

# Usporedba različitih metoda ispitivanja citotoksičnosti amiodarona u štakorskoj jetrenoj staničnoj liniji (HTC)

---

**Martinović, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:529650>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marina Martinović**

**USPOREDBA RAZLIČITIH METODA**  
**ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI**  
**AMIODARONA U ŠTAKORSKOJ**  
**JETRENOJ STANIČNOJ LINIJI (HTC)**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marina Martinović**

**USPOREDBA RAZLIČITIH METODA**  
**ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI**  
**AMIODARONA U ŠTAKORSKOJ**  
**JETRENOJ STANIČNOJ LINIJI (HTC)**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Katedra za farmakologiju

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

Rad ima 37 listova, 5 tablica i 9 slika.

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Amiodaron.....	1
1.2. Nuspojave amiodarona .....	1
1.3. Citotoksičnost amiodarona.....	2
1.4. Oksidativni stres.....	2
1.5. Lipogeni učinak amiodarona.....	3
2. Cilj.....	4
3. Materijali i metode .....	5
3.1. Ustroj studije .....	5
3.2. Materijali .....	5
3.3. Metode.....	6
<b>3.3.1. MTT .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3.2. GSH.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3.3. Oil Red O bojanje .....</b>	<b>10</b>
3.4. Statističke metode .....	13
4. Rezultati .....	13
5. Rasprava.....	20
6. Zaključak.....	25
7. Sažetak .....	26
8. Summary .....	27
9. Literatura.....	28
10. Životopis.....	31

## POPIS KRATICA

**AMD** – *engl. Amiodarone* – amiodaron

**ANOVA** – *engl. Analysis of variance* - analiza varijance

**CA** – *engl. California* - Kalifornija

**CAT** – *engl. Catalase* – katalaza

**CO<sub>2</sub>** – ugljikov dioksid

**DAPI** – *engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole* – 4',6-diamidino-2-fenilindol

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

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina

**DTNB** – *engl. 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)* – 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojeva kiselina)

**FBS** – *engl. Fetal bovine serum* – fetalni goveđi serum

**GCL** – *engl. Glutamate-Cysteine ligase* – glutamat cistein ligaza

**GSH** – *engl. reduced Glutathione* – reducirani oblik glutationa

**GSH-Px** – *engl. Glutathione Peroxidase* – glutation peroksidaza

**GSSH** – *engl. Glutathione Sulfide* – oksidirani oblik glutationa (glutation disulfid)

**HTC** – *engl. hepatoma tissue culture*

**IL-1 $\beta$**  – interleukin 1 $\beta$

**IL-6** – interleukin 6

**LDH** – *engl. Lactate dehydrogenase* – laktat dehidrogenaza

**LPO** – *engl. Lipid Peroxidation* – lipidna peroksidacija

**MA** – *engl. Massachusetts*

**MDA** – *engl. Malondialdehyde* – malondialdehid

**MO** – *engl. Missouri*

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid

**NADPH** – *engl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* - Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**ORO** – *engl. Oil red O*

**PBS** – *engl. Phosphate-buffered saline* – puferirana fiziološka otopina

**RNA** – ribonukleinska kiselina

**RNS** – *engl. Reactive Nitrogen Species* – Reaktivni dušikovi spojevi

**ROS** – *engl. Reactive Oxygen Species* – Reaktivni kisikovi spojevi

**SA čvor** – sinusatrijski čvor

**SAD** – Sjedinjene Američke Države

**SOD** – *engl. Superoxide Dismutase* – superoksid dismutaza

**SSA** – *engl. sulfosalicylic acid* – sulfosalicilna kiselina

**TNB** – 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina

**TNF- $\alpha$**  – *engl. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  – tumorski faktor nekroze  $\alpha$

**VA čvor** – atrioventrikularni čvor

**WHO** – *engl. World Health Organization* – Svjetska zdravstvena organizacija

## 1. Uvod

Prema službenim podacima na mrežnoj stranici Svjetske zdravstvene organizacije (WHO – World Health Organization) vodeći uzrok smrtnosti u svijetu čine bolesti kardiovaskularnog sustava s čak 32 % (1). U Hrvatskoj, kao glavni uzrok smrtnosti, kardiovaskularne bolesti čine čak 40 % ukupne smrtnosti (2). Bilo koja bolest ili abnormalnost srca, ali i različiti vanjski čimbenici mogu uzrokovati poremećaje ritma srca, aritmije. Aritmije se liječe antiaritmicima. Amiodaron je antiaritmik III. skupine te je čest izbor prilikom liječenja hitnih kardiovaskularnih stanja, a nešto rjeđe u kliničkom liječenju srčanih tahiaritmija koje su otporne na druge lijekove (3).

### 1.1. Amiodaron

Amiodaron je derivat benzofurana koji zbog atoma joda u svojoj strukturi podsjeća na molekulu tiroksina (3). Prema Vaughan/Williams klasifikaciji amiodaron pripada antiaritmicima III. skupine. Oni blokiraju  $K^+$  kanale odgovorne za repolarizaciju srca produžujući tako akcijski potencijal srca i prolongirajući efektivni refraktivni period u srčanim miocitima što ih čini manje podražljivima, a tako izravno utječu na prevenciju tahiaritmija. Osim toga, amiodaron dijeli neke karakteristike s drugim skupinama antiaritmika (Ia, Ib, IV) tako što djeluje na kalcijeve i natrijeve kanale te beta-andrenergičke receptore (beta-1). Zbog toga ovaj lijek ima dodatne elektrofiziološke manifestacije poput smanjenog podražaja SA čvora i brzine provođenja AV čvora (4).

### 1.2. Nuspojave amiodarona

Amiodaron se izrazito veže za proteine plazme te mu je vrijeme poluživota 13 do 100 dana zbog čega nuspojave koje uzrokuje mogu potrajati i do nekoliko tjedana nakon prekida liječenja. U svojoj molekuli amiodaron sadrži velik udio joda (37 %) što može dovesti do povećanja dnevnog unosa joda 50 do 100 puta (3). Zbog izrazite lipofilnosti, u tijelu se raspodjeljuje u masno tkivo, pluća, jetru, ali i srce, bubrege, štitnjaču, mišiće i mozak, što može izazvati neželjene akumulacije u tkivima (rožnica, koža), plućnu fibrozu, probleme gastrointestinalnog sustava, interakcije s drugim lijekovima, bradikardiju, atrioventrikulski blok, probleme sa štitnjačom (hipotireoza i hipertireoza) te hepatocelularno oštećenje jetre (5). Oko 1-3 % bolesnika liječenih amiodaronom



razvit će simptomatsku bolest jetre koja morfološki podsjeća na alkoholom uzrokovane jetrene lezije (6).

### 1.3. Citotoksičnost amiodarona

Budući da amiodaron prolazi membranu mitohondrija, jedan od razloga njegove citotoksičnosti je oštećenje mitohondrija u hepatocitima. Za toksičnost je odgovorna benzofuranska skupina u njegovoj strukturi koja unutar mitohondrija interferira s fiziološkim procesima staničnog disanja. Kod miševa je pokazano da amiodaron blokira beta-oksidaciju masnih kiselina unutar mitohondrija te izravno utječe na oksidativnu fosforilaciju, odnosno inhibira prijenos elektrona na respiratornom lancu (7, 8). Tako prekinut lanac prijenosa elektrona dovodi do nastanka slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih ili dušikovih spojeva (ROS – engl. *reactive oxygen species*, RNS – engl. *reactive nitrogen species*) koje nazivamo oksidansima. Oksidansi oštećuju stanične organele i time dovode stanice i čitavo tijelo u stanje oksidativnog stresa koji je često okidač za smrt stanica ili razvoj brojnih bolesti.

Amiodaron također izaziva stvaranje protuupalnih citokina i ostalih pokazatelja upalnog procesa pa u oštećenim stanicama možemo naći promijenjene vrijednosti interleukina IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), SOD (superoksid dismutaza) i MDA (malondialdehid) (9).

### 1.4. Oksidativni stres

Oksidativni stres pojava je koja nastaje kao posljedica poremećaja ravnoteže između oksidansa i antioksidansa. Oksidansima smatramo sve molekule ili atome koje u svojoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini vrlo nestabilnima. Zbog svoje niske specifičnosti za reaktante brzo i nepredvidivo se spajaju s bilo kojim molekulama proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinskih kiselina stvarajući tako nove radikale. Iako su slobodni radikali u maloj količini fiziološka pojava te se trajno proizvode u svim aerobnim organizmima i potrebni su za neke unutarstanične procese (sinteza hormona, reakcije leukocita i makrofaga, molekularna signalizacija, obrana od karcinogeneze, regulacija transkripcije itd. ), kada se poremeti homeostaza u njihovu korist, njihova prevelika koncentracija može izazvati oštećenja DNA molekule uzrokujući mutacije, oksidaciju proteina popraćenu gubitkom njihove funkcije ili lipidnu peroksidaciju (LPO) čiji produkti su reaktivni aldehidi (10).

