

Osobitosti toksičnosti amiodarona i tamoksifena u modelu jetrenih (HuH7) stanica

Abičić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:427706>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U
OSIJEKU**

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Ivan Abičić

**OSOBITOSTI TOKSIČNOSTI
AMIODARONA I TAMOKSIFENA U
MODELU JETRENIH (HUH7) STANICA**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Ivan Abičić

**OSOBITOSTI TOKSIČNOSTI
AMIODARONA I TAMOKSIFENA U
MODELU JETRENIH (HUH7) STANICA**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za farmakologiju

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Martina Smolić, dr.med.

Rad ima 27 radnih listova, 2 tablice i 5 slika.

ZAHVALE:

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Martini Smolić, dr. med. na prihvaćanju mentorstva, vođenju i usmjeravanju tijekom pisanja diplomskog rada te izuzetnim rješenjima za svaki problem na koji sam naišao.

Zahvaljujem asistentici Tei Omanović Kolarić koja mi je svojim znanjem, strpljenjem i sustavnim radom uvelike pomogla u pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem obitelji, prijateljima i djevojci koji su kroz sve godine moga obrazovanja bili izuzetno strpljivi.

Zahvaljujem svima koji su mi svojim znanjem i vještinama pokazali pravi put tijekom studiranja na Medicinskom fakultetu.

SADRŽAJ

| | |
|----------------------------|-----------|
| POPIS KRATICA | II |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Epidemiologija | 1 |
| 1.2. Etiopatogeneza | 1 |
| 1.3. Klasifikacija | 2 |
| 1.4. Klinička slika | 3 |
| 1.5. Dijagnoza | 4 |
| 1.6. Patohistološki nalaz | 5 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 7 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 8 |
| 3.1. Ustroj studije | 8 |
| 3.2. Materijali | 8 |
| 3.3. Metode | 8 |
| 4. REZULTATI | 11 |
| 5. RASPRAVA | 15 |
| 6. ZAKLJUČAK | 18 |
| 7. SAŽETAK | 19 |
| 8. SUMMARY | 20 |
| 9. LITERATURA | 21 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 26 |

POPIS KRATICA

AMD – amiodaron

DILI – oštećenje jetre uzrokovano lijekovima (engl. *Drug induced liver injury*)

DILIN – Mreža oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima (engl. *Drug Induced Liver Injury Network*)

DIFLD – lijekovima inducirana masna bolest jetre (engl. *Drug Induced Fatty Liver Disease*)

DMEM – Dulbeccov modificirani Eagle medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

TAM – tamoksifen

1. UVOD

Oštećenje jetre uzrokovano lijekovima (engl. *Drug induced liver injury*, DILI) stanje je povezano s korištenjem raznih lijekova, biljnih preparata i dodataka prehrani, a može rezultirati nastankom ozbiljnih posljedica kao što je akutno zatajenje jetre. Procjenjuje se da je više od 1000 lijekova povezano s nastankom idiosinkratske hepatotoksičnosti, među kojima su najčešći lijekovi koji uzrokuju DILI antibiotici i lijekovi usmjereni na središnji živčani sustav (1, 2). DILI se pojavljuje već nakon nekoliko tjedana ili mjeseci korištenja lijeka, a posljedica je metabolizma lijeka kojim se u organizmu stvaraju reaktivni metaboliti i slobodni radikali (3). DILI je najučestaliji uzrok prekida kliničkih ispitivanja i povlačenja lijekova s tržišta, ali i potrebe transplantacije jetre u zapadnim zemljama (4).

1.1. Epidemiologija

Točnu incidenciju oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima teško je utvrditi s obzirom na nedostatak jednostavnih objektivnih testova za dijagnozu DILI-ja, poteškoća oko konsenzusa o abnormalnostima jetrenih testova koji bi pokazali nastanak DILI-ja te nedostatku sistematičnosti prijavljivanja novih slučajeva DILI-ja. Nove epidemiološke studije navode kako se svake godine pojavljuje oko 20 novih slučajeva DILI-ja na 100 000 osoba. Idiosinkratski oblik DILI-ja uzrok je 11 % slučajeva akutnog zatajenja jetre u Sjedinjenim Američkim Državama (5). S druge strane, nedavna islandska studija Bjornssona i suradnika pokazala je godišnju incidenciju od 19 slučajeva na 100 000 stanovnika Islanda, a pokazalo se da je uzrok nastanka DILI-ja u 75 % slučajeva bio izdavanje jednog lijeka na recept (6).

Rizik za nastanak oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima vrlo je složen i uključuje nekoliko čimbenika koji su u međusobnoj korelaciji. Kao rizični čimbenici navode se ženski spol, starija dob, pretilost, zaraženost HIV-om te kronična bolest jetre. Nažalost, postoji malen broj empirijskih podataka koji bi podržali valjanost i povezanost navedenih rizičnih čimbenika s DILI-jem (5).

1.2. Etiopatogeneza

Oštećenje jetre uzrokovano lijekovima rezultat je složenih interakcija genetskih, negenetskih, metaboličkih, imunoloških i okolišnih čimbenika (7, 8). Iako složeni mehanizam koji dovodi do nastanka DILI-ja nije u potpunosti razjašnjen, poznati su

brojni lijekovi, poput tamoksifena, amiodarona, metotreksata i glukokortikoida, koji potiču nastanak DILI-ja. Mehanizam nastanka oštećenja jetre podrazumijeva složen utjecaj lijekova na važne molekularne puteve, uključujući povećanu lipogenezu u hepatocitima, smanjenu sekreciju masnih kiselina i prekid mitohondrijske β -oksidacije, ali i izmjenu ekspresije gena odgovornih za metabolizam lijekova (9).

Ključni događaj u patogenezi oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima jest smrt hepatocita, iako bi kolangiociti i endotelne stanice također mogli biti potencijalna mjesta djelovanja lijekova (10, 11). Postoje tri glavna tipa oštećenja jetre: hepatocelularno oštećenje koje se prezentira kao akutni hepatitis, kolestatsko oštećenje koje se prezentira kao kolestaza i miješano oštećenje (12). Važno je napomenuti kako se ponekad dominantan tip oštećenja jetre može promijeniti tijekom bolesti (13).

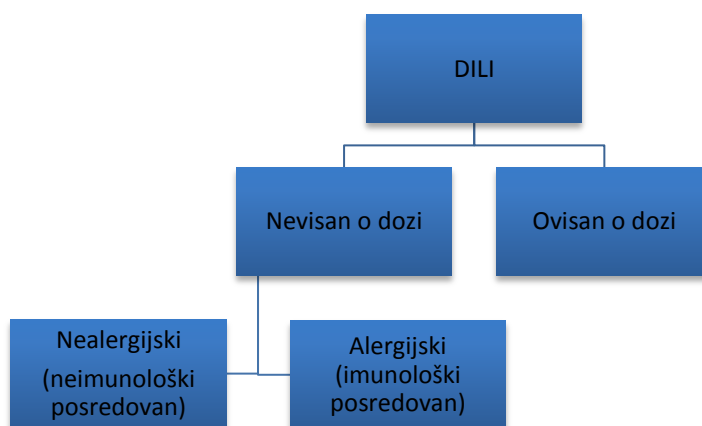
DILI je karakteriziran širokim spektrom oštećenja kao što su steatoza i fosfolipidoza. Jetrena steatoza posljedica je nakupljanja triglicerida u hepatocitima i predstavlja reverzibilno stanje metabolička disfunkcije koje potencijalno može napredovati do inflamatornog steatohepatitisa, ireverzibilnog oštećenje jetre, fibroze, ciroze te hepatocelularnog karcinoma. S druge strane, za fosfolipidozu je karakteristično ekscesivno unutarstanično nakupljanje fosfolipida označenih kao lamelarna tjelešca. Važno je naglasiti kako akumulirani fosfolipidi mogu interferirati sa staničnim funkcijama te ponekad za posljedicu imati i fatalni ishod (14, 15,16).

