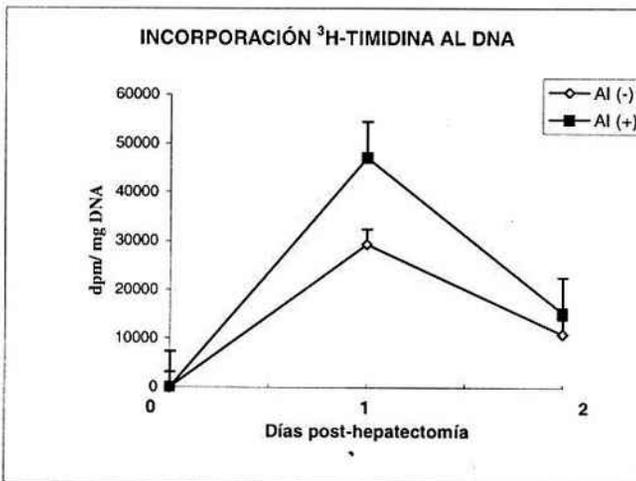


Figura 3: Actividades de las enzimas hepáticas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glutatión-S-transferasa (GST) en los grupos de ratas Al(-), Al(+), Al(-)+HP y Al(+)+HP. Resultados expresados como la media \pm SEM (6 animales / grupo). Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

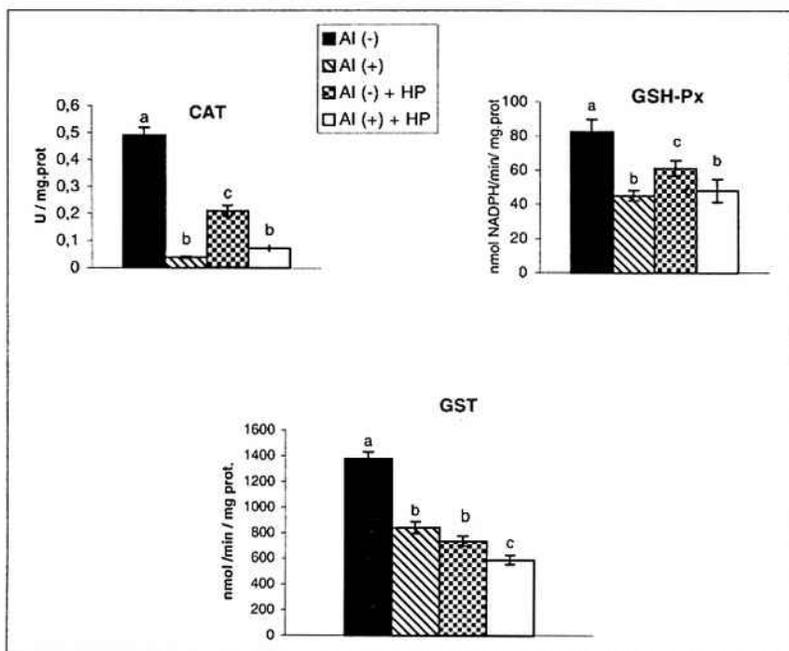


Figura 4: Contenido de Glutacion en los grupos de ratas Al(-), Al(+), Al(-)+HP y Al(+)+HP. Resultados expresados como la media \pm SEM (6 animales/grupo). Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.

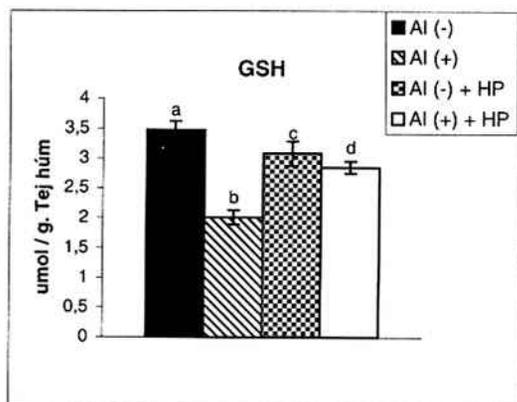
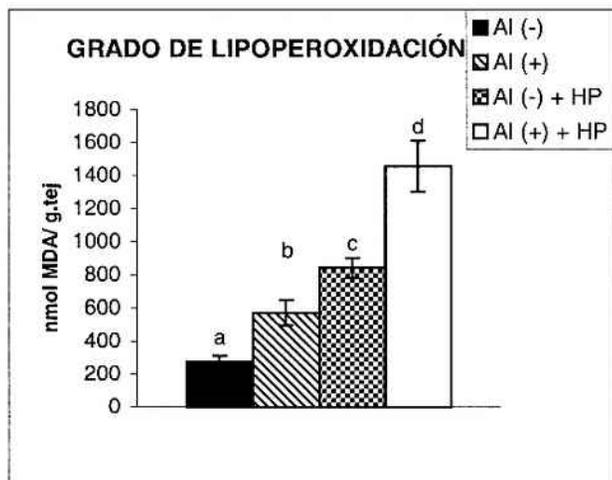


Figura 5: Lipoperoxidación en hígado en los grupos de ratas Al(-), Al(+), Al(-)+HP y Al(+)+HP. Resultados expresados como la media \pm SEM (6 animales/grupo). Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes a un nivel de $p < 0,05$.