Kao odgovor na neželjenu oksidacijsku aktivnost i pojavu oksidativnog stresa, tijelo ima više načina antioksidacijske zaštite s ciljem uklanjanja slobodnih radikala. Antioksidansi se najčešće dijele na enzimске i neenzimске. Najučinkovitiji enzimski antioksidansi obuhvaćaju superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT) i glutacion peroksidazu (GSH-Px). Među neenzimatske antioksidanse pripadaju endogeni spojevi male molekularne težine poput glutaciona (GSH), mokraćne kiseline, ubikinona (koenzim Q), lipoične kiseline i bilirubina. Neke od antioksidacijskih molekula možemo unositi i hranom poput askorbinske kiseline (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferola (vitamin E), karotenoida i flavonoida (11, 12, 13).

Kao jedan od neizravnih pokazatelja oksidativnog stresa je glutacion (GSH). Glutacion je neproteinski tiol otkriven 1935. godine, a sintetizira se iz aminokiselina L-cistein, L-glutaminske kiseline i glicina. Prisutan je u svim stanicama, a obavlja razne fiziološke uloge u tijelu. Jedna od glavnih uloga glutaciona je da, kao sulfhidrilni pufer, štiti stanice reagirajući sa slobodnim radikalima nastalima aerobnim metabolizmom, na čelu s vodikovim peroksidom, sprječavajući tako nastanak oksidativnog stresa (11, 12).

### **1.5. Lipogeni učinak amiodarona**

Iako su odavno uočena mnoga toksična djelovanja amiodarona, njegova primjena do danas ne jenjava, jer rizik od iznenadnog srčanog zastoja nadilazi opasnosti potencijalnog nastanka amiodaronom uzrokovane toksičnosti (6). Mehanizam oštećenja jetre amiodaronom djeluje na važne molekularne putove, uključujući povećanu lipogenezu u hepatocitima, smanjenu sekreciju masnih kiselina i prekid mitohondrijske beta-oksidacije, ali mogu utjecati i na ekspresiju gena odgovornih za metabolizam lijekova (13). Takva oštećenja hepatocita mogu dovesti do brojnih oštećenja jetre poput fosfolipidoze, nakupljanja Mallory-Denk tjelešca, steatoze, psuedoalkoholne bolesti jetre i ciroze (6). Jetrena mikrovezikularna steatoza nastaje prilikom akumulacije triglicerida u hepatocitima te je reverzibilno stanje metaboličke disfunkcije koje može uznapredovati do upalnog steatohepatitisa, nereverzibilnog oštećenja jetre, ciroze ili čak hepatocelularnog karcinoma. Fosfolipidoza je karakterizirana kao preveliko unutarstanično akumuliranje fosfolipida nazvanih lamelarna tjelešca. Prilikom djelovanja amiodarona na hepatocite, osim povećanja lipidnog udjela u obliku lipidnih kapljica, uočena je pojava prekomjerne ekspresije gena odgovornih za lipogenezu, što dodatno potvrđuje utjecaj amiodarona na jetrenu homeostazu (14).

## 2. Cilj

Ciljevi ovoga istraživanja su:

1. Odrediti vijabilnost HTC stanica pri različitim koncentracijama izloženosti amiodaronu (20  $\mu$ M i 40  $\mu$ M) MTT analizom.
2. Izmjeriti koncentracije staničnog reduciranog glutationa (GSH) u HTC stanicama.
3. Opisati utjecaj na staničnu morfologiju HTC stanica tretiranih različitim koncentracijama amiodarona, te prikazati nastanak i distribuciju lipidnih kapljica vizualiziranih Oil red O (ORO) bojenjem u HTC stanicama
4. Usporediti MTT, GSH i ORO metodu u dokazivanju citotoksičnosti u stanicama izloženim amiodaronu u različitim koncentracijama tijekom 24 h.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani pokus.

#### 3.2. Materijali

Tablica 1. Popis kemikalija i proizvođača istih korištenih u istraživanju

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač</b>
Amiodaron hidroklorid 98 %	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
Eritrozin B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 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
GSH, Glutathione Assay Kit	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD
Dulbeccov modificirani Eagle medij (DMEM)	Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA, SAD
10 % FBS (engl. fetal bovine serum, FBS)	Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA, SAD
1 %-tna otopina antibiotika/antimikotika	Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA, SAD

**Stanična kultura:** Model jetrenih stanica HTC – engl. *hepatoma tissue culture*, dobro diferenciranih stanica štakorskog jetrenog hepatocelularnog karcinoma originalno uzetih iz ascitesa smeđih štakora (*Rattus norvegicus*, Buffalo subspecies). Ova stanična kultura izrazito je korisna za istraživanje jetrenih, ali i svih ostalih procesa na staničnoj razini (15, 16). HTC stanična linija u istraživanjima se koristila za proučavanje steroidnih hormona, sinteze masnih kiselina, sinteze kolesterola, životnog ciklusa nekih RNA virusa, kontrole rasta i mnoštva enzimatskih procesa. U pokusu s amiodaronom, promatra se stanična vijabilnost, promjena oksidativnog statusa kroz mitohondrijsku aktivnost te morfološke promjene nastale uslijed djelovanja amiodarona (17).

### 3.3. Metode

Stanice su subkultivirane u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM), uz dodatak 10 %-tnog fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetale bovine serum*, FBS) te 1 %-tne otopine antibiotika/antimikotika (penicilin i streptomycin). Stanice su uzgajane na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) u zraku. Stanice su pasažirane svaka 3 - 4 dana kako bi se održala 80 – 90 %-tna konfluentnost te praćene svjetlosnim mikroskopom uz promjenu medija svakih 48 do 72 h.

Nakon što je uzgojen dovoljan broj stanica za provođenje pokusa iz svih je jažica uklonjen medij, isprane su PBS-om (puferiranom fiziološkom otopinom), stanice su tripsinizirane s 500 µL tripsina koji je potom deaktiviran s 500 µL medija ili su od podloge odvojene mehanički struganjem pomoću staničnog strugača (od engl. *cell-scraper*).

Rad sa stanicama odvijao se u kabinetu za sterilan rad klase II za rad sa staničnim kulturama s jednosmjernim horizontalnim protokom zraka prema van. Korištena je zaštitna odjeća i mjere dezinfekcije i sterilizacije prostora i pribora.

Koncentracija stanica u staničnoj suspenziji obojenih eritrozinom određivana je pomoću Neubauerove komorice. Za MTT test nasađivane su stanice u koncentraciji 1 x 10<sup>5</sup> st/ml u pločicu s 96 jažica. Za GSH i *Oil Red O* bojanje nasađivane su stanice u koncentraciji 3 x 10<sup>5</sup> st/ml u pločice sa 6 jažica.

Otopina 80 mM amiodarona pripremljena je otapanjem 98 % amiodaron hidroklorida u DMSO te je služila za sva serijska razrjeđenja potrebna za provođenje testova. Otopina amiodarona čuvana

je na  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Odabrane koncentracije amiodarona koje su se koristile u svim tretmanima HTC stanica bile su  $40\text{ }\mu\text{M}$  i  $20\text{ }\mu\text{M}$ .

Svi pokusi su rađeni u biološkim duplikatima, te u tehničkim duplikatima ili triplikatima.

### 3.3.1. MTT

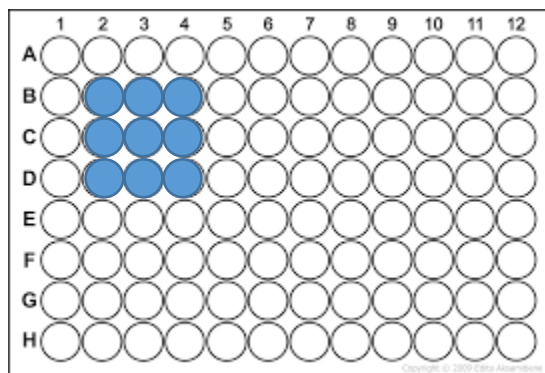
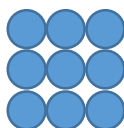
MTT metoda korištena je kao prva u nizu metoda dokazivanja citotoksičnosti amiodarona u HTC staničnoj liniji. Govoreći o preživljenju stanica, MTT metoda bila je i metoda selekcije za koncentracije amiodarona s kojima će se provoditi daljnja testiranja. Provedeno je nekoliko MTT testova koristeći različite koncentracije amiodarona (od  $1,75\text{ }\mu\text{M}$  do  $100\text{ }\mu\text{M}$  AMD) te su za pokuse odabrani reprezentativne koncentracije od  $20\text{ }\mu\text{M}$  i  $40\text{ }\mu\text{M}$ .

MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan) kolorimetrijska je metoda koja se temelji na sposobnosti stanice da pomoću mitohondrijske reduktaze prevede MTT (tetrazolijevu sol) u netopive kristale formazana purpurne (ljubičaste) boje.