1.3. Klasifikacija

Oštećenje jetre uzrokovano lijekovima generalno se može podijeliti na dvije kategorije. Prva je kategorija predvidljiva i ovisna o dozi (engl. *dose – dependent*), a druga je kategorija idiosinkratska i neovisna o dozi (engl. *dose – independent*). Idiosinkratski DILI (iDILI) može se nadalje podijeliti u dvije subkategorije: alergijski, imunološki posredovan, i nealergijski, neimunološki posredovan, kao što prikazuje slika 1 (17 –20). Alergijski (imunološki posredovani) DILI nastaje kao posljedica predočavanja stanica uz pomoć T pomoćničkih stanica, a karakterizira ga kratka odgoda i brza ponovna pojava ozljede jetre na ponovno izloženost lijeku. S druge strane, nealergijski (neimunološki posredovan) DILI nastaje postupnom akumulacijom reaktivnih metabolita u hepatocitima, a može dovesti do oštećenja mitohondrija.

S obzirom na to da je mehanizme nastanka svih navedenih tipova oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima vrlo teško razumjeti, razvijeni su brojni modeli u svrhu

unaprjeđenja sadašnjih spoznaja o nastanku DILI (21). Jedan od primjera modela su jetrene stanične linije derivirane iz, hepatocelularnog karcinoma (HepG2, Hep3B, Huh7) koje odlikuje jednostavnost upotrebe, pristupačnost, stabilan fenotip i neograničeni propagacijski potencijal (22). Imortalizirane stanične linije i primarne izolirane jetrene stanice trenutno su najkorišteniji *in vitro* modeli za testiranje jetrene toksičnosti (23).



Slika 1. Podjela tipova DILI-ja prema ovisnosti o dozi i imunosnom odgovoru.

1.4. Klinička slika

DILI se najčešće razvija unutar 90 dana od početka terapije određenim lijekom, a pacijent pokazuje poboljšanje unutar 30 dana od prestanka korištenja lijeka (9). Simptomatologija oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima može varirati u rasponu od asimptomatskog povišenja jetrenih enzima do teškog hepatitisa sa žuticom. Mali broj pacijenata razvije kroničnu jetrenu bolest. Više od 90 % pacijenata oporavi se nakon prestanka uzimanja lijeka koji je doveo do DILI, a 10 % pacijenata s teškim oblikom DILI sa žuticom umire ili im je potrebna transplantacija jetre (24).

Početni simptomi DILI-ja najčešće su nespecifični (npr. umor, mučnina, abdominalna bol). U američkom registru DILIN (eng. *Drug Induced Liver Injury Network*), koji broji više od 1200 DILI slučajeva, mučnina je bila prisutna u 60 % pacijenata, a

abdominalna bol u 42 % pacijenata. Za jetru specifični simptomi, poput pruritusa, ikterusa, encefalopatije i ascitesa, najčešće su prisutni u pacijenata s težim oblikom DILI-ja (25).

1.5. Dijagnoza

Dijagnoza oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima vrlo je komplicirana zbog činjenice da se radi o klinički isključnoj dijagnozi. Pouzdana dijagnoza zahtijeva prikaz bliske korelacije između pacijentove povijesti bolesti i kliničkih, laboratorijskih i histoloških podataka. Inicijalni prikaz pacijenta tipično uključuje povišene jetrene enzime s ili bez ikterusa te s hepatocelularnim, kolestatskim ili miješanim tipom oštećenja. Diferencijalna dijagnoza vrlo je široka i obuhvaća virusne, autoimunosne, metaboličke i genetičke poremećaje. Mogućnost utvrđivanja konačne dijagnoze komplicira se s nedostatkom objektivnih dijagnostičkih testova i opširnom listom lijekova te biljnih preparata prepoznatih kao potencijalni uzrok nastanka DILI-ja. Posljedično tomu, potrebna je opširna povijest bolesti uz prikladne laboratorijske nalaze i slikovne tehnike kako bi se diferencijalno dijagnostički isključili ostali potencijalni uzroci prije nego što se može utvrditi postojanje DILI-ja. Ključni čimbenik u postavljanju dijagnoze DILI jest vremenska povezanost između izloženosti lijeku i razvoja oštećenja jetrene funkcije, ali i nestanka oštećenja posljedično prestanku korištenja lijeka. Manifestacije oštećenja jetrene funkcije uobičajeno se pojavljuju unutar nekoliko dana ili tjedana, iako se mogu pojaviti nakon nekoliko mjeseci ili godina korištenja lijeka. Važno je naglasiti kako se simptomi mogu pojaviti i nakon prestanka korištenja lijeka. Štoviše, povišenje jetrenih enzima može trajati i nekoliko mjeseci nakon prestanka upotrebe lijeka (9).

U svrhu standardiziranja procesa pronalaska uzroka nastanka DILI-ja, razvijeni su bodovni sustavi poput RUCAM skale. RUCAM skala najčešće je korištena skala i sastoji se od podataka o tipu enzimatske ozljede, poznatih rizičnih čimbenika (npr. dob, konzumacija alkohola, trudnoća), isključenju ostalih uzroka ozljede jetre (npr. hepatitis, ishemija, bolest jetre) te razdoblja koje uključuje početak bolesti, poboljšanje nakon prestanka upotrebe lijeka te ponovne upotrebe lijeka (26).

1.6. Patohistološki nalaz

Biopsija jetre ne smatra se rutinskim dijelom kliničke evaluacije u slučajevima gdje postoji sumnja na DILI. Unatoč tome, biopsija može pružiti dodatne informacije

koje mogu biti korisne prilikom evaluacije oštećenja jetre u klinički kompliciranim slučajevima, ali i u utvrđivanju stupnja oštećenja jetre. Poveznica između patohistološkog nalaza i povijesti korištenja suspektnog lijeka može učvrstiti dijagnozu DILI-ja te može pomoći pri isključivanju ostalih potencijalnih uzroka nastanka oštećenja jetre.

Pet najučestalijih histoloških obrazaca nađenih u 83 % DILI slučajeva akutni su i kronični hepatitis, akutna i kronična kolestaza i miješani kolestatski hepatitis (27). Steatohepatitis jest relativno rijedak oblik DILI-ja; podatci iz španjolske grupe iz studije o oštećenju jetre uzrokovanom lijekovima pokazali su da se u samo 2 slučaja, od ukupnih 110 s histološkim nalazom jetre, pokazao predominantan nalaz definiran kao jetrena steatoza (28). Ipak, noviji podatci iz DILIN-a (engl. *Drug Induced Liver Injury Network*) pokazali su da je u 26 % slučajeva bio prisutan neki stupanj steatoze, s makrovezikularnom steatozom kao dominantnim obrascem u 70 % slučajeva (26). S druge strane, lijekovima inducirana masna bolest jetre (engl. *Drug induced fatty liver disease*, DIFLD) oblik je DILI-ja koji podrazumijeva nastanak steatohepatitisa posljedično izravnom toksičnom djelovanju lijeka na jetru. Nastanak DIFLD izravno je povezan s trajanjem unosa lijeka i dozom lijeka. Otprilike 2 % masne bolesti jetre nastaje kao posljedica korištenja lijekova, što potvrđuje koliko je masna jetra rijetka manifestacija toksičnosti lijekova (29).