Bibliografía

- Cannata, JB. 1988. "Aluminium-induced toxicity in dislysed patients. Role of water and other sources on its pathogenesis. Water treatment monograph. EDTNA-ERCA", Pitman. 3: 50-64.
- Yokel, R; and McNamara, P. 2001. "Aluminum toxicokinetics: An update". *Pharmacol. Toxicol.* 88: 159-167.
- González, MA, Contini, MC, Millen, N, Mahieu, S 1998 "Variaciones de parámetros de funcionabilidad hepática por efecto del aluminio" *Revista FABICIB* 2: 75-82
- Klein, GL; Heyman, MB ;Lee, TC; et al.1988."Aluminum-associated hepatobiliary dysfunction in rats: relationships to dosage and duration of exposure". *Pediatr Res*; 23: 275-8
- Klein, GL; Lee, TC; Herman, MB and Rassin, DK.1989. "Altered glycine and taurine conjugation of bile acids following aluminum administration to rats". *J. Pediatr.Gastroenterol. Nutr.* 9: 105-7
- Jeffery, EH; Cansen, HT; and Dellinger, ja. 1987. "In vivo interactions of aluminum with hepatic cytochromo P-450 and metallothionein". *Fundam. Appl. Toxicol.* 8: 541-8
- Rhoades R. y Tamer G.1980." *Fisiología Humana*". Ed. Masson-Little Brown, S.A.. 1997. I:613-675
- Sohal, RS; and Allen, RG.1990. *Experimental Gerontology.* 25: 499.
- Moumen, R; Ait-Oukhatar, N; Bureau, F; Fleury, C; Bougle, D; Arhan, P; Neuville, D; and Viader,F.2001."Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat." *J Trace Elem Med Biol, Jan 2001*;15(2-3):89-93.
- Calvo, ML; Mahieu, S; Millen, N; González, MA; Contini, MC. 1998. "Evaluation of Biochemical parameters in aluminized rats". *Acta physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana.*48:32-40.
- Degiorgis, NM; Itoiz, ME y Cabrini, RL. 1987. «Modelo experimental para el estudio de las alteraciones óseas producidas por aluminio". *Actas II Congreso Osteolog. y metab. Mineral.* 19.
- Higgins, G. M. and Anderson, R. M. 1931. *Arch. Pathol.* 12, 186-202
- Beers, RF; and Sizer, LW. 1952. "A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase". *J. Biol. Chem.* 195,133-140.
- Paglia, D.E and Valentine W.N. 1967."Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase". *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169

- 15- Goldstein, J; and Combes, B. 1966. "Spectrophotometric assay of the liver enzyme that catalyzes sulfobromophthalein glutathione conjugation". *J.Lab.Clin. Med.* **67**: 863-872
- 16- Lowry, O. H. Rosobrough, N. J. ,Farr , A. L. Randall, R. J. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *Biol. Chem.* **193**, 265- 275.
- 17- Ellman, G. L. 1959. "Tissue sulfhydryl groups". *Archs Biochem. Biophys.* **82**, 70- 73.
- 18- Ohkawa, H; Ohishi, N; and Yagi, K. 1979. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Anal. Biochem.* **95**: 351-358
- 19- Oleaga, A; González, J; and Esteller, A. 1987 . " Effects of two-thirds hepatectomy on sulfobromophthalein handling by the rat liver" *Comp Biochem Physiol* **87**:13-19
- 20- Carnovale, CE; Monti, JA; Favre, C; Scapini, C; and Carrillo, MC.1995 "Is intestinal cytosolic glutathione S-transferase an alternative detoxification pathway in two-thirds hepatectomized rats?"*Life Sci, Jan*; **57**(9): 903-10.
- 21- Klaassen, CD. 1974." Comparison of the effects of two hepatectomy and bile duct ligation on hepatic excretory function". *J Pharmac exp Ther* **191**: 25-31
- 22- Uesegi, T; Bognacki, J; and Levine, WG. 1976. "Biliary excretion of drugs in the rat during liver regeneration". *Biochem. Pharmac.* **25**: 1187-1193
- 23- Kanashima, R; Nagasue, N ;Furusawa, M and Inokuchi, K .1983." Inhibitory effect of cimetidine on liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats". *An J Surg* **146**: 293-298
- 24- Tanaka, Y; Nagasue, N; Kanashima, R; Inokuchi, K ;and Shirota, A.1982. "Effect of doxorubicin on liver regeneration and host survival after two-thirds hepatectomy in rats ". *Cancer* **49**: 19-23
- 25- Fulton, B; and Jeffery, EH. 1994. "The temporal relationship between hepatic GSH loss, heme oxygenase induction and cytochrome P450 loss following intraperitoneal aluminium administration to mice". *Toxicology and applied Pharmacology.* **127**: 291-297.
- 26- Takikama, H. 2002." Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions". *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **9**: 443-447
- 27- Abubakar, MG; Taylor, A; and Ferms, GA. 2003." Aluminium administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat" *Int J Esp Pathol* **84**: 49-54
- 28- El-Maraghy, SA; Gad, MZ; Fahim, AT; and Hamdy, MA. 2001." Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues". *J Biochem Mol Toxicol* **15**: 207-214
- 29- Mari, M; and Cederbaum, AI. 2001." Induction of catalase, and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress". *Hepatology* **33**: 652-661