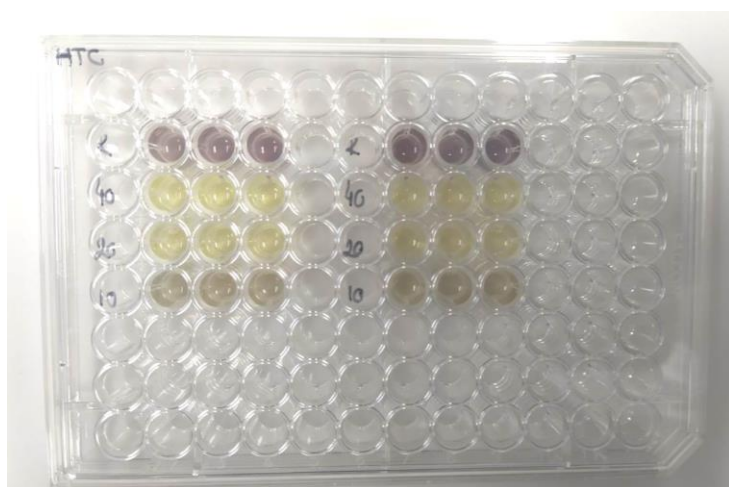
Stanice su nasadene u koncentraciji  $1 \times 10^5$  st/ml u pločicu s 96 jažica u triplikatima. Nakon 24-satne inkubacije, stanicama je uklonjen medij te su tretirane s  $40\text{ }\mu\text{M}$  AMD i  $20\text{ }\mu\text{M}$  AMD kako je prikazano na Slici 1. U kontrolne stanice dodan je samo DMSO bez FBS-a. Nakon još 24 h inkubacije, u sve jažice dodano je po  $10\text{ }\mu\text{l}$  MTT-a u mračnoj prostoriji te su inkubirane 4 sata na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$ . Nakon 4 sata dodano je  $100\text{ }\mu\text{l}$  izopropanola te nastaju ljubičasti kristalići formazana. Kristalići formazana razbijaju se pomoću pipete. Slika 2. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski pomoću čitača mikrotitarskih pločica (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, SAD) te se mjeri apsorbancija na  $595\text{ nm}$ . Rezultati su izraženi u mikrogramu po mililitru po jažici.

Test je ponovljen radi biološke raznolikosti (biološki duplikat).

Kontrola  
40  $\mu$ M AMD  
20  $\mu$ M AMD



Slika 1. Shematski prikaz nasađivanja i tretiranja stanica u pločici s 96 jažica. Shematski prikaz napravila autorica.



Slika 2. Vizualni rezultati MTT testa na HTC stanicama pri različitim koncentracijama amiodarona. Vidljiv gradijent citolize uzrokovane tretmanom amiodaronom. Fotografirala autorica.

### 3.3.2. GSH

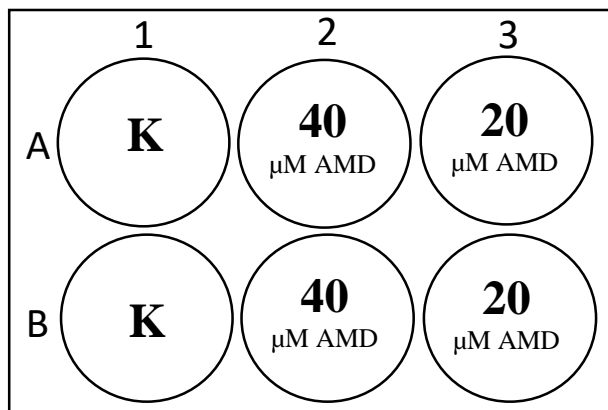
Glutation (GSH,  $\gamma$ -glutamil-cistenil-glicin) tiolni je tripeptid koji je jedan od najvažnijih i najdjelotvornijih neenzimskih antioksidansa koji djeluje kao donor elektrona. Njegovo protektivno djelovanje iskazuje se time što na sebe veže štetne spojeve (slobodne radikale) te time smanjuje njihovu biološku aktivnost i opasnost, a pri tome se oksidira. Uz pomoć glutamat cistein ligaze (GCL) i NADPH, nastaje oksidirani oblik glutaciona, glutation disulfat (GSSH), odnosno dvije molekule glutaciona povezane disulfidnim mostom. Mjerenjem ukupnog glutaciona, možemo procijeniti redoks status bioloških sustava i procijeniti jesu li stanice doživjele oksidativni stres.

Koristimo komercijalno dostupan kit (Glutathion Assay Kit CSO260-1KT) kojim spektrofotometrijskom metodom recikliranja enzima mjerimo koncentraciju GSH unutar stanica na koje smo djelovali amoidaronom te uspoređujući njegovu koncentraciju s kontrolama zaključujemo o zdravlju stanice. Ako se dogodi smanjenje koncentracije glutaciona u tretiranim stanicama, možemo zaključiti da se u stanici događa oksidativni stres čiji su produkti (slobodni radikali) smanjili koncentraciju glutaciona. Glutacion se oksidira s DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) te nastaje stabilan žuti produkt TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) čiji je intenzitet žute boje izravno proporcionalan s količinom glutaciona u uzorku, a njegovu koncentraciju izračunavamo iz apsorbancije. Mjerna velična GSH je u nanomolima (nmol).

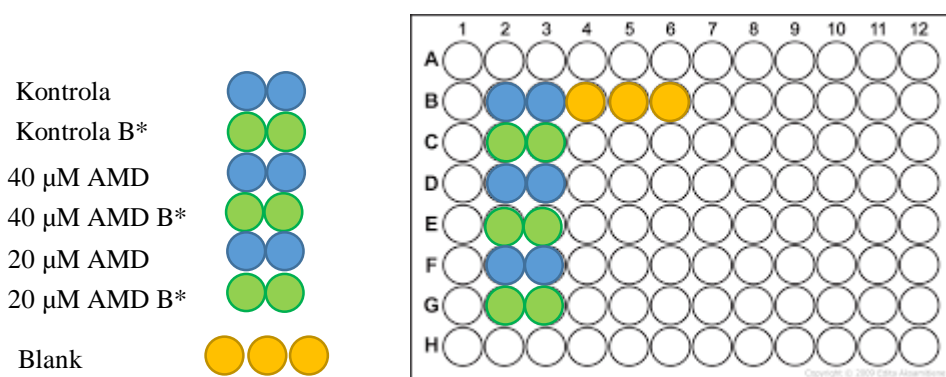
Stanice su nasadene u koncentraciji  $3 \times 10^5$  st/ml u pločice sa 6 jažica u tehničkom duplikatu. Slika 3. Nakon 24-satne inkubacije, stanicama je uklonjen medij te su tretirane s 40  $\mu$ M AMD i 20  $\mu$ M AMD. U kontrolne stanice dodan je samo DMSO bez FBS-a. Nakon još 24-satne inkubacije stanicama je uklonjen medij, isprane su PBS-om te od pločice odvojene strugačem stanica. Stanice su prema uputi proizvođača (Glutathion Assay Kit CSO260-1KT) tretirane s 5 % SSA (5-sulfosalicilna kiselina) potom dva puta zamrznute i odmrznute kako bi im se uništila stanična membrana. Nakon centrifugiranja, sačuvan je supernatant (ekstakt) koji je bio pohranjen na -50 °C. Ovaj dio ponovljen je još jednom s drugim setom stanica. Uzorci su odležani na ledu pa potom vorteksirani i centrifugirani. Test za glutacion proveden je u pločici s 96 jažica s ravnim dnom. Svaka jažica sadržavala je uzorak (5  $\mu$ l), SSA (5  $\mu$ l) i radnu otopinu (150  $\mu$ l). Slika 4. Nakon dodavanja NADPH očitana je apsorbancija na mikročitaču pločica na valnoj duljini od 415 nm (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, SAD). Intenzitet obojenja proporcionalan je količini glutaciona u stanicama. Rezultati su izraženi u mikrogramu po mililitru po jažici.

Test je ponovljen radi biološke raznolikosti (biološki duplikat). Slika 4.





Slika 3. Shematski prikaz nasadivanja i tretiranja stanica za GSH test na pločici sa 6 jažica. Sliku izradila autorica.



Slika 4. Shematski prikaz nasadivanja uzoraka za GSH test u pločicu s 96 jažica. B\* označava biološki duplikat. Sliku napravila autorica.

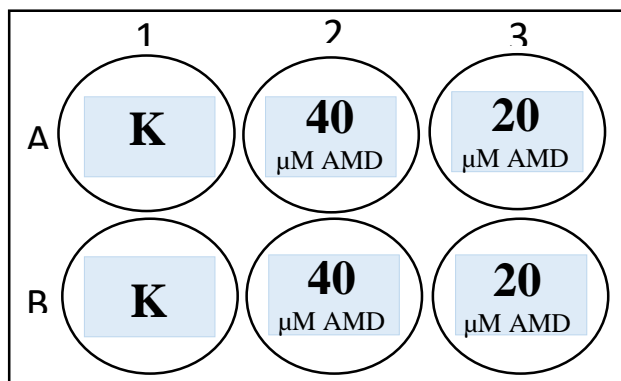
### 3.3.3. Oil Red O bojanje

Toksična svojstva amiodarona često dovode do pojave mitohondrijske disfunkcije koja se, osim prekidom respiratornog lanca, očituje i blokiranjem beta-oksidacije u hepatskim stanicama. Posljedično nedostatnoj beta-oksidaciji, u citosolu hepatocita nakupljaju se nerazgrađene masne kiseline u obliku masnih kapljica uzrokujući mikrovezikularnu steatozu jetre (masnu jetru), ali mogu dovesti i do zatajenja jetre ili smrti (9, 16). Takva patološka akumulacija lipidnih kapljica, osim kod oštećenja uzrokovanim lijekovima, karakteristična je i za metaboličke bolesti, poput dijabetesa tipa 2, nealkoholne steatoze i kod metaboličnog sindroma (19).