Makrovezikularna steatoza podrazumijeva prisutnost malih ili velikih lipidnih kapljica u citoplazmi hepatocita, uz periferni pomak stanične jezgre (30, 31, 32). Ovakvo oštećenje jetre često je reverzibilno, ali može napredovati do steatohepatitisa i ciroze jetre tijekom vremena. Jedan od mnogih lijekova koji uzrokuju makrovezikularnu steatozu je i tamoksifen, selektivni modulator estrogenskih receptora (SERM) koji se koristi u terapiji najčešćeg raka u ženskoj populaciji u svijetu, raka dojke, naročito u molekularnim podtipovima koji ekspimiraju estrogenske receptore (33, 34). Hepatotoksičnost inducirana tamoksifenom najčešće se očituje kao povišenje jetrenih enzima i može se naći u 43 % pacijenata. Ipak, normalizacija razina jetrenih enzima potpuna je unutar 6 mjeseci od prestanka korištenja lijeka (35, 36). Osim tamoksifena, važno je napomenuti kako amiodaron, antiaritmik iz skupine III koji se koristi u liječenju ventrikulskih i atrijskih aritmija, također može uzrokovati makrovezikularnu steatozu (37). Hepatotoksičnost uzrokovana amiodaronom može nastati kao posljedica brze intravenske infuzije lijeka ili kao posljedica kronične oralne terapije lijekom (38).

Mikrovezikularna steatoza prezentira se kao nakupljanje brojnih, vrlo malih lipidnih kapljica u citoplazmi hepatocita, ali bez perifernog pomaka stanične jezgre (30). Ona podrazumijeva puno ozbiljniji oblik ozljede jetre najčešće povezan s mitohondrijskom disfunkcijom. Ako je ovaj oblik steatoze opsežan ili traje dugo, može biti životno ugrožavajuć. Lijekovi koji se povezuju s mikrovezikularnom steatozom valproična su kiselina, tetraciklini, aspirin, glukokortikoidi i mnogi drugi (39).

Steatohepatitis karakterizira prisutnost steatoze, nekrotične upale i hepatocelularnog baloniranja, s ili bez prisutnosti Malloryjevih hijalinih tjelešaca te, u nekim slučajevima, perisinusoidalnom fibrozom. Lijekovi povezani s nastankom steatohepatitisa su amiodaron, metotreksat i tamoksifen (31).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su :

1. Odrediti postotak staničnog preživljenja Huh7 stanica pri različitim koncentracijama i različitom vremenskom periodu izloženosti amiodaronu i tamoksifenu.
2. Odrediti učinak različitih koncentracija amiodarona i tamoksifena na nastanak i distribuciju lipidnih kapljica kao biljega vezikularne steatoze u Huh7 stanicama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani pokus. Randomizacija podrazumijeva *block* dizajn koji je uobičajen za *in vitro* studije s eksperimentom koji se replicira kroz vrijeme. *Block* označava "mini pokus" sa svim postupcima korištenim tijekom izvođenja pokusa (40).

3.2. Materijali

Kemikalije: Amiodaron hidroklorid 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

Tamoksifen citrat 98 % (Acros Organics, Waltham, Massachusetts, SAD). Tripansko plavilo, Trypan Blue (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Oil red O boja (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). 4',6-diamidino-2-fenilindol, DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). MTT 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

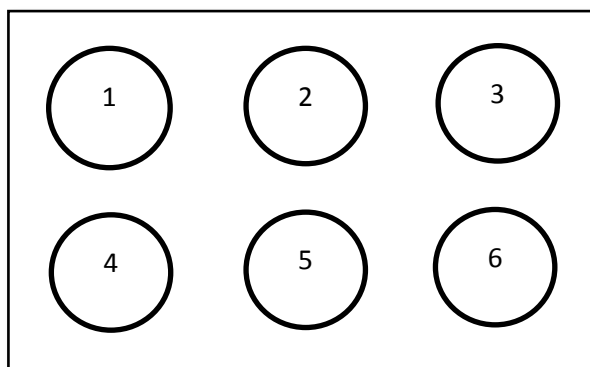
Dulbeccov modificirani Eagle medij (DMEM) + 10 % FBS (engl. *fetal bovine serum*, FBS) + 1 %-tne otopina antibiotika/antimikotika (Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA).

Stanične kulture: Model jetrenih (Huh7) stanica, dobro diferenciranih stanica humanog hepatocelularnog karcinoma originalno uzetih iz karcinoma 57-godišnjeg muškarca iz Japana, 1982. godine. Staničnu liniju su uspostavili Nakabayshi H. i Sato J. Stanična linija velikodušan je dar prof. dr. sc. Georgea Y. Wu, sa Sveučilišta u Connecticutu, SAD kupljena od American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, SAD. Model je korišten u izvođenju svih pokusa s lijekovima amiodaronom i tamoksifenom.

3.3. Metode

Stanice su uzgajane u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (DMEM) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) te 1%-tne otopine antibiotika/antimikotika (Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA), na temperaturi od 37 °C u vlažnom atmosferskom zraku s 5 % CO₂ (v/v). Nakon što su stanice uzgojene u jednosloju u pločama sa šest jažica, izložene su koncentracijama amiodarona i tamoksifena od 5 i 10 μM, kao na slici 1. Pokus u pločama sa šest jažica rađen je u tripletima. Rast stanica svakodnevno se pratio svjetlosnom mikroskopijom te su sve dobivene promjene zabilježene fotoaparatom

Olympus DP70, uvećanje 1:1000, nakon dodavanja Oil Red O boje u stanice u koje su prethodno dodane koncentracije amiodarona i tamoksifena od 5 i 10 μM . U svrhu vizualizacije i kvantifikacije posljedica djelovanja navedenih koncentracija amiodarona i tamoksifena na jetrene Huh7 stanice, korišteni su test Trypan Blue bojanja, Oil Red O bojanja, DAPI bojanje i MTT analiza.



Slika 2. Ploča sa šest jažica u kojima su jetrene (Huh7) stanice tretirane lijekovima

- 1 – medij – kontrola 1
- 2 – medij + metanol
- 3 – medij + amiodaron 5 μM
- 4 – medij + amiodaron 10 μM
- 5 – medij + tamoksifen 5 μM
- 6 – medij + tamoksifen 10 μM

3.3.1. Određivanje stanične vijabilnosti i proliferacije

Test Trypan Blue boja

Ekskluzijski test Trypan Blue bojom koristio se za utvrđivanje vijabilnosti stanica u suspenziji. Žive stanice imaju netaknutu staničnu membranu kroz koju Trypan blue boja ne može proći, dok kod mrtvih stanica boja može prodrijeti. Stanice su brojane pomoću hemocitometra. Prozirna citoplazma prisutna je u živim stanicama, dok mrtve stanice imaju plavu citoplazmu.