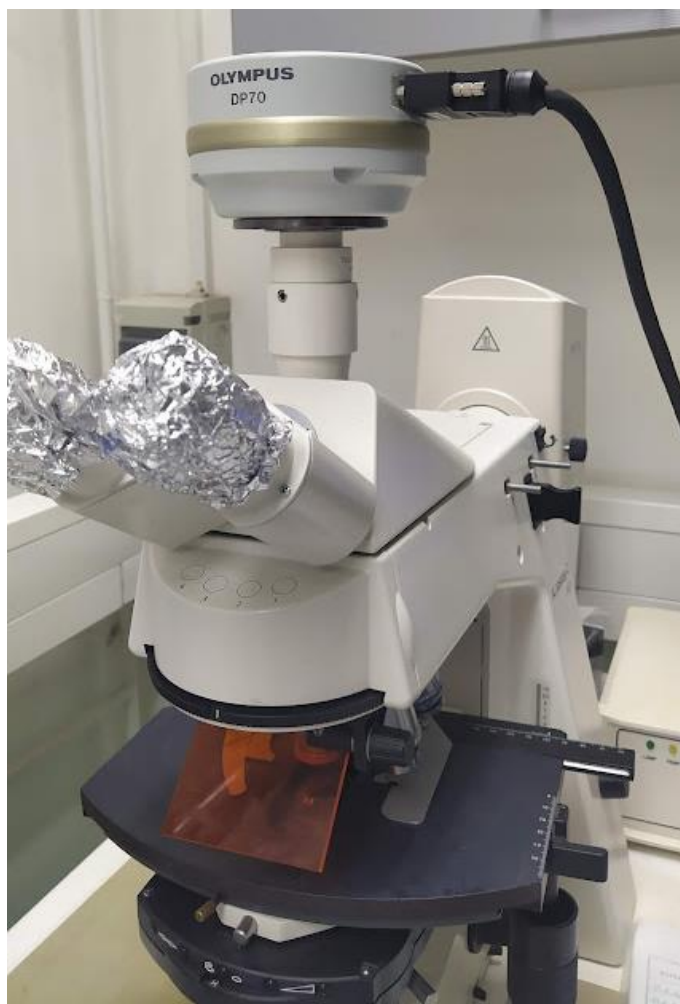
Postoji tek nekoliko tehnika kojima možemo odrediti i količinu i lokaciju na kojoj se lipidne kapljice nakupljaju. Metode poput lipidnih bojenja (BODIPY, Nile red), ekstrakcija popraćena tankoslojnom kromatografijom, masena spektrometrija ili komercijalno dostupni enzimski kit-ovi, uglavnom su skupe i zahtijevaju posebnu opremu i/ili korištenje radioaktivnih agenata. Oil red O (ORO) bojenje jednostavna je metoda bojenja prirodnih lipida koja ne boja membrane. ORO je diazol boja topiva u mastima s maksimumom apsorpcije na 518 nm. ORO je minimalno topiva u otapalu (izopropilni alkohol), stoga se u kontaktu sa stanicama pokreće prema lipidima unutar njih. Ovo je jedna od najpreciznijih metoda dokazivanja jetrene steatoze budući da boji lipidne kapljice koje nastaju zbog nedostatne beta-oksidacije masnih kiselina (19). Povećanjem koncentracije amiodarona kojime se djeluje na HTC stanice, očekivan je porast broja lipidnih kapljica kao i njihova integrirana gustoća, odnosno volumen kapljice.

Stanice su nasadene u koncentraciji  $3 \times 10^5$  st/ml u pločicu sa 6 jažica s adheriranim pokrovnim stakalcem u tehnološkom duplikatu. Slika 5. Nakon 24-satne inkubacije, stanicama je uklonjen medij te su tretirane s 40  $\mu$ M AMD i 20  $\mu$ M AMD. U kontrolne stanice dodan je samo DMSO bez FBS-a. Nakon još 24-satne inkubacije, stanicama je izvađen medij te su fiksirane u 2 %-tnom formalinu. Nakon 30 minuta fiksacije, izvađen je formalin te su stanice pohranjene u 1 x PBS-u do bojenja. Priređena je radna otopina za ORO bojanje kojom smo natopili stakalca u jažicama. Nakon 15 minuta boja je isprana 1 x PBS-om, potom su stanice obojene DAPI bojom te su uzorci čuvani u PBS-u do fotografiranja. Pokrovnostakalca pažljivo su izvađena iz jažica i smještena na predmetno stakalce s medijem za uklapanje uz pomoć pincete. Rezultati su zabilježeni mikrofotografiranjem (Olympus DP70 Digital Camera System) invertnim mikroskopom na crvenom (1/2,8; Oil red O) i plavom (1/55; DAPI) kanalu u mračnoj prostoriji (Zeiss Model AxioSkop-2 MOT). Slika 6. Fotografije su obrađene u programu Fiji (ImageJ 1.53c).

Test je ponovljen radi biološke raznolikosti (biološki duplikat).



Slika 5. Shematski prikaz nasađivanja i tretiranja stanica za ORO test na pločici sa 6 jažica i adheriranim pokrovnim stakalcima. Sliku izradila autorica.



Slika 6. Fotografija invertnog mikroskopa Zeiss Model AxioSkop-2 MOT sa spojenom kamerom Olympus DP70. Sliku fotografirala autorica.

### 3.4. Statističke metode

Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u slučaju raspodjele koje ne slijede normalnu razdiobu, medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike između dviju nezavisnih skupina normalno raspodijeljenih numeričkih podataka testirane su Studentovim T-testom, u slučaju kada varijable nisu slijedile normalnu raspodjelu koristio se neparametrijski analog (Man-Whitney U test). Analize eksperimentalnih podataka provedene su jednosmjernom ANOVOM nakon čega je proveden post hoc Student-Newman-Keuls. Statistička analiza učinjena je programom MedCalc (Version 20.027, MedCalc Software Ltd) uz odabranu razinu značajnosti od  $p = 0,05$ . Svi pokusi rađeni su kao biološki duplikati i tehnički duplikati ili triplikati.

## 4. Rezultati

Istraživanje je provedeno na HTC stanicama tretiranim amiodaronom (AMD) u dvije različite koncentracije (40  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ ), a testovi su provedeni nakon 24 h inkubacije tretiranih stanica. Kontrolna skupina je tretirana medijem za uzgoj stanica bez prisutnosti amiodarona.

### MTT test

MTT testom mjerena je metabolička aktivnost i proliferacija HTC stanica izražena vrijednostima apsorbancije. Studentovim t-testom utvrđene su značajno niže vrijednosti pri koncentracijama od 40  $\mu\text{M}$  AMD u odnosu na kontrolnu skupinu (razlika -0,05; uz 95 % interval pouzdanosti razlike od -0,07 do -0,03; Studentov t-test,  $P < 0,001$ ), kao i između kontrolne skupine i skupine s koncentracijom od 20  $\mu\text{M}$  AMD (razlika -0,48; uz 95% interval pouzdanosti razlike od -0,53 do -0,44; Studentov t-test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 2). Analizom varijance (ANOVA) utvrđena je statistički značajna razlika među srednjim vrijednostima triju skupina.

Tablica 2. Stanično preživljenje HTC stanica tretiranih različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata u odnosu na kontrolnu skupinu.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	<i>P</i> *
Kontrola	0,68 (0,04)		
40 μM AMD	0,12 (0,02)	-0,55 (od -0,58 do -0,53)	<b>&lt; 0,001</b>
Kontrola	0,68 (0,04)		
20 μM AMD	0,19 (0,06)	-0,48 (od -0,53 do -0,44)	<b>&lt; 0,001</b>

\*Studentov T-test; *P* vrijednosti \**p* < 0,001 smatrane su statistički značajnim. Prikazani podaci reprezentativni su za najmanje tri neovisna eksperimenta. AMD = Amiodaron; SD = standardna devijacija.

Usporedbom skupine gdje su HTC stanice tretirane s 40 μM AMD sa skupinom gdje su stanice tretirane s 20 μM AMD, Studentov t-test pokazao je značajnu razliku staničnog preživljenja pri koncentraciji od 20 μM AMD u odnosu na koncentraciju od 40 μM AMD (razlika 0,068, uz 95 % raspon pouzdanosti od 0,03 do 0,11; Studentov t test, *P* = 0,002) (Tablica 3).

Tablica 3. Prikaz staničnog preživljenja HTC stanica tretiranih koncentracijama 40 μM AMD i 20 μM AMD tijekom 24 sata.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	<i>P</i> *
40 μM AMD	0,12 (0,02)		
20 μM AMD	0,19 (0,06)	0,068 (od 0,03 do 0,11)	<b>0,002</b>

\*Studentov T-test; *P* vrijednosti \**p* < 0,001 smatrane su statistički značajnim. Prikazani podaci reprezentativni su za najmanje tri neovisna eksperimenta. AMD = Amiodaron; SD = standardna devijacija.

### GSH test

Mjerenjem količine GSH procijenjena je pojava oksidativnog stresa u HTC stanicama nastala nakon tretiranja stanica različitim koncentracijama AMD-a. Koncentracija glutationa izravno je proporcionalna izmjerenim vrijednostima apsorbcije pri 415 nm. Značajno su niže vrijednosti apsorbcije pri koncentracijama od 40 μM AMD u odnosu na kontrolnu skupinu (razlika -0,05; uz 95 % interval pouzdanosti razlike od -0,07 do -0,03; Studentov t-test, *P* < 0,001), dok nema značajnih razlika između kontrolne i skupine s koncentracijom od 20 μM AMD (Tablica 4).

Analizom varijance (ANOVA) utvrđena je statistički značajna razlika među srednjim vrijednostima triju skupina.

Tablica 4. Količina GSH u HTC stanicama tretiranim različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata u odnosu na netretiranu kontrolu.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	P*
Kontrola 40 $\mu$ M AMD	0,126 (0,02) 0,076 (0,02)	-0,05 (od -0,07 do -0,03)	< <b>0,001</b>
Kontrola 20 $\mu$ M AMD	0,126 (0,02) 0,102 (0,03)	-0,02(od -0,05 do 0,001)	0,07

\*Studentov T-test; P vrijednosti \*p < 0,001 smatrane su statistički značajnim. Prikazani podaci reprezentativni su za najmanje tri neovisna eksperimenta. AMD = Amiodaron; SD = standardna devijacija.

U HTC stanicama tretiranim s 40  $\mu$ M AMD i 20  $\mu$ M AMD Studentovim t- testom nije uočena statistički značajna razlika između tih dviju skupina (Tablica 5).

Tablica 5. Usporedba količine GSH u HTC stanicama tretiranim koncentracijama 40  $\mu$ M AMD i 20  $\mu$ M AMD tijekom 24 sata.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	P*
40 $\mu$ M AMD 20 $\mu$ M AMD	0,076 (0,02) 0,102 (0,03)	0,026 (od 0,00 do 0,05)	0,05

\*Studentov T-test; P vrijednosti \*p < 0,001 smatrane su statistički značajnim. Prikazani podaci reprezentativni su za najmanje tri neovisna eksperimenta. AMD = Amiodaron; SD = standardna devijacija.

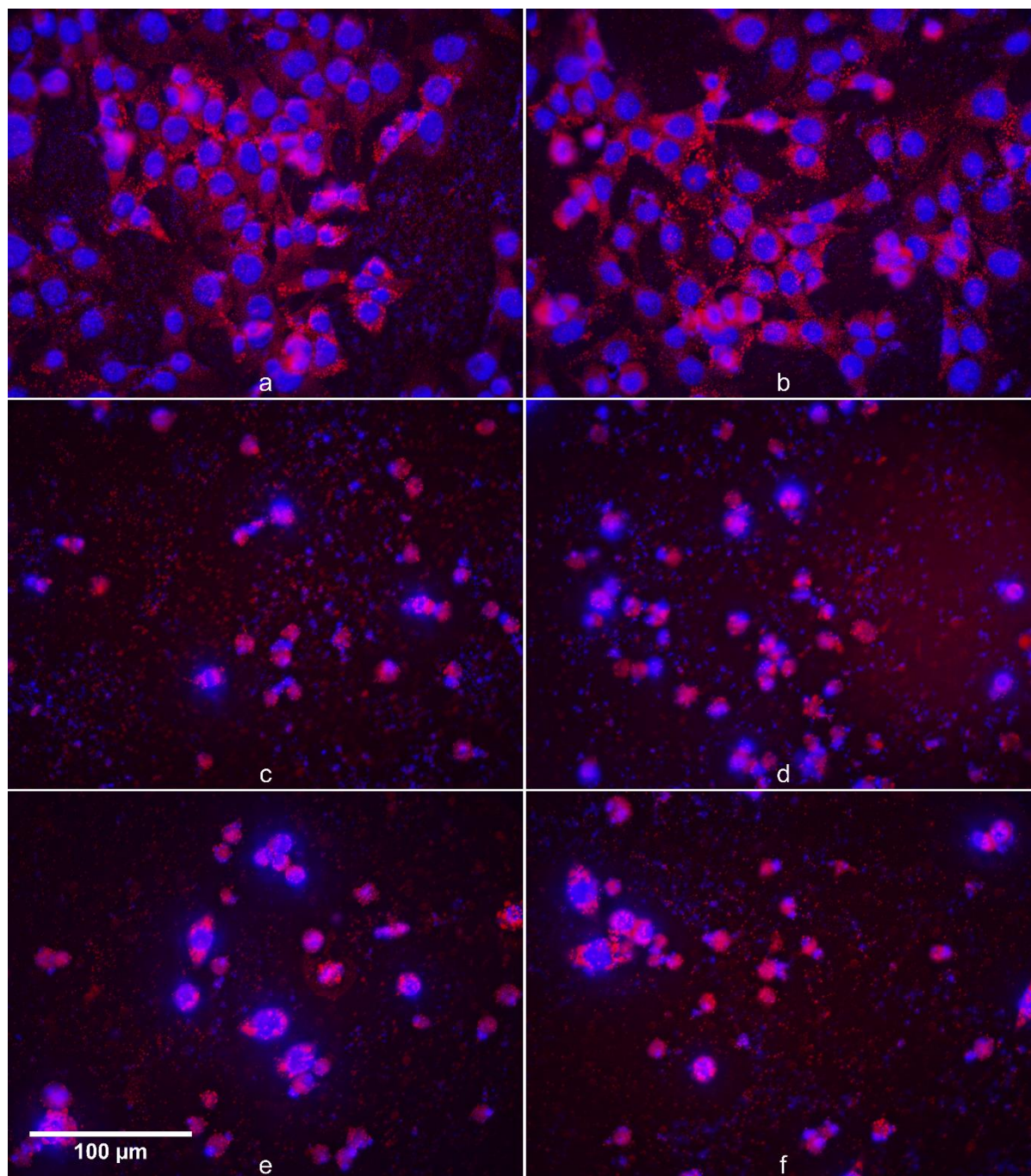
### ***Oil red O test***

Za prikaz promjene u morfologiji stanica i distribucije lipidnih kapljica u stanicama tretiranim amiodaronom, primijenjeno je *Oil Red O* bojanje.

Promjene na HTC stanicama nakon *Oil red O* bojenja evaluirane su invertnim mikroskopom. Jezgre su obojene plavom bojom, a okružuju ih crveno prikazane lipidne kapljice. Uočeno je povećanje broja lipidnih kapljica u citosolu HTC stanica tretiranih amiodaronom (Slika 6: c, d, e,

f) u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 6: a, b). Vidljiva je i razlika između broja lipidnih kapljica među skupinama; 40  $\mu\text{M}$  AMD (Slika 6: c, d) i 20  $\mu\text{M}$  AMD (Slika 6: e, f).

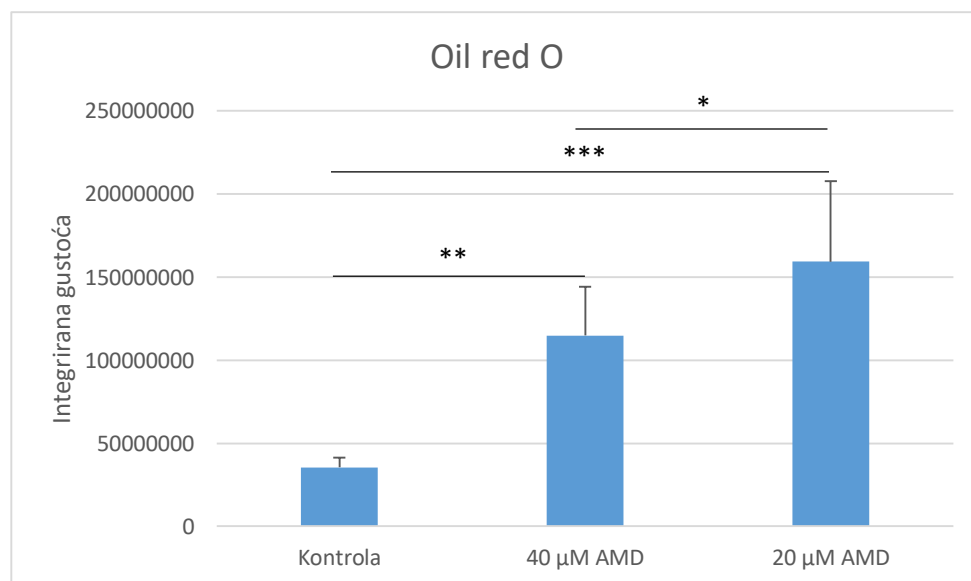
Na mikrofotografijama tretiranih stanica (Slika 6: c, d, e, f) može se uočiti i o dozi ovisno smanjenje broja stanica nakon tretmana. U usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 6: a, b), vidi se značajno smanjenje broja stanica tretiranih s 40  $\mu\text{M}$  AMD (Slika 6: c, d) i 20  $\mu\text{M}$  AMD (Slika 6: e, f). Također, vidi se razlika u broju stanica između skupina gdje stanice tretirane s 40  $\mu\text{M}$  AMD pokazuju manji broj stanica nego stanice tretirane s 20  $\mu\text{M}$  AMD.