DAPI bojanje

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) je plava fluorescentna boja koja prolazi kroz netaknutu staničnu membranu i specifično se veže dvostruku uzvojniju DNA s posebnim afinitetom za regije bogate adenin-timin dinukleidnim ponavljanjima. Korištena je za označavanje staničnih jezgara jer joj se fluorescencija povećava za 20 puta kada se veže na dvostruku uzvojniju DNA. Ekscitacija ove boje postiže se na 358 nm, a emisija se vidi na 461 nm.

MTT test

MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) jest kolorimetrijska metoda kojom je određeno preživljenje stanica u kulturi, mjerenjem stanične metaboličke aktivnosti i proliferacije. MTT metoda korištena je za utvrđivanje smanjenja vijabilnosti stanica posljedično metaboličkim procesima koji su doveli do nekroze ili apoptoze. Metabolički su aktivne stanice reducirale žuti tetrazolium MTT, što je rezultiralo nastankom intracelularnog ljubičastog formazana koji se otopio i čija je apsorbancija evaluirana mjerenjem valne duljine spektrofotometrom na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 595 nm. Analiza je učinjena u mračnoj prostoriji s obzirom na to da je MTT reagens osjetljiv na svjetlo.

3.3.2. Određivanje lipida i triglicerida

Oil Red O bojanje

Oil Red O boja jest liposolubilna diazo boja koja je u modelu jetrenih stanica iskorištena za vizualizaciju lipida i neutralnih triglicerida, nastalih posljedično steatozi induciranoj lijekovima. Ima izgled crvenog praha s maksimalnom apsorpcijom na 518 nm. Za gledanje stanica korišten je fazno-kontrastni mikroskop na kojem su lipidi prikazani u crvenoj boji.

3.3.3. Statistička analiza

Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike između dvije nezavisne skupine normalno raspodijeljenih numeričkih podataka testirane su Studentovim T-testom. Statistička analiza obavljena je programom Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), uz odabranu razinu značajnosti od $\alpha = 0.05$.

4. REZULTATI

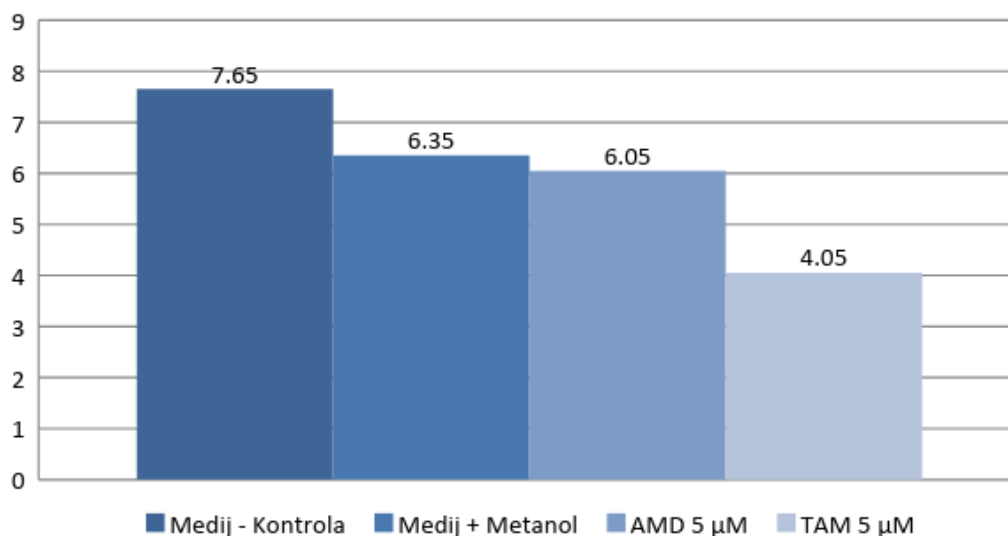
U svrhu istraživanja mogućeg oštećenja jetre nastalog djelovanjem amiodarona i tamoksifena, jednake koncentracije jetrenih (Huh7) stanica raspoređene su u 6 jažica u koje su dodani DMEM, 10 % FBS i 1%-tne otopina antibiotika/antimikotika, s ciljem postizanja konfluentnosti stanica između 70 i 80 %. Rezultati ovog istraživanja su reprezentativni rezultati tri neovisna pokusa.

Nakon što su stanice rasle preko noći, tretirane su koncentracijama od 5 i 10 μM amiodarona i tamoksifena. 48 sati nakon tretiranja jetrenih stanica navedenim koncentracijama lijekova, ekskluzivnim testom Trypan Blue bojom utvrđena je vijabilnost jetrenih stanica u svih 6 jažica. Vijabilne stanice brojane su pod svjetlosnim mikroskopom pomoću hemocitometra, a rezultati djelovanja navedenih koncentracija amiodarona i tamoksifena prikazani su u tablici 1, kao i na slikama 3 i 4.

Tablica 1. Prikaz smanjenja koncentracije vijabilnih stanica nakon tretiranja jetrenih stanica različitim koncentracijama amiodarona i tamoksifena.

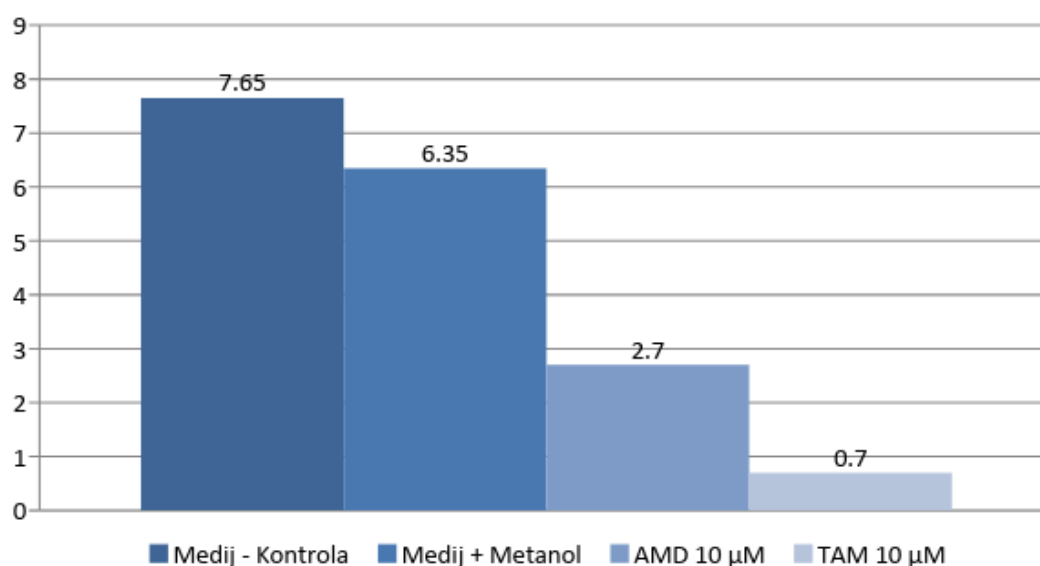
| Broj jažice | Sadržaj jažice | Koncentracija stanica po mL medija nakon tretiranja lijekovima |
|-------------|--------------------------------------|--|
| 1. | Medij - kontrola | $7,65 \times 10^5$ |
| 2. | Medij + metanol | $6,35 \times 10^5$ |
| 3. | Medij + 5 μM amiodarona | $6,05 \times 10^5$ |
| 4. | Medij + 10 μM amiodarona | $2,70 \times 10^5$ |
| 5. | Medij + 5 μM tamoksifena | $4,05 \times 10^5$ |
| 6. | Medij + 10 μM tamoksifena | $0,70 \times 10^5$ |

Koncentracije stanica po mL medija nakon tretiranja lijekovima u dozi od 5 μM



Slika 3. Usporedba koncentracija stanica ($\times 10^5$) tretiranih s 5 μM amiodarona i tamoksifena s kontrolnom skupinom i skupinom stanica u koje je dodan metanol.