Slika 7. Fotomikroskopski prikaz jezgara (plavo - DAPI bojenje) i masnih kapljica (crveno - Oil red O bojenje) u HTC stanicama 24 sta nakon tretmana amiodaronom. a i b – DMEM (netretirana kontrola); c i d – amiodaron (40  $\mu\text{M}$  AMD); e i f – amiodaron (20  $\mu\text{M}$  AMD). Sliku je napravila autorica korištenjem mikroskopa Zeiss Model AxioSkop-2 MOT sa spojenom kamerom Olympus DP70.

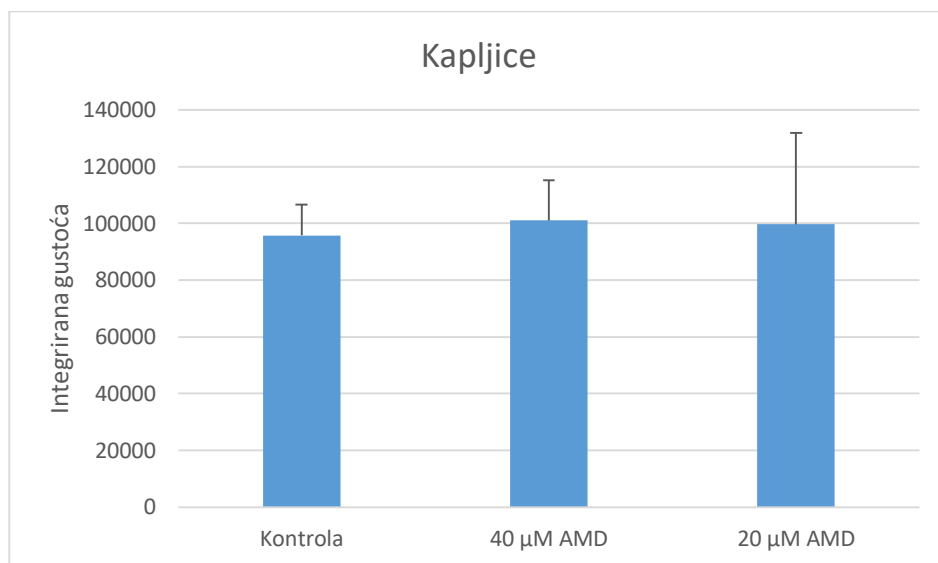


Na razini  $p < 0,05$  ( $p < 0,001$ ) značajno su više vrijednosti pri koncentraciji od 40  $\mu\text{M}$  AMD u odnosu na kontrolu, isto kao i između kontrole i skupine 20  $\mu\text{M}$  AMD. Značajno su više vrijednosti pri koncentraciji od 40  $\mu\text{M}$  u odnosu na koncentraciju od 20  $\mu\text{M}$  AMD. Značajno su najviše vrijednosti zabilježene pri koncentraciji od 20  $\mu\text{M}$  AMD (Slika 9).



Slika 8. Grafički prikaz integrirane gustoće obojenja (aritmetička sredina i standardna devijacija) HTC stanica među različitim grupama primjenom ORO testa. Semikvantifikacija učinjena pomoću ImageJ 1.53c računalnog programa. Kontrolna skupina nije tretirana AMD-om. Jednostrana ANOVA,  $p = 2,12 \times 10^{-8}$ ; post HOC Tukey HSD \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Prilikom usporedbe integrirane gustoće pojedinačnih lipidnih kapljica jednostrana ANOVA nije pokazala statistički značajne rezultate između kontrolne skupine i skupine s 40  $\mu\text{M}$  AMD, između kontrolne skupine i skupine s 20  $\mu\text{M}$  AMD niti između skupina tretiranih s 40  $\mu\text{M}$  AMD i 20  $\mu\text{M}$  AMD (Slika 9).



Slika 9. Razlika u integriranoj gustoći obojenja (aritmetička sredina i standardna devijacija) pojedinačne lipidne kapljice među različitim skupinama primjernom ORO testa. Usporedba HTC stanica tretiranih s 40 µM AMD i 20 µM AMD s kontrolnom (netretiranom) skupinom. Semikvantifikacija učinjena pomoću ImageJ 1.53c računalnog programa.

## 5. Rasprava

Citotoksičnost amiodarona poznata je već dugi niz godina (6, 18, 19), no njegova primjena još je uvijek prisutna u kliničkoj praksi. Na tržištu se pojavio lijek koji izaziva manje citotoksičnih svojstava zbog nedostatka joda u svojoj strukturi, dronedaron, no iako pokazuje znatno manje nuspojava, njegova učinkovitost nije nadjačala učinkovitost amiodarona (3, 20). Citotoksična svojstva amiodarona mogu utjecati na oksidativni status stanica, djelujući toksično na mitohondrijske funkcije zbog kojih dolazi do poremećaja oksidativne fosforilacije, beta-oksidacije, pojave upalnih markera i slično. Svi ti procesi mogu uzrokovati pojavu apoptotičkih procesa u stanicama, što u odraslom organizmu rezultira nedostatnim radom ili zatajivanjem organa ili organskih sustava.

U ovome istraživanju odabrane su tri metode kojima se dokazuje toksičan učinak amiodarona na stanice s ciljem usporedbe njihove točnosti i ponovljivosti; MTT test, GSH test i ORO test. HTC stanična linija tumorska je linija jetrenih stanica štakora koja je pogodna za ispitivanja ovoga tipa (23, 24, 25).

MTT test jedan je od najčešćih testova koji se provode u radu sa staničnim kulturama, a govori o vijabilnosti stanica. U ponovljenim testovima ovoga istraživanja, MTT test pokazao se kao osjetljiva metoda za dokazivanje vijabilnosti, te je, zbog svoje dostupnosti i jednostavnosti, služio i kao metoda odabira željenih koncentracija amiodarona s kojima će se tretirati stanice u ostalim metodama. U koncentraciji 40  $\mu\text{M}$  amiodarona MTT test pokazao je vrlo toksičan učinak amiodarona gdje je preživjelo tek nešto više od 17 % stanica u usporedbi s kontrolom, dok je kod koncentracije od 20  $\mu\text{M}$  preživljenje stanica bilo oko 28 %. Takvi rezultati govore nam o visokoj razini toksičnosti koju uzrokuje amiodaron na jetrene stanice.

Prema istraživanju koje su El Golli-Bennour i sur. proveli 2010. godine promatrani su citotoksični učinci amiodarona na trima staničnim linijama; hepatociti (HepG2), epitelne stanice (Eahy 926) i bubrežne stanice (Vero). Ispitivani su učinci amiodarona na vitalnost (MTT test), ekspresiju proteina toplinskog šoka (Hsp 70), parametre zaštitnog i adaptivnog odgovora (tretman Vitaminom E) te oksidativno oštećenje (razina malonaldehida). Stanice su tretirane različitim koncentracijama amiodarona od 20 do 180  $\mu\text{M}$  gdje su rezultati istraživanja jasno pokazali da amiodaron inhibira

staničnu proliferaciju. Odnosno, kao i u ovom istraživanju, MTT test pokazao je o dozi ovisno smanjenje vijabilnosti stanica (20).

U istraživanju koje su 2006. godine proveli Fotakis i Timbrell napravljena je usporedba različitih metoda dokazivanja citotoksičnosti i njihove sposobnosti rane detekcije citotoksičnih događaja. Korištene su četiri metode (mjerenje aktivnosti laktat dehidrogenaze - LDH, test proteina, bojenje *neutral red* bojom, MTT test) na dvjema staničnim linijama (HepG2 i HTC). Stanice su bile izložene kadmijevom kloridu (0 – 300  $\mu\text{M}$ ) u razmaku od 3, 5 i 8 sati. U HTC stanicama svaki od testova citotoksičnosti dao je različite rezultate koji nisu bili u suglasnosti gdje su se MTT test i test bojenja *neutral red* bojom pokazali najosjetljivijima. Nesuglasnost rezultata objašnjava se prirodom svakog testa, stoga je možda neka od ovih metoda pogodnija za mjerenje u duljim vremenskim rasponima ili u višim koncentracijama (otpuštanje LDH, proteini). Rezultati MTT testa pokazali su eksponencijalan pad s obzirom na kontrolu pri povećanju koncentracije toksične tvari i vremenu djelovanja (15). Takvi rezultati izravno se mogu usporediti s rezultatima ovoga istraživanja gdje se MTT metoda pokazala kao najuspješnija i najspecifičnija metoda kojom je zabilježen toksičan učinak amiodarona na HTC stanice.

Metoda mjerenja reduciranog glutationa (GSH) metoda je neizravnog dokazivanja oksidativnog stresa nastalog u stanicama, što je još jedan od načina dokazivanja citotoksičnog učinka nekog agensa, odnosno amiodarona. Unutarstanični GSH status osjetljiv je pokazatelj ukupnog zdravlja stanice te njezine sposobnosti da se odupre toksičnom izazovu (26). U ovom istraživanju, usporedbom koncentracija glutationa s obzirom na kontrolnu skupinu, uočeno je o dozi ovisno smanjenje glutationa što nam, ponovno, dokazuje citotoksičan učinak amiodarona, odnosno da se u stanicama, posljedično djelovanju amiodarona, povećao oksidativni stres. Uzimajući kontrolu kao 100 % količinu glutationa, možemo uočiti pad na 80,7 % koncentracije glutationa u stanicama na koje je djelovao 20  $\mu\text{M}$  AMD te pad na 60 % koncentracije u stanicama na koje je djelovao 40  $\mu\text{M}$  AMD.

U istraživanju koje su 2014. godine proveli Chakraborty i sur. na dvije skupine odraslih štakora tretmanom amiodaronom kroz 30 dana, dokazana je pojava oksidativnog stresa kao posljedica djelovanja amiodarona. Izmjerena je povišena razina joda u urinu nakon izlaganja amiodaronu, povišene razine kortizola u serumu kao i povećan LPO (lipidna peroksidacija) uz istovremeni porast aktivnosti CAT (katalaze) i SOD (supraoksid dismutaza) u jetri, bubrezima i testisima.

Zaključno ovim markerima oksidativnog stresa, u organizmima tretiranih štakora razvio se oksidativni stres prilikom dejodinizacija amiodarona. Prekomjerna količina joda u cirkulaciji izazvala je stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i slobodnih radikala (29). Ovakvi rezultati toksičnosti amiodarona na mitohondrijsku funkcionalnost, odgovaraju rezultatima moga istraživanja gdje je rezultat mjerenja reduciranog glutationa, kao neizravnog markera oksidativnog stresa, dokazao smanjenje razine GSH prilikom povećanja koncentracije amiodarona.

U istraživanju koje su 2013. proveli Heidari i sur. na hepatocitima štakora, mjereno je stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, peroksidacija lipida, depolarizacija mitohondrija te količina GSH i GSSG uslijed djelovanja toksičnih lijekova: izoniazida te hidrazina. Također, istim metodama praćeni su i zaštitni učinci taurina na stanice tretirane tim toksikantima. Dokazano je o koncentraciji ovisno smanjenje glutationa prilikom povećanja koncentracije lijeka, kao i povećanje količine GSSH uzrokovano oksidacijom glutationa. Izmjerena količina GSH u skupinama tretiranim taurinom uz toksikante (izoniazid ili hidrazin) pokazala je znatno više koncentracije što pokazuje zaštitan učinak taurina, ali i mogućnosti GSH testa da precizno prati oksidacijski status stanica (27).

Oil red O (ORO) metoda je bojenja bioloških tkiva ili stanica kojom možemo locirati i vizualizirati lipidne kapljice. Toksični utjecaj amiodarona utječe na beta-oksidaciju u mitohondrijima čime lipidne kapljice ostaju akumulirane u citosolu stanica (19). U ovom istraživanju, Oil red O bojenje pokazalo je o koncentraciji ovisno smanjenje broja stanica, što nam potvrđuje rezultate MTT testa, ali i povećanje lipidnog sadržaja (mjenog integriranom gustoćom) što ide u prilog saznanju da amiodaron blokira beta-oksidaciju (18). Iako je najveća razina lipidnog sadržaja očekivana kod stanica tretiranih s 40  $\mu\text{M}$  AMD, nisu dobiveni takvi rezultati, vjerojatno uzrokovano o koncentraciji ovisnom smanjenju vijabilnosti stanica. Odnosno, premalen broj stanica je uopće preživio na koncentraciji od 40  $\mu\text{M}$  AMD, stoga pri toj koncentraciji nije vidljiv najveći udio lipida. Usporedbom volumena kapljica među skupinama, nije uočena statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom što može biti uzrokovano kratkim djelovanjem (24 h) amiodarona, odnosno može govoriti o tome da je oštećenje ove vrste reverzibilno, budući da je volumen kapljica ostao jednak onima u kontrolnim skupinama. Povećanjem volumena lipidnih kapljica, smanjuje se mogućnost ozdravljenja stanice, odnosno takve povećane lipidne kapljice manje su metabolički dostupne te je teži oporavak od tretmana amiodaronom.

U istraživanju na Huh7 ljudskoj jetrenoj staničnoj liniji provedenom 2018. godine stanice su tretirane amiodaronom i tamoksifenom (5 i 10  $\mu\text{M}$ ) te je dokazano o koncentraciji ovisno smanjenje broja i vijabilnosti stanica (bojenje Typan Blue bojom, MTT test). Također, uočeno je povećanje broja i veličine lipidnih kapljica u citosolu stanica nakon Oil red O bojenja. Rezultati prikazani u ovome istraživanju izravno su usporedivi s rezultatima istraživanja na HTC stanicama, odnosno usporedivo je očekivano smanjenje vijabilnosti stanica, a porast lipidnog udjela (28).

Prema istraživanju koje su El Golli-Bennour i sur. proveli 2010. godine, dokazana je i prekomjerna ekspresija Hsp 70 i stvaranje značajne količine reaktivnih kisikovih spojeva koja se mjerila razinom peroksidacije lipida, što odgovara rezultatima istraživanja s HTC stanicama gdje se količina unutarstaničnih lipida povećavala s povećanjem koncentracije amiodarona (20).

Iako mnoštvo istraživanja govori o visokoj citotoksičnosti amiodarona (6, 4, 20), meta-analiza koju su proveli Ruzieh i sur. 2019. godine sažela je sve randomizirane kontrolirane pokuse (s placebo kao kontrolnom skupinom) kako bi što točnije procijenili pojavnost nuspojava korištenja amiodarona. Analiza je uključila 43 studije sa sveukupno 11.395 ispitanika. Iako su rezultati pokazali statistički značajnu pojavnost negativnih učinaka amiodarona na zdravlje pluća, štitnjače, jetre, srca, mozga i kože, ukupna stopa nuspojava je bila niska i teške nuspojave bile su rijetke. Zanimljivo je da je ukupna incidencija jetrenih nuspojava bila poprilično niska te u studijama koje su svoja istraživanja provodili kraće od 12 mjeseci nije pokazala statistički značajnu razliku od placeba, a povrh toga nije zabilježeno ni jedno zatajenje jetre ili ciroza. Rezultati ove meta-analize nisu dali potpuno očekivane rezultate, budući da amiodaron slovi kao jedan od lijekova s visokom razinom citotoksičnosti, a razlozi za to kriju se najvjerojatnije u činjenici da su sva istraživanja uključivala stariju populaciju (prosječna dob 62 godine) te su isključeni svi ispitanici s priležećim bolestima pluća, štitnjače i jetre. Upravo ova isključivost govori nam o limitacijama ovoga istraživanja, budući da ne znamo kakve nuspojave bi amiodaron izazvao na drugim dobnim skupinama ili kako lijek točno djeluje na pacijente koji već boluju od nekih kroničnih ili akutnih bolesti (29).

Provedena studija pokazala je da AMD ima toksične učinke na HTC stanice, a ovisno o dozi njegov štetan učinak se povećava. Svaka od metoda (MTT, GSH, ORO) provedenih u ovome istraživanju na svoj način dokazuje citotoksično djelovanje amiodarona na različite biokemijske putove u stanicama; MTT govori o mitohondrijskom statusu stanica, GSH o razini oksidativnog stresa, a

ORO o lipogenom učinku koji je uzrokovan nedostatnom oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijima. Ovisno o potrebama pojedinačnih istraživanja, svaka od ovih metoda može služiti kao snažan alat u dokazivanju, ali i razjašnjavanju toksičnosti različitih lijekova u *in vitro* istraživanjima.

## 6. Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Tretiranje štakorskih jetrenih stanica (HTC) amiodaronom u koncentracijama 40 i 20  $\mu\text{M}$  pokazalo je o dozi ovisno smanjenje broja stanica dokazano MTT testom.
2. Mjerenje količine reduciranog glutationa (GSH) pokazalo je o dozi ovisan porast količine GSH kao posljedicu oksidativnog stresa uzrokovanog tretmanom amiodaronom.
3. Vizualizacijom HTC stanica Oil red O (ORO) bojenjem dokazano je o dozi ovisno povećanje broja lipidnih kapljica te smanjenje vijabilnosti stanica.
4. Oil red O bojenjem nije utvrđena statistički značajna volumna razlika među kapljicama između tretiranih skupina.
5. Usporedbom MTT, GSH i ORO metoda u dokazivanju citotoksičnosti potvrđen je citotoksičan učinak AMD-a na HTC jetrene stanice.