Koncentracija stanica po mL medija nakon tretiranja lijekovima u dozi od 10 μM



Slika 4. Usporedba koncentracija stanica ($\times 10^5$) tretiranih s 10 μM amiodarona i tamoksifena s kontrolnom skupinom i skupinom stanica u koje je dodan metanol.

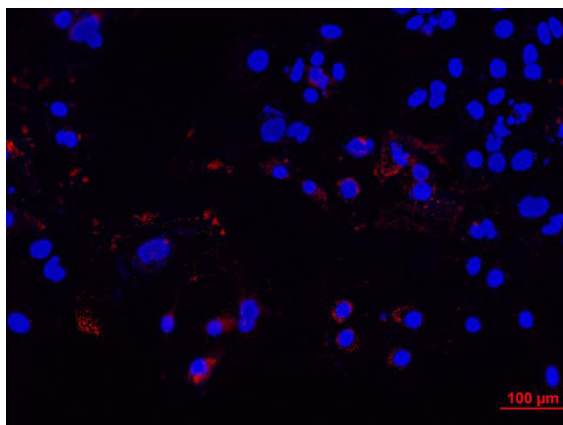
Kako bismo kvantificirali smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolnu jažicu s čistim medijem, korištena je MTT analiza. Rezultati MTT analize prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz rezultata MTT analize

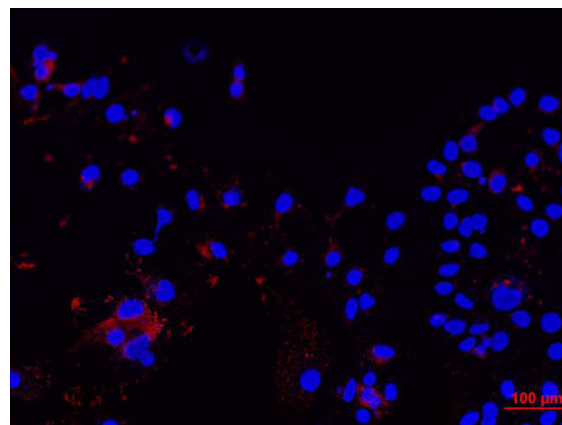
| Jažica | Medij – Kontrola | Medij + Metanol | 5 μ M AMD | 10 μ M AMD | 5 μ M TAM | 10 μ M TAM |
|---|------------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| % vijabilnih stanica u odnosu na kontrolu | 100 % | 100 % | 80,460 % | 71,682 % | 75,030 % | 48,484 % |

Promjene na jetrenim stanicama također su evaluirane nakon Oil Red O bojanja i DAPI bojanja pod fazno-kontrastnim mikroskopom. Uočeno je veliko povećanje broja i veličine lipidnih kapljica u citosolu jetrenih stanica tretiranih amiodaronom i tamoksifenom (Slika 5c – Slika 5f) u usporedbi s kontrolnom skupinom jetrenih stanica (Slika 5a), s perifernim nakupljanjem crveno obojenih lipidnih kapljica s unutrašnje strane stanične membrane, bez pomaka jezgre koja je obojena plavom bojom.

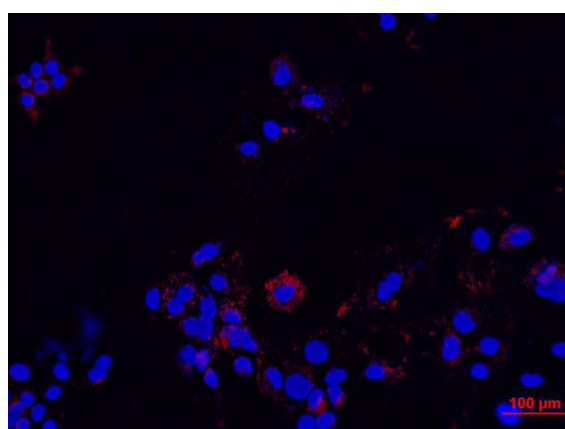
Važno je uočiti kako slike 5c – 5f također prikazuju o dozi ovisno smanjenje broja jetrenih stanica nakon tretmana amiodaronom i tamoksifenom. Naime, vidljivo je smanjenje broja jetrenih stanica koje su prethodno tretirane s 5 μ M amiodarona (Slika 5c) u usporedbi s kontrolnom skupinom jetrenih stanica (Slika 5a), dok je smanjenje broja jetrenih stanica tretiranih s 10 μ M amiodarona (Slika 5d) još veće u usporedbi s kontrolnom skupinom jetrenih stanica. Jasno je uočljivo kako se broj jetrenih stanica tretiranih s 5 μ M tamoksifena (Slika 5e) također smanjio u usporedbi s kontrolnom skupinom jetrenih stanica. Najznačajnije smanjenje broja jetrenih stanica nastalo je nakon tretiranja stanica s 10 μ M tamoksifena (Slika 5f), gdje nisu vidljive plavo obojene jezgre kao na slikama 5a – 5e.



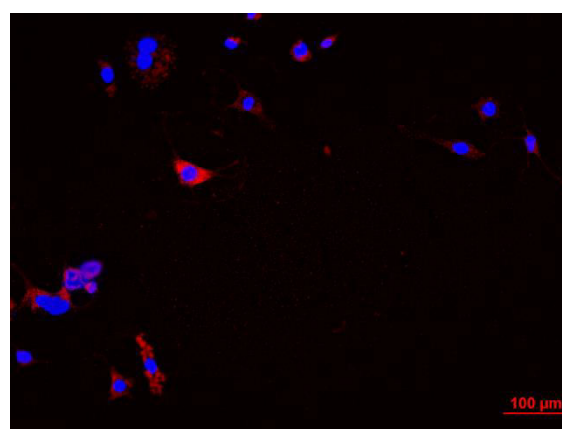
Slika 5a



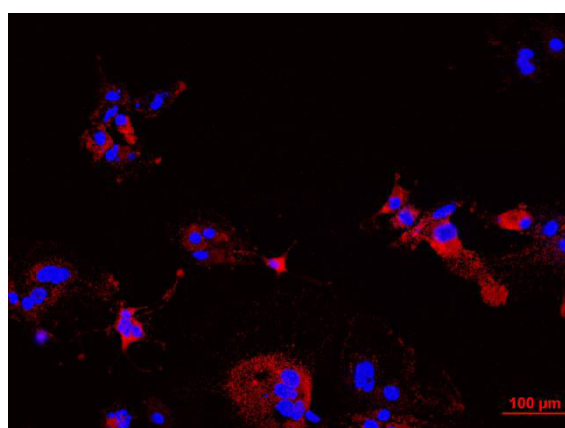
Slika 5b



Slika 5c



Slika 5d



Slika 5e



Slika 5f

Slika 5. Mikroskopski prikaz Oil Red O bojanja i DAPI bojanja Huh7 jetrenih stanica tretiranih s DMEM (Slika 5a), metanolom (Slika 5b), 5 μ M amiodarona (Slika 5c), 10 μ M amiodarona (Slika 5d), 5 μ M tamoksifena (Slika 5e) i 10 μ M tamoksifena (Slika 5f)

5. RASPRAVA

Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi mogući nastanak oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima (DILI) nakon tretiranja jetrenih (Huh7) stanica amiodaronom i tamoksifenom u koncentracijama od 5 μM i 10 μM te istražiti promjene u veličini i broju lipidnih kapljica koje mogu nastati posljedično djelovanju amiodarona i tamoksifena.

Oštećenje jetre uzrokovano lijekovima (DILI) vodeći je uzrok akutnog zatajenja jetre i transplantacije jetre u zapadnim zemljama, a povezano je s korištenjem više od 1000 različitih lijekova, biljnih preparata i dodataka prehrani. DILI predstavlja ozbiljan klinički problem s obzirom na nepredvidljivost i mogući fatalan ishod posljedično korištenju određenih skupina lijekova, među kojima su tamoksifen i amiodaron. DILI je također najučestaliji uzrok prekida kliničkih ispitivanja i povlačenja lijekova s tržišta, ali i bitna barijera u razvoju novih lijekova (1, 4, 41).

Zhao, Xie i suradnici 2014. godine proveli su *in vitro* istraživanje u kojem su tretirali jetrene (HepG 2) stanice s različitim koncentracijama (0, 5, 10 i 20 μM) tamoksifena 72 sata, u svrhu utvrđivanja učinaka i mehanizama nastanka tamoksifenom uzrokovane steatoze. Rezultati istraživanja pokazali su značajno nakupljanje lipidnih kapljica ovisno o dozi tamoksifena kojom su jetrene (HepG 2) stanice tretirane, jetrenu steatozu i povišene jetrene trigliceride (42).

Antherieu i suradnici u svom su istraživanju iz 2011. godine tretirali jetrene (HeparG) stanice s 20 μM amiodarona tijekom 24 sata ili 14 dana u svrhu dokazivanja prisutnosti intracitoplazmatskih lipidnih kapljica. Rezultati istraživanja pokazali su kako je amiodaron uzrokovao nakupljanje lipidnih kapljica obojenih Oil Red O bojom, ali isključivo nakon tretiranja stanica u razdoblju od 14 dana. Važno je naglasiti kako su tijekom 24-satnog ili 14-dnevnog tretmana jetrenih (HeparG) stanica amiodaronom uočene brojne malene, nebojene kapljice, što upućuje na nakupljanje fosfolipida (3).

Vitins, Kienhuis i suradnici 2014. godine proveli su *in vivo* istraživanje na miševima koji su tretirani različitim dozama amiodarona (0,2, 0,7, 2,2, 6,7, 20, 60, 180 mg/kg tjelesne težine) tijekom 1, 4 i 11 dana, u svrhu utvrđivanja nastanka amiodaronom inducirane jetrene steatoze. Rezultati istraživanja pokazali su hepatotoksičnost amiodarona ovisno o

dozi, s izrazitom hepatotoksičnošću pri najvišoj dozi. Također je zabilježen porast razina jetrenih triglicerida uz smanjenje razina serumskih triglicerida, što ukazuje na problem sa sekrecijom i povećanim zadržavanjem lipida unutar jetrenih stanica, a upravo je to jedna od karakteristika jetrene steatoze. Bojenje jetrenih stanica miševa Oil Red O bojom prikazalo je centrilobularne, hepatocelularne, mikrovezikularne lipide (43).

S druge strane, Bjornsson i suradnici 2013. godine objavili su prospektivnu studiju provedenu na 96 stanovnika Islanda kojima je od 2010. do 2011. godine dijagnosticiran DILI. Rezultati studije pokazali su godišnju incidenciju oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima od 19,1 slučaja na 100 000 stanovnika. Bjornsson i suradnici navode kako je u 75 % slučajeva DILI bio posljedica korištenja isključivo jednog lijeka, dok su u 16 % slučajeva uzrok nastanka DILI-ja bili dodaci prehrani. Ostalih 9 % slučajeva posljedica su korištenja više lijekova odjednom (6).

Chalasan i suradnici 2015. godine objavili su rezultate velike DILIN prospektivne studije s 899 pacijenata kojima je dijagnosticiran DILI. Studija je pokazala kako je među 899 pacijenata njih 56 (6 %) umrlo unutar 6 mjeseci od nastupa DILI-ja, a 27 od ukupnih 56 pacijenata umrlo je zbog zatajenja jetre uzrokovanog DILI-jem. Dodatna 33 pacijenta podvrgnuta su transplantaciji jetre unutar 6 mjeseci od nastupa DILI-ja. Dodatnih 126 pacijenata (17,5 %) imalo je simptome DILI-ja i nakon 6 mjeseci od dijagnoze bolesti, što upućuje na kronični oblik DILI-ja. Gotovo je 25 % pacijenata s DILI-jem umrlo, podvrgnuto transplantaciji ili je imalo rezidualnu ozljedu jetre u vrijeme šestomjesečnog praćenja pacijenata. Chalasan i suradnici također su usporedili patohistološke obrasce oštećenja jetre među 899 pacijenata s DILI-jem. U 54 % pacijenata bio je prisutan hepatocelularni obrazac ozljede jetre, dok su kolestatski i miješani obrazac ozljede bili prisutni u jednakom postotku (23 %). Važno je naglasiti kako su kardiovaskularni lijekovi bili uzrok nastanka DILI-ja u 10 % slučajeva, a antineoplastični lijekovi u 9 % slučajeva (44).

S obzirom da je oštećenje jetre uzrokovano lijekovima tema koja je opsežno istraživana i opisivana u brojnim radovima, važno je naglasiti kako je sav trud brojnih znanstvenika vrlo teško obuhvatiti i sažeti na jednom mjestu. Međutim, ključno je definirati kako su brojna istraživanja, među koja spadaju i ona navedena u ovoj raspravi, došla do vrlo sličnih rezultata. Naime, velik broj lijekova može uzrokovati oštećenje jetre u obliku jetrene steatoze koja može progredirati do ozbiljnijih stanja poput steatohepatitisa, pa čak i

do ciroze jetre. Ako u obzir uzmemo sve veću dostupnost i korištenje različitih biljnih preparata, dodataka prehrani i lijekova, shvatljivo je koliko su esencijalna *in vitro* istraživanja potencijalnih štetnih djelovanja različitih doza preparata koje koristimo i koje bi nam mogle naškoditi. U ovoj je studiji dokazano nastajanje lipidnih kapljica kao biljega jetrene steatoze te o dozi ovisno smanjenje broja jetrenih stanica posljedično tretiranju jetrenih stanica s 5 i 10 μM amiodarona i tamoksifena.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja i dobivenih podataka može se zaključiti sljedeće :

- Amiodaron i tamoksifen imaju lipogeni učinak koji se očitovao kao nakupljanje triglicerida i steatogeneza u jetrenim (Huh7) stanicama.
- Posljedično djelovanju amiodarona i tamoksifena, pod mikroskopom su, nakon bojenja stanica Oil Red O bojom, vidljivi povećan broj i veličina lipidnih kapljica s unutrašnje strane stanične membrane jetrenih stanica.
- Tretiranje jetrenih stanica koncentracijama amiodarona i tamoksifena od 5 μM i 10 μM za posljedicu ima o dozi ovisno smanjenje broja stanica u kulturi jetrenih (Huh7) stanica.

7. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Odrediti postotak staničnog preživljenja jetrenih (Huh7) stanica pri različitim koncentracijama i različitom vremenskom periodu izloženosti amiodaronu i tamoksifenu. Odrediti učinak različitih koncentracija amiodarona i tamoksifena na nastanak i distribuciju lipidnih kapljica kao biljega vezikularne steatoze u jetrenim (Huh7) stanicama.

Nacrt studije: Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani pokus.

Materijali i metode: Jetrene (Huh7) stanice uzgajane su u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (DMEM) + 10 % FBS + 1%-tne otopine antibiotika/antimikotika, na temperaturi od 37 °C, u vlažnom atmosferskom zraku s 5 % CO₂. Nakon što su stanice uzgojene u jednosloju u pločama sa šest jažica, izložene su koncentracijama amiodarona i tamoksifena od 5 i 10 μM. Rast stanica svakodnevno je praćen svjetlosnom mikroskopijom te su dobivene promjene zabilježene fotoaparatom Olympus DP70, uvećanje 1:1000, nakon dodavanja Oil Red O boje u stanice prethodno tretirane s navedenim koncentracijama amiodarona i tamoksifena. U svrhu utvrđivanja posljedica djelovanja amiodarona i tamoksifena na jetrene stanice, korišteni su Trypan Blue bojanje, Oil Red O bojanje, DAPI bojanje i MTT analiza.

Rezultati: Tretiranje jetrenih (Huh7) stanica različitim koncentracijama amiodarona i tamoksifena dovodi do povećanja broja i veličine lipidnih kapljica u citosolu jetrenih stanica. Djelovanje amiodarona i tamoksifena u različitim koncentracijama dovelo je do dozi ovisnog smanjenja broja jetrenih stanica u staničnoj kulturi.

Zaključak: Amiodaron i tamoksifen imaju lipogeni učinak koji se očitovao kao nakupljanje triglicerida i steatogeneza u jetrenim (Huh7) stanicama. Steatogeni učinak karakteriziran je formiranjem lipidnih kapljica.

Ključne riječi: stanična kultura; lipidne kapljice; steatoza; amiodaron; tamoksifen

8. SUMMARY

Characteristics of the toxicity of amiodarone and tamoxifen in the hepatic cell line (Huh7) model

Objectives: The aim of this study is to determine the percentage of cell survival in hepatic cell line (Huh7) model, after exposing the cells to different concentrations of amiodarone and tamoxifen in different periods of time. Another aim of the study is to determine the effect of different concentrations of amiodarone and tamoxifen on lipid droplet formation and distribution, as a marker of vesicular steatosis in hepatic cell line (Huh7) model.

Study design: The study was conducted as a randomised controlled trial.

Materials and methods: Hepatic (Huh7) cells were incubated in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% Antibiotic/Antimycotic solution, in a humidified incubator supplied with 5% CO₂ at 37 °C. After the cells had been grown in a six well plate, they were treated with 5µM and 10 µM of tamoxifen and amiodarone. Cell growth was monitored daily by light microscope and all the changes were shot with camera Olympus DP70, magnification 1:1000, after Oil Red O staining of the cells that were previously treated with 5µM and 10 µM of tamoxifen and amiodarone. In order to determine all the effects of amiodarone and tamoxifen on cell cultures, we used Trypan Blue staining, Oil Red O staining, DAPI staining and MTT analysis.

Results: Treatment of hepatic (Huh7) cells with different concentrations of amiodarone and tamoxifen lead to massive increase in the number and size of lipid droplets in the cytosol of hepatic cells. The effect of different concentrations of amiodarone and tamoxifen lead to dose dependent decrease in the number of hepatic cells.

Conclusion: Amiodarone and tamoxifen have an express lipogenic effect on triglyceride accumulation and steatogenesis in hepatocyte cell cultures. The steatogenic effect was characterised by lipid droplet formation.

Keywords: cell culture; lipid droplets; steatosis; amiodarone; tamoxifen

9. LITERATURA

1. Hamilton LA, Collins-Yoder A, Collins RE. Drug-Induced Liver Injury. *AACN Adv Crit Care*. 2016, 27 (4), 430–440.
2. Vuppalanchi R, Liangpunsakul S, Chalasani N. Etiology of new-onset jaundice: how often is it caused by idiosyncratic drug-induced liver injury in the United States? *Am J Gastroenterology*. 2007, 102 (3), 558-62; quiz 693.
3. Antherieu S, Rogue A, Fromenty B, Guillouzo A, Robin MA. Induction of Vesicular Steatosis by Amiodarone and Tetracycline Is Associated with Up-regulation of Lipogenic Genes in HepaRG Cells, *Hepatology*. 2011, Vol. 53, No.6., pp. 1895.
4. Fontana RJ. Acute liver failure including acetaminophen overdose, *Med Clin North Am*. 2008, vol. 92, no. 4, pp.761–794.
5. Leise MD, Poterucha JJ, Talwalkar JA. Drug-Induced Liver Injury, *Mayo Clin Proc*. 2014, Volume 89, Issue 1, Pages 95–106.
6. Bjornsson ES, Bergmann OM, Bjornsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology*. 2013., vol. 144, no. 7, pp. 1419–1425.
7. DeLeve LD, Wang X. Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. *Pharmacology*. 2000, 60 (3), 143–54.
8. Zimmerman HJ. Drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis*. 2000, 4 (1), 73–96.
9. Rabinowich L, Shibolet O. Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease. *BioMed Res Int*. 2015.

10. DeLeve LD, Wang X, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: the role of glutathione and relevance to hepatic venoocclusive disease. *Hepatology*. 1996, 23 (3), 589–99.
11. Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF, Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest*. 2001, 108 (2), 223–32.
12. Hussaini SH, Farrington EA. Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview. *Expert Opin Drug Saf*. 2007, 6 (6), 673–84.
13. Andrade RJ, Lucena MI, Kaplowitz N, García-Muñoz B, Borraz Y, Pachkoria et al. Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology*. 2006, 44 (6), 1581–8.
14. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 43(Suppl.) : S99-S112.
15. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 ;290:G852-G858.
16. Matsuda Y, Ikegami F, Kobayashi K, Hasumura Y, Takada A. Phospholipidosis caused by diethylaminoethoxyhexestrol [in Japanese]. *Saishin Igaku*. 1971; 26:2263-2267.
17. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*. 2005, 4 (6), 489–99.
18. Holt M, Ju C. Drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*. 2010, (196), 3–27.

19. Ulrich R. Idiosyncratic toxicity: A convergence of risk factors. *Annu Rev Med.* 2007, 58, 17–34.
20. Han D, Shinohara M, Ybanez MD, Saberi B, Kaplowitz N. Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol.* 2010, (196), 267–310.
21. Yuan L, Bambha K. Bile acid receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015, 7 (28), 2811–8.
22. Kuna L, Božić I, Kizivat T, Bojanić K, Mršo M, Kralj E et al. Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives, *Curr Drug Metab.* 2018 , 1–16.
23. Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, Rusyn I. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res. (Camb.).* 2013, 23–39
24. Björnsson E, Olsson R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology.* 2005, 42 (2), 481–9.
25. Robles-Diaz M, Lucena MI, Kaplowitz N, Stephens C, Medina-Cáliz I, González-Jiménez A, et al. Use of Hy's Law and a New Composite Algorithm to Predict Acute Liver Failure in Patients With Drug-Induced Liver Injury. *Gastroenterology.* 2014, 147:109–118.
26. G. Danan and C. Benichou, Causality assessment of adverse reactions to drugs–I: a novel method based on the conclusions of international consensus meetings : application to drug induced liver injuries, *J Clin Epidemiol.* 1993., vol.46, no.11,pp.1323–1330.
27. Kleiner DE, Chalasani NP, Lee WM et al. Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations, *Hepatology.* 2014., vol. 59,no.2 ,661–670.

28. Andrade RJ, Lucena MJ, Fernandez MC et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period, *Gastroenterology*. 2005., vol.129,no.2,pp.512–521.
29. Farrell GC. Drugs and steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2002; 22: 185–94.
30. Kleiner DE. The pathology of drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis*. 2009., vol.29, no.4, pp.364–372.
31. Zhang X, Ouyang J, Thung SN. Histopathologic manifestations of drug-induced hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*. 2013., vol.17,no.4, pp.547–564.
32. Ramachandranand R. Kakar S.,Histological patterns in drug induced liver disease, *J Clin Pathol*. 2009., vol.62,no. 6,pp.481–492.
33. Miele L, Liguori A, Marrone G, Biolato M, Araneo C, Vaccaro FG, et al. Fatty liver and drugs: the two sides of the same coin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017; 21(1 Suppl): 86–94.
34. Zeng ZJ, Li JH, Zhang YJ, Zhao ST. Optimal combination of radiotherapy and endocrine drugs in breast cancer treatment. *Cancer Radiother*. 2013, 17, 208–214.
35. I. S. Elefsiniotis, K. D. Pantazis, A. Ilias et al., “Tamoxifen induced hepatotoxicity in breast cancer patients with preexisting liver steatosis : the role of glucose intolerance, *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004., vol. 16, no. 6, pp. 593–598.
36. Bruno S, Maisonneuve P, Castellana P et al. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis : prospective study of 5408 women enrolled in Italian tamoxifen chemoprevention trial. *BMJ*. 2005., vol. 330, no. 7497, pp. 932–935.
37. Vassallo P, Trohman RG. Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications, *JAMA*. 2007, vol. 298, no.11 ,pp.1312–1322.

38. Nasser M, Larsen TR, Waanbah B, Sidiqi I, McCullough PA. Hyperacute drug-induced hepatitis with intravenous amiodarone: case report and review of the literature. *Drug Healthc Patient Saf.* 2013., vol.5,no.1,pp.191–198.
39. Letteron P , Brahim-Bourouina N, Robin MA, Moreau A , Feldmann G, Pessayre D. Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid β -oxidation, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997 .,vol. 272, 1, no. 5, pp. G1141–G1150.
40. Festing M.F.W. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments in Papers Submitted to ATLA. *ATLA* 29. 2001., 427–446.
41. Regev A. How to avoid being surprised by hepatotoxicity at the final stages of drug development and approval. *Clin Liver Dis.* 2013;17:749–767.
42. Zhao F, Xie P, Jiang J, Zhang L, An W, Zhan Y. The Effect and Mechanism of Tamoxifen – Induced Hepatocyte Steatosis in Vitro, *Int J Mol Sci.* 2014., 15, 4019–4030.
43. Vitins AP, Kienhuis AS, Speksnijder EN, Roodbergen M, Luijten M, van der Ven LTM. Mechanism of amiodarone and valproic acid induced liver steatosis in mouse in vivo act as a template for other hepatotoxicity models. *Arch Toxicol.* 2014, vol. 88, no. 8, 1573–1588.
44. Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R, Lee W, Stolz A, Talwalkar J et al. Features and Outcomes of 899 Patients With Drug Induced Liver Injury: The DILIN Prospective Study. *Gastroenterology.* 2015, 148: 1340–1352

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

- Ime i prezime: Ivan Abičić
- Datum i mjesto rođenja: 9. rujna 1993., Osijek
- Adresa: Mlinska 126, 31 000 Osijek
- Kontakt: 095 155 55 51
- e-mail: ivan.abicic5@gmail.com

Obrazovanje:

- 2000. – 2008. Osnovna škola „Retfala“, Osijek
- 2008. – 2012. II. gimnazija Osijek
- 2012. – 2018. Medicinski fakultet Osijek, integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine

Aktivnosti:

- Aktivno članstvo u udrugama na Medicinskom fakultetu Osijek
 - **CroMSIC** (Croatian Medical Students' International Committee)
 - **EMSA** (European Medical Students' Association)
- Projekti na kojima sam sudjelovao:
 - **mRak kampanja** – edukacija učenika srednjih škola o važnosti i načinima prevencije nastanka najčešćih karcinoma u Republici Hrvatskoj
 - **Festival znanosti: Vitamini kroz godišnja doba** – radionica o vitaminima i namirnicama u kojima ih možemo naći
 - **World AIDS Day** – edukacija učenika srednjih škola i studenata o AIDS-u, drugim spolnim bolestima i rizičnom ponašanju
 - **Pedijatrija – obitelj za blagdane** – projekt skupljanja sredstava za božićno darivanje najmlađih na odjelu osječke pedijatrije
 - **Kretanje = Zdravlje** – edukacija studenata Ekonomskog fakulteta u Osijeku o važnosti kretanja i tjelovježbe
- Demonstrature :
 - Katedra za anatomiju i neuroznanost – kolegij Anatomija (2014., 2015.)
 - Katedra za farmakologiju (2016., 2017., 2018.)

- Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju (2014.)
- Predstavljao sam Medicinski fakultet Osijek na nekoliko sveučilišnih natjecanja u malom nogometu i plivanju, gdje sam s kolegama osvojio 3. mjesto u štafetnom plivanju 2015. godine.
- 2015. godine postao sam zamjenik predsjednice Studentskog zbora, a pred kraj mandata obavljao sam dužnost predsjednika Studentskog zbora Medicinskog fakulteta.
- 2017. godine obavio sam dvomjesečnu stručnu praksu na Odjelu za dječju kardiokirurgiju u Austriji, u sklopu Erasmus+ projekta mobilnosti.
- Tijekom fakultetskog obrazovanja sudjelovao sam na brojnim kongresima i simpozijima u sklopu kojih sam objavio nekoliko preglednih radova :
 - ISABS Conference on Forensic, Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine (2015. , 2017.)
 - Međunarodna monotematska konferencija o virusnom hepatitisu C (2015. , 2016.)
 - Prehrana i klinička dijetoterapija (2016.)
 - Kongres dječjeg zdravlja s međunarodnim sudjelovanjem (2017.)
 - 12. osječki urološki i 5. osječki nefrološki dani (2017.)
 - Simpozij o naprednom ortopedskom liječenju osteogenesis imperfecta – Bolnica Sveta Katarina (2017.)