## 7. Sažetak

**Ciljevi istraživanja:** Dokazivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija amiodarona (AMD) na HTC staničnu kulturu kroz 24 h. Za određivanje vijabilnosti stanica korištena je MTT metoda, a za procjenu oksidativnog statusa mjerena je količina staničnog reduciranog glutationa (GSH). Mikrofotografiranjem zabilježen je nastanak lipidnih kapljica u tretiranim stanicama obojenima *Oil red O* (ORO) bojenjem.

**Nacrt studije:** Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani pokus.

**Ispitanici i metode:** Istraživanje je provedeno na *hepatoma tissue culture* (HTC) štakorskoj jetrenoj staničnoj liniji. Randomizacija je postignuta blok dizajnom, a svaki od eksperimenata ponovljen je tri puta. Konfluentne stanice podvrgnute su tretmanu amiodaronom (20 i 40  $\mu\text{M}$  AMD) te nakon 24 h određivani su pokusi. Za određivanje citotoksičnosti korištene su tri metode: MTT, GSH i ORO bojenje.

**Rezultati:** MTT testom zabilježeno je značajno manje stanično preživljenje među tretiranim HTC stanicama u usporedbi s kontrolnom skupinom. Između dviju skupina (20 i 40  $\mu\text{M}$ ) tretiranih AMD-om ne postoji statistički značajna razlika. Mjerenjem količine GSH zabilježen je statistički značajan pad razine GSH između kontrolne skupine i skupine tretirane s 40  $\mu\text{M}$  AMD, dok između kontrolne skupine i 20  $\mu\text{M}$  kao i između tretiranih skupina međusobno nije pronađena statistički značajna razlika. ORO bojenje pokazalo je o dozi ovisno povećanje lipidnog udjela u tretiranim stanicama s obzirom na kontrolnu skupinu.

**Zaključak:** HTC stanice podvrgnute tretmanu AMD-om (20 i 40  $\mu\text{M}$ ) pokazale su o dozi ovisno smanjenje vijabilnosti stanica; pojava oksidativnog stresa zabilježena je smanjenjem GSH prilikom povećanja koncentracije AMD-a, a nedostatna  $\beta$ -oksidacija izazvala je stvaranje lipidnih kapljica u citosolu tretiranih stanica što je dokazano ORO bojenjem.

Ključne riječi: amiodaron; GSH; HTC; *in-vitro*; MTT; *Oil red O*

## 8. Summary

### **Comparison of different methods of testing the cytotoxicity of amiodarone in rat liver cell line (HTC)**

**Objectives:** Demonstration of the cytotoxic effect of different concentrations of amiodarone (AMD) on HTC cell culture over 24 hrs. The MTT method was used to determine cell viability and the amount of reduced cellular glutathione (GSH) was measured to assess the oxidative status. Microphotography recorded the formation of lipid droplets in treated cells stained with Oil red O (ORO) staining.

**Study Design:** The study was conducted as a randomized controlled trial.

**Participants and Methods:** The research was conducted on *hepatoma tissue culture* (HTC), a rat liver cell line. Randomization was achieved using a block design and each experiment was repeated three times. Confluent cells were subjected to amiodarone treatment (20 and 40  $\mu\text{M}$  AMD) and after 24 hrs experiments were performed. Three methods were used to determine cytotoxicity: MTT, GSH and ORO staining.

**Results:** The MTT assay showed significantly lower cell survival among treated HTC cells compared to the control group. There is no statistically significant difference between the two groups (20 and 40  $\mu\text{M}$ ) treated with AMD. By measuring the amount of GSH, a statistically significant drop in the level of GSH was recorded between the control group and the group treated with 40  $\mu\text{M}$  AMD, while no statistically significant difference was found between the control group and 20  $\mu\text{M}$ , as well as between the treated groups. ORO staining showed a dose-dependent increase in lipid content in treated cells compared to the control group.

**Conclusion:** HTC cells treated with AMD (20 and 40  $\mu\text{M}$ ) showed a dose-dependent decrease in cell viability; the occurrence of oxidative stress was recorded by the reduction of GSH when the concentration of AMD increased and insufficient  $\beta$ -oxidation caused the formation of lipid droplets in the cytosol of the treated cells, which was proven by ORO staining.

**Keywords:** amiodarone; GSH; HTC; in vitro; MTT; Oil red O

## 9. Literatura

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2021. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Erceg M, Miler Knežević A. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2020. godini. 2021.
3. Jukić T, Punda M, Franceschi M, Staničić J, Granić R, Kusić Z. Amiodaron i funkcija štitnjače. *Liječnički Vjesn.* 2015;137:181–8.
4. Florek JB, Girzadas D. Amiodarone [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482154/>
5. Spaniol M, Bracher R, Ha HR, Follath F, Krähenbühl S. Toxicity of amiodarone and amiodarone analogues on isolated rat liver mitochondria. *J Hepatol.* 2001;35(5):628–36.
6. Lewis JH, Ranard RC, Caruso A, Jackson LK, Mullick F, Ishak KG, et al. Amiodarone hepatotoxicity: Prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients. *Hepatology.* 1989;9(5):679–85.
7. Fromenty B, Fisch C, Labbe G, Degott C, Deschamps D, Berson A E, Al. Amiodarone inhibits the mitochondrial  $\beta$ -oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255:1371–6.
8. Fromenty B, Fisch C, Berson A, Letteron P, Larrey D PD. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and II. *Pharmacol Exp Ther.* 1990;255:1377–1384.
9. Zhao H, Tan Z, He L, Zhu S, Yan R, Kou H PJ. Amiodarone promotes heat-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in mouse HL1 atrial myocytes. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2021;41(3):406–11.
10. Bilusic M. Oksidativni stres [Internet]. Poliklinika Bonipharm. 2021. Available from: <https://bonifarm.hr/laboratorij/strucni-clanci/oksidativni-stres/>
11. Jurkovič S, Osredkar J, Marc J. Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. *Biochem Medica.* 2008;18(2):162–74.
12. Vujeva V. Ispitivanje stabilnosti glutationa u uzorcima plazme i krvi. Sveučilište u Zagreb Farm Fak. 2019;
13. Rabinowich L, Shibolet O. Drug induced steatohepatitis: An uncommon culprit of a common disease. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
14. Anthérieu 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;53(6):1895–905.

15. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006;160(2):171–7.
16. Malatesta M, Perdoni F, Santin G, Battistelli S, Muller S, Biggiogera M. Hepatoma tissue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2008;22(8):1853–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.09.006>
17. Thompson EB. Liver Cells (HTC). Acad Press Inc. 1979;LVIII(1966):544–52.
18. Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1995;67(1):101–54.
19. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc.* 2013;8(6):1149–54.
20. Golli-Bennour E El, Bouslimi A, Zouaoui O, Nouira S, Achour A, Bacha H. Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2012;64(5):425–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2010.10.008>
21. Mason JW. Amiodarone. *N Engl J Med.* 1987;316(8):455–66.
22. Penugonda N, Mohmand-Borkowski A, Burke JF. Dronedarone for atrial fibrillation: How does it compare with amiodarone? *Cleve Clin J Med.* 2011;78(3):179–85.
23. Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ. HTC cell line [Internet]. 2010. Available from: <http://bcrj.org.br/celula/Htc-Rat-Hepatoma>
24. Kenyon SH, Waterfield CJ, Timbrell JA, Nicolaou A. Methionine synthase activity and sulphur amino acid levels in the rat liver tumour cells HTC and Phi-1. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(3):381–91.
25. Cavalcante FML, Almeida IV, Düsman E, Mantovani MS, Vicentini VEP. Cytotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of the gentisic acid on HTC cells. *Drug Chem Toxicol.* 2018;41(2):155–61.
26. Đumlija I. Uspostava modela adipogeneze na mišjim 3T3-L1 preadipocitima. *Med Fak Osijek.* 2019;
27. Heidari R, Babaei H, Eghbal MA. Cytoprotective effects of taurine against toxicity induced by isoniazid and hydrazine in isolated rat hepatocytes. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2013;64(2):201–10.
28. Abičić I. OSOBITOSTI TOKSIČNOSTI AMIODARONA I TAMOKSIFENA U MODELU JETRENIH (HUH7) STANICA. *Med Fak Osijek.* 2018;
29. Ruzieh M, Moroi MK, Aboujamous NM, Ghahramani M, Naccarelli G V., Mandrola J, et al. Meta-Analysis Comparing the Relative Risk of Adverse Events for Amiodarone Versus Placebo.

Am J Cardiol [Internet]. 2019;124(12):1889–93. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2019.09.008>

## 10. Životopis

**Ime i prezime:** Marina Martinović

**Datum i mjesto rođenja:** 21. rujna 1997., Slavonski Brod

**Adresa:** Šetalište braće Radić 20, 35000 Slavonski Brod

**e-pošta:** mmartinovic1@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2004. – 2012. Osnovna škola „Ivan Goran Kovačić“, Slavonski Brod

2012. – 2016. Klasična gimnazija fra Marijana Lanosovića s pravom javnosti, Slavonski Brod

2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike,

Medicinski fakultet Osijek

2019. – 2022. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek