

Usporedba različitih metoda ispitivanja citotoksičnosti amiodarona u ljudskoj jetrenoj staničnoj liniji (Huh7)

Relatić, 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:152:998838>

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 Relatić

USPOREDBA RAZLIČITIH METODA
ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI
AMIODARONA U LJUDSKOJ
JETRENOJ STANIČNOJ LINIJI (HUH7)

Diplomski rad

Osijek, 2022.

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

Marina Relatić

USPOREDBA RAZLIČITIH METODA
ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI
AMIODARONA U LJUDSKOJ
JETRENOJ STANIČNOJ LINIJI (HUH7)

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek, Katedra za farmakologiju

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

Rad ima 30 listova, 3 tablice i 6 slika.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA	III
1. UVOD	1
1.1. Amiodaron	1
1.2. Mehanizmi djelovanja amiodarona.....	1
1.3. Toksično djelovanje amiodarona	2
1.4. Ispitivanje citotoksičnosti <i>in vitro</i>	2
2. CILJEVI	4
3. MATERIJALI I METODE	5
3.1. Ustroj studije.....	5
3.2. Materijali.....	5
3.3. Metode	6
3.3.1. Nasađivanje stanica.....	6
3.3.2. Održavanje stanične linije.....	6
3.3.3. Brojanje stanica.....	7
3.3.4. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid)	7
3.3.4.1. Princip metode	7
3.3.4.2. Postupak izvođenja MTT	7
3.3.5. GSH.....	9
3.3.5.1. Princip metode	9
3.3.5.2. Priprema ekstrakta stanica	9
3.3.5.3. Priprema stock otopina.....	11
3.3.5.4. Priprema radnih otopina.....	11
3.3.5.5. Postupak izvođenja GSH	12
3.3.6. Oil red O	12
3.3.6.1. Princip metode	12
3.3.6.2. Priprema stanica.....	13
3.3.6.3. Priprema boje	13
3.3.6.4. Bojanje preparata	13
3.3.7. DAPI bojanje	14
3.3.7.1. Princip metode	14
3.3.7.2. Bojanje preparata	14
3.3.8. Statističke metode	14
4. REZULTATI	15
4.1. MTT	15

4.2. GSH.....	16
4.3. Oil red O i DAPI.....	16
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČAK.....	24
7. SAŽETAK.....	25
8. SUMMARY.....	26
9. LITERATURA	27
10. ŽIVOTOPIS.....	30

POPIS KRATICA

AMD – amiodaron

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

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

DMSO – dimetil sulfoksid

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

EDTA – *engl. ethylenediaminetetraacetic acid* – etilendiamintetraoctena kiselina

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

GSH – reducirani oblik glutationa

GSSG – oksidirani oblik glutationa

HDL – *engl. high-density lipoprotein* – lipoprotein visoke gustoće

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

NADPH – *engl. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

ORO – Oil red O

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

ROS – *engl. Reactive oxygen species* – reaktivni kisikovi spojevi

SSA – *engl. sulfosalicylic acid* – sulfosalicilna kiselina

TNB – 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina

1. UVOD

1.1. Amiodaron

Amiodaron (AMD), jodom obogaćen derivat benzofurana (1), jedan je od najčešće prepisivanih antiaritmika diljem svijeta. Sastoji se od benzofuranskog prstena s butilnom grupom na položaju 2 i 4-[2-(dietilamino)etoksi]-3,5-dijodobenzoil grupom na položaju 3. Slabo je topljiv u vodi, ali lako se otapa u kloroformu i alkoholu (1). Njegov antiaritmički učinak primijećen je na životinjskim modelima još 1969. godine (2), a Singh i Vaughan Williams objavili su 1970. godine istraživanje koje potvrđuje kako AMD štiti od ouabainom inducirane ventrikularne fibrilacije¹ (3). Također, provedena su brojna klinička istraživanja na pacijentima s aritmijom koja su urodila zadovoljavajućim rezultatima intravenozne i oralne primjene AMD (4). Rosenbaum i suradnici u svojim su istraživanjima dokazali učinkovitost AMD-a u pacijenata s Wolf-Parkinsonovim sindromom, a zatim i u ostalim vrstama supraventikularnih i ventrikularnih aritmija (5).

AMD pripada trećoj skupini antiaritmika čija je definirajuća elektrofiziološka karakteristika produljenje srčanog akcijskog potencijala s posljedičnim produljenjem refraktornog razdoblja (6).

1.2. Mehanizmi djelovanja amiodarona

Osim što je odobren za liječenje određenih ventrikularnih tahiaritmija, pokazao se kao vrijedan lijek u liječenju atrijske fibrilacije i održavanja normalnog sinusnog ritma nakon kardioverzije atrijske fibrilacije (7). AMD učinkovito inhibira aritmiju poboljšavajući biomehanička svojstva miokarda i slabeći osjetljivost mehaničke stimulacije istezanja (8). Ovakav učinak očituje se usporavanjem brzine otkucaja srca kao i smanjenjem vaskularnog otpora.

Visoka učinkovitost ovog antiaritmika rezultat je njegova tri mehanizma djelovanja. AMD djeluje kao inhibitor kalijevih kanala koji usmjeravaju kalij unutar stanice (K_{ir}) te kanala ograničenih naponom, primjerice hERG kanala odgovornih za repolariziranje odgođene struje

¹ Ouabain je srčani glikozid koji inhibira Na^+/K^+ -ATPazu u plazma membrani i time povećava unutarstaničnu koncentraciju Na^+ . Porast intracelularne koncentracije Na^+ uzrokuje unutarstanični suvišak Ca^{2+} zbog aktivacije sarkolemalne izmjene Na^+/Ca^{2+} . Suvišak Ca^{2+} zauzvrat izaziva oscilatorno oslobađanje Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma i oscilatornu fluktuaciju potencijala mirovanja. Oscilatorno povećanje Ca^{2+} izaziva pojačanje sistoličke napetosti (pozitivni inotropni učinak), dijastoličke napetosti (pozitivan tonotropni učinak) te povećanog broja srčanih otkucaja i aritmije.

kalijskog ispravljača (I_{Kr}). Prema tome, AMD odgađa repolarizaciju u većini srčanih tkiva. Nadalje, AMD inhibira natrijeve kanale u mirujućem i inaktiviranom stanju (6). Zahvaljujući ovom mehanizmu, AMD smanjuje brzinu vodljivosti atrioventikularnog čvora. Osim toga, smanjuje automatizaciju srčanog tkiva, te smanjuje sposobnost stanica i generiranje akcijskog potencijala bez vanjskog podražaja. Njegova inhibicija kalijevih kanala odgovorna je za inhibiciju automatizacije sinoatrijskog čvora. AMD također djeluje i kao nekompetitivni blokator alfa i beta adrenoreceptora (9). Sugerira se da njegovo svojstvo blokade beta adrenoreceptora također ide u prilog njegovom antiaritmickom djelovanju. AMD svojim djelovanjem smanjuje refraktornost nakon repolarizacije² što vjerojatno pridonosi smanjenju prijevremenih depolarizacija (10).

1.3. Toksično djelovanje amiodarona

Spoznaje o mehanizmu djelovanja AMD-a i njegovoj kliničkoj relevantnosti rezultirale su povećanom uporabom ovog antiaritmika u praksi, ali su potaknule i istraživanja o njegovim štetnim učincima kao što su smetnje u radu štitnjače (11) i akumulacija lijeka u brojnim organima (oko, štitna žlijezda, koža, pluća, periferni živci). AMD blokirajući beta oksidaciju masnih kiselina uzorkuje njihovu akumulaciju koja se očituje kao nakupljanje lipidnih kapljica unutar stanica (11). Visoke intramitohondrijske koncentracije AMD-a razdvajaju respiratorni lanac i dovode do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS – *engl. Reactive oxygen species*) (12), što se očituje kao pad razine staničnog reduciranog glutationa (GSH). Više koncentracije AMD-a dovode do nepopravljive štete staničnih mehanizama koje rezultiraju smrću stanica. Glavni metabolit AMD-a, desetilamiodaron, pokazao je citotoksičan učinak u staničnim linijama štitnjače (TAD-2), ali i na HeLa staničnoj liniji (13). Wu i suradnici svojim su istraživanjem 2016. godine potvrdili prethodno postojeću pretpostavku da se AMD većim dijelom metabolizira u citokromu P450 3A4 i citokromu P450 1A1, a manjim dijelom i u citokromu P450 2C8. Ovo istraživanje utvrdilo je i poveznicu takvog metabolizma s hepatotoksičnošću AMD-a (14).

1.4. Ispitivanje citotoksičnosti *in vitro*

U područjima farmakologije i toksikologije koristi se širok spektar testova citotoksičnosti. Ispitivanja citotoksičnosti i vitalnosti stanica temelje se na različitim

² Refraktornost nakon repolarizacije (PRR) važan je čimbenik u određivanju bloka provođenja i predstavlja razliku između efektivnog refraktornog razdoblja (ERP) i trajanja monofaznog akcijskog potencijala (MAPD).

funkcijama stanica. Lijekovi imaju različite mehanizme citotoksičnosti poput uništavanja staničnih membrana, sprječavanja sinteze proteina te ireverzibilnih vezanja na receptore. S ciljem utvrđivanja stanične smrti uzrokovane takvim oštećenjima, razvijeni su kolorimetrijski, fluorimetrijski i luminometrijski testovi te testovi isključivanja boje (15). *In vitro* testovima citotoksičnosti najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu. Ovakvim se testovima utvrđuje odnos koncentracije ispitivane tvari i vremena izlaganja te mehanizma djelovanja testirane tvari. Brojne su prednosti uporabe *in vitro* testova toksičnosti u usporedbi s *in vivo* ispitivanjima. Osim dobiti eksperimentalnih životinja, *in vitro* testovi toksičnosti odlikuju se i nižom cijenom, višim stupnjem standardizacije, reproducibilnošću te većom brzinom izvođenja u odnosu na *in vivo* istraživanja. Nedostatci *in vitro* testova su nepotpuna ili u potpunosti odsutna metabolička aktivacija ispitane tvari u staničnim sustavima te mogućnost uspostave reakcije između ispitivane tvari i sastojaka medija za uzgoj stanica (16).

2. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti staničnu vijabilnost Huh7 stanica pri različitim koncentracijama tijekom 24 sata izloženosti AMD-u.
2. Izmjeriti količinu staničnog reduciranog glutationa (GSH) u Huh7 stanicama tijekom 24 sata izloženosti AMD-u.
3. Pomoću mikrofotografiranja vizualizirati promjene morfologije stanica tretiranih različitim koncentracijama AMD-a, te prikazati nastanak i distribuciju lipidnih kapljica vizualiziranih "Oil red O" (ORO) bojanjem u Huh7 stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani pokus.

3.2. Materijali

Istraživanje je provedeno *in vitro* na staničnoj kulturi Huh7 stanične linije. Stanična linija Huh7 uspostavljena je 1982. godine iz dobro diferencirane stanične linije karcinoma izvedenog iz hepatocita. Liniju su uspostavili Nakabashi i Sato iz tumora jetre 57-godišnjeg Japanca. Huh7 stanice čine besmrtnu staničnu liniju epitelnih tumorogenih te heterogenih stanica koje prijanjaju na površinu i rastu dvodimenzionalno (17).

Huh7 stanice uzgojene su u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (DMEM) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS – *engl. Fetal bovine serum*) te 1%-tne otopine antibiotika/antimikotika (Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA, SAD), na temperaturi od 37 °C u vlažnom atmosferskom zraku s 5 % CO₂ (v/v). Randomizacija je postignuta blok dizajnom, a eksperimenti su ponovljeni tri puta. Nakon što su nasade stanice su rasle 48 sati, medij je zamijenjen medijem bez fetalnog goveđeg seruma i stanice su tretirane različitim koncentracijama AMD-a. Nakon 24 sata određene su stanična vijabilnost, proliferacija i nakupljanje lipida i neutralnih triglicerida. Preživljenje stanica ispitano je MTT-testom, nakupljanje triglicerida i lipida vizualizirano je primjenom ORO bojanja, a mjerenjem GSH ispitana je ROS nastalih kao posljedica djelovanja AMD-a.

Stanice su tretirane amiodaron hidrokloridom, 98% (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Određivanje lipida provedeno je ORO bojom (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), 4',6-diamidino-2-fenilindol, DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Preživljenje stanica ispitano je MTT 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), a količina ROS ispitana je metodom GSH (Komplet za ispitivanje glutaciona, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD).

3.3. Metode

3.3.1. Nasađivanje stanica

Stanice su izvađene iz tekućeg dušika na -80°C i otopljene. U kabinetu za sterilan rad pripremljene su Petrijeve zdjelice za uzgoj staničnih kultura i označene nazivom stanične linije, datumom nasađivanja i brojem pasaže. Nakon odmrzavanja, stanice su premještene u Falcon epruvetu volumena 15 ml pipetom Eppendorf 1000 i centrifugirane 6 minuta na 1000 ok/min. Nakon centrifugiranja supernatant je ispipetiran i odbačen, a na pelet stanica u Falcon epruvetu dodano je 3 ml medija (DMEM Glucose 4 g/L, PS, FBS). Čitav sadržaj Falcon epruvete nježno je resuspendiran i ispipetiran u Petrijevu zdjelicu koja sadrži 6 ml medija. Nakon dodavanja stanične suspenzije u Petrijevu zdjelicu s medijem, zdjelica je nježno promiješana klizanjem o radnu površinu te je pohranjena u inkubator na 37°C u vlažan atmosferski zrak s 5% CO_2 .

3.3.2. Održavanje stanične linije

Stanična linija Huh7 zahtijeva obnavljanje medija 2-3 puta tjedno. Potrebno je održavati konfluentnost stanica na razinama od 30 do 90%, dakle presaditi stanice prije nego u potpunosti pokriju površinu predviđenu za rast (Petrijevu zdjelicu). Pretjerana konfluentnost stanica (od 90 do 100%) rezultira smanjenjem stope proliferacije (17). Prosječno vrijeme udvostručenja broja stanica je 48 sati. Stanice su presađivane u omjeru 1:2 (sadržaj jedne konfluentne Petrijeve zdjelice razdijeljen je na 2 nove Petrijeve zdjelice). Prilikom presađivanja, u kabinetu za sterilan rad ispipetiran je i odbačen iskorišteni medij iz Petrijevih zdjelica i u svaku je dodano po 4 ml 5%-tnog tripsina. Stanice s tripsinom inkubirane su 5 minuta u inkubatoru. Nakon 5 minuta inkubacije, tripsin je neutraliziran dodavanjem 5 ml medija s FBS-om. Vrlo je važno nakon inkubacije neutralizirati tripsin kako stanice ne bi izgubile sposobnost adhezije za površinu nakon presađivanja i postale neiskoristive. Čitav sadržaj Petrijeve zdjelice premješten je u označene Falcon epruvete od 15 ml i centrifugiran 6 minuta na 1000 rpm. Centrifugiranjem se učinkovito uklanja ostatak tripsina iz stanica. Nakon centrifugiranja, supernatant iz Falcon epruveta je ispipetiran i odbačen. U označene nove Petrijeve zdjelice dodan je medij s FBS-om. S obzirom da u svakoj Petrijevoj zdjelici na kraju postupka treba biti ukupno 10 ml medija, jedan dio medija dodan je na pelet stanica u Falcon epruvetu i nježno resuspendiran, a potom je sadržaj Falcon epruvete ispipetiran u Petrijevu zdjelicu s ostatkom medija do konačnog volumena od 10 ml. Postoji nekoliko problema sa subkulturalnim procesima Huh7 stanične linije. Ukoliko se stanice ne održavaju na subkonfluentnim razinama, vrlo čvrsti međustanični spojevi sprječavaju prodor disocijativnog

agensa i stanice se vrlo teško odvajaju od podloge. Preživljenje stanica može biti nisko nakon presađivanja ukoliko je sredstvo za odvajanje stanica od podloge ostavljeno predugo na stanicama ili ako su stanice bile oštro pipetirane. Stanice Huh7 stanične linije sklone su stvaranju nakupina ukoliko su prejako centrifugirane (17).

3.3.3. Brojanje stanica

Brojanju stanica prethodi tripsinizacija stanica, odvajanje peleta stanica i resuspendiranje s novim medijem u Falcon epruvetu. Iz Falcon epruvete ispipetirano je 10 μ l stanične suspenzije i pomiješano s 10 μ l eritrozina. Za brojanje stanica korištena je Bürker-Türkova komorica. Komorica je podijeljena na 9 velikih kvadrata površine 1 mm² svaki s dvostrukim ravnanjem. Veliki kvadrati su podijeljeni u 16 grupnih kvadrata sa stranicama od 0,2 mm. U središnjem velikom kvadratu svaki je grupni kvadrat podijeljen na 16 malih kvadrata sa stranicama od 0,05 mm (= 0,0025 mm²) (18). U svaku stranu komorice dodano je po 10 μ l obojane stanične suspenzije. Stanice su izbrojane pod svjetlosnim mikroskopom. Izbrojane su stanice s obje strane komorice, a zatim je izračunata aritmetička sredina dobivenih brojeva. Koncentracija stanica dobivena je formulom $N/4 \times 2 \times 10^4$ u kojoj N označava broj stanica.

3.3.4. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid)

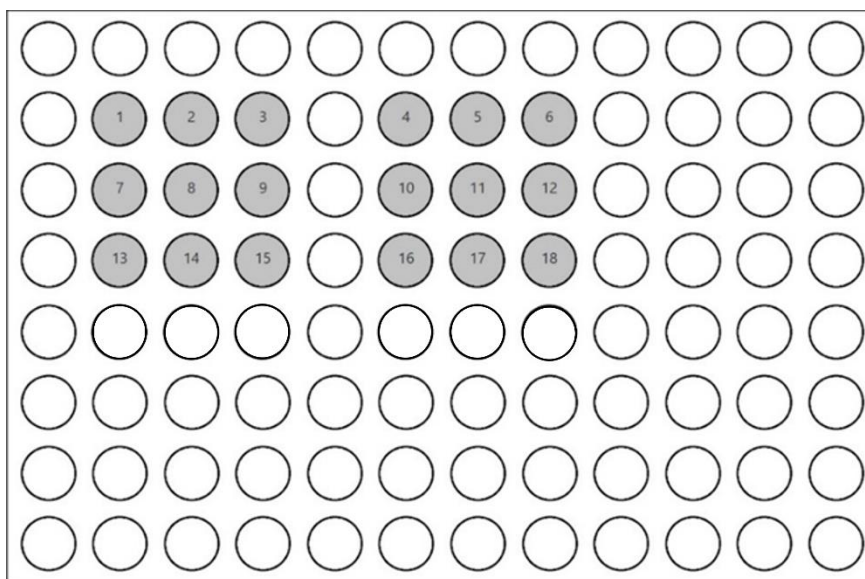
3.3.4.1. Princip metode

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri stanična metabolička aktivnost i proliferacija. Metoda se oslanja na staničnu redukciju tetrazolijevih soli u njihove kristale formazana. Ukoliko stanice aktivno vrše respiraciju dolazi do redukcije blijedo žute tetrazolijeve soli (MTT) u plavo obojene kristale formazana djelovanjem staničnih dehidrogenaza. Nakon primjene alkohola kristali formazana se otapaju, a intenzitet obojenja određuje se spektrofotometrijski na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 595 nm. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica. Rezultati se izražavaju kao postotak živih stanica u odnosu na kontrolu. Jažica koja sadrži netretirane stanice postavlja se kao 100%-tno preživljenje.

3.3.4.2. Postupak izvođenja MTT

1. Stanice su nasađene u mikrotitarsku ploču s 96 jažica ravnoga dna u koncentraciji 1×10^5 st/ml s konačnim volumenom od 100 μ l. Nasađeni su biološki duplikati s po tri

jažice za svaku od tri koncentracije i kontrole (tehnički triplicati) u ukupno 24 jažice (Slika 1). Stanice su 24 sata rasle inkubirane na 37°C u vlažnom atmosferskom zraku s 5% CO₂.



Slika 1. Ova shema prikazuje mikrotitarsku ploču s 96 jažica. Zasjenjena polja označavaju jažice u kojima su nasadene stanice. Kontrole su nasadene u jažicama označenim brojevima od 1 do 3 za prvi biološki duplikat, a od 4 do 6 za drugi. Stanice u jažicama označenima brojevima od 7 do 12 tretirane su koncentracijom AMD-a od 40 µM. Brojevima od 13 do 18 označene su jažice sa stanicama koje su tretirane AMD-om koncentracije 20 µM. Sliku je izradila autorica.

2. Nakon 24 sata rasta, stanice su tretirane dvjema različitim koncentracijama AMD otopljenom u mediju bez FBS-a, a kontrole čistim medijem bez FBS-a. Otopina AMD koncentracije 40 µM dobivena je razrjeđivanjem 5 µl AMD koncentracije 80 mM u 9995 µl medija bez FBS-a, a otopine AMD koncentracija 20 µM dobivena je serijskim razrjeđenjem. Raspored i organizaciju eksperimenta na mikrotitarskoj ploči opisuje Slika 1.
3. Otopina MTT pripremljena je otapanjem 500 mg MTT praha u 10 ml PBS-a. Miješana je magnetskom mješalicom 1 sat u mraku i filtrirana filterom s promjerom pora 0,22 µm. Otopina je razdijeljena u alikvote 10 ml i pohranjena na -20°C.
4. Nakon 24 sata inkubacije, u svaku jažicu dodano je 10 µl otopine MTT (konačne koncentracije 0,5 mg/ml). Mikrotitarska ploča inkubirana je 4 sata na 37°C u vlažnom atmosferskom zraku s 5% CO₂.

5. U svaku jažicu dodano je 100 μ l zakiseljenog izopropanola³ koji je otapalo za kristale formazana. Otapanje je potpomognuto resuspendiranjem sadržaja jažica pipetom. Nakon što su svi kristali formazana razbijeni i otopljeni, mikrotitarska pločica ostavljena je 10 minuta na sobnoj temperaturi.
6. Izmjerena je apsorbancija na 595 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (iMark Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Sjedinjene Američke Države).

3.3.5. GSH

3.3.5.1. Princip metode

Mjerenjem reduciranog staničnog glutationa (GSH) prikazana je količina reaktivnih kisikovih vrsta nastalih kao posljedica djelovanja amiodarona. Korišten je GSH komplet za ispitivanje (Glutathione Assay Kit, Signa-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD), a količina GSH je izmjerena čitačem mikrotitarskih pločica (iMark Microplate Absorbance Reader) na valnoj duljini od 412 nm. Biološki uzorak prvo je deproteiniziran s 5% -tnom otopinom 5-sulfosalicilne kiseline (SSA – *engl. sulfosalicylic acid*), centrifugiran da se ukloni istaloženi protein, a zatim je analiziran GSH. Za mjerenje GSH korišten je kinetički test u kojem katalitičke količine (nmola) GSH uzrokuju kontinuirano reduciranje 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojeve kiseline) (DTNB – *engl. 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*) u 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB – *engl. 5-nitro-2-thiobenzoic acid*), a nastali glutation disulfid (GSSG) reciklira se glutation-reduktazom i nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom (NADPH – *engl. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Prisutni GSSG također reagira dajući pozitivnu vrijednost u ovoj reakciji.

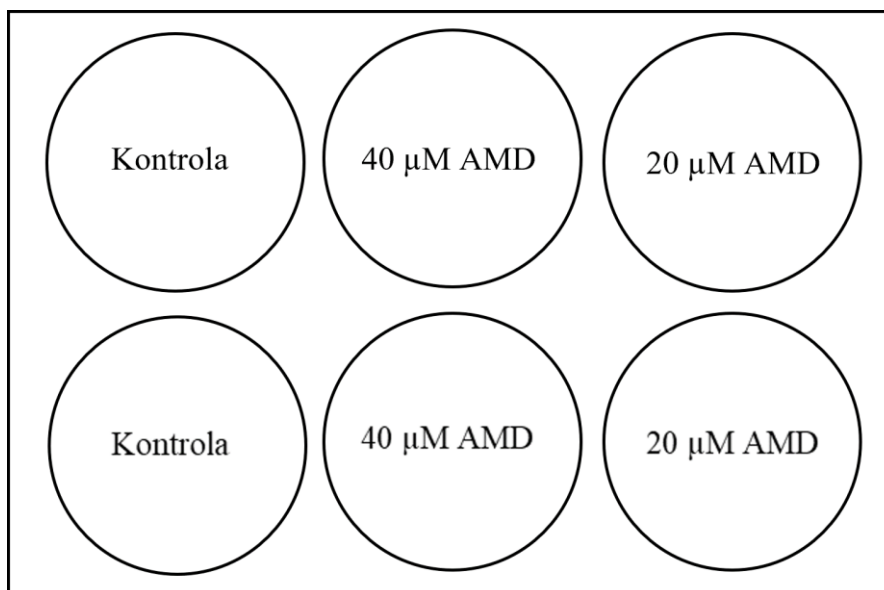
Brzina reakcije proporcionalna je količini GSH do 2 μ M. Žuti produkt, TNB, mjeri se spektrofotometrijski na 412 nm. Analiza koristi standardnu krivulju reduciranog GSH za određivanje količine GSH u biološkom uzorku. Mjerna jedinica količine GSH je nanomol (nmol). Najniža detekcija za GSH i GSSG je 0,103 nmol u pločici s 96 jažica.

3.3.5.2. Priprema ekstrakta stanica

Postupku GSH metode prethodi priprema ekstrakta stanica. Stanice su uzgojene u mikrotitarskoj ploči sa šest jažica u koncentraciji 3×10^5 st/ml. Nakon 24 sata rasta, stanice su tretirane dvjema različitim koncentracijama AMD-a. Nasađeni su biološki duplikati za obje

³ Zakiseljeni izopropanol pripremljen je mjesec dana unaprijed dodavanjem 50ml 2M HCl u 2,5 l izopropanola.

koncentracije te dvije kontrolne jažice. Raspored i organizaciju eksperimenta na mikrotitarskoj ploči opisuje Slika 2. Najbolji se rezultati dobivaju sa svježim uzorcima stanica.



Slika 2. Shema prikazuje organizaciju tretiranja stanica nasadenih na mikrotitarsku ploču sa 6 jažica. Sliku je izradila autorica.

1. Stanice su od površine jažica mikrotitarske ploče odvojene strugačem stanica zbog interferirajućih učinaka tripsina na ovu metodu.
2. Sadržaj iz svake jažice ispipetiran je u označenu epruvetu za mikrocentrifugu.
3. Stanice su centrifugirane na $600\times g$, što dovodi do stvaranja staničnog peleta. Supernatant je nježno ispipetiran i odbačen.
4. Volumen staničnog peleta izmjeren je pipetom. U epruvetu sa staničnim peletom dodana je 5%-tna otopina SSA u volumenu trostruko većem od volumena staničnog peleta. Uzorci su izmiješani vorteks mješalicom.
5. Stanična suspenzija zamrznuta je na -50°C .
6. Stanična suspenzija odmrznuta je na 37°C .
7. Stanična suspenzija ponovno je zamrznuta na -50°C .
8. Stanična suspenzija ponovno je odmrznuta na 37°C i ostavljena 5 minuta na 4°C .
9. Ekstrakt je centrifugiran na $10\,000\times g$ 10 min.
10. Izmjeren je volumen supernatanta i upotrijebljen kao izvorni volumen uzorka u izračunu za određivanje GSH.

3.3.5.3. Priprema stock otopina

Iz kompleta GSH pripremljene su četiri stock otopine. Za pripremu svih otopina korištena je demineralizirana autoklavirana voda.

Za pripremu DTNB Stock otopine (15 mg/ml) 8 mg DTNB-a (kataloški broj D8130) otopljeno je u 5,33 ml dimetil sulfoksida (DMSO) (k.b. D8418). Dobivena je otopina koncentracije 1,5 mg/ml. Ova otopina može se čuvati u alikvotima na -20°C do 3 mjeseca.

NADPH stock otopina (40 mg/ml) pripremljena je otapanjem 25 mg NADPH-a u 0,625 ml vode čime je dobivena otopina koncentracije 40 mg/ml. Otopinu se pohranjuje na -20°C do 6 mjeseci.

5%-tna otopina SSA pripremljena je otapanjem 2,5 g SSA u 50 ml vode. Ova otopina pohranjuje se na 2 - 8°C.

GSH standard stock otopina gustoće 10 mM pripremljena je otapanjem standarda GSH-a u 0,1 ml vode. Otopina može biti pohranjena na -20°C na 3 mjeseca.

3.3.5.4. Priprema radnih otopina

Radne otopine pripremljene su u volumenu dovoljnom za najmanje 48 reakcija od 200 µl izvedenima u mikrotitarskoj ploči s 96 jažica.

1x pufer (12 ml) je kalijev fosfat pufer molarosti 100 mM, pH 7, s dodatkom 1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA – *engl. ethylenediaminetetraacetic acid*). 1x pufer (kataloški broj A5103) razrijeđen je pet puta (five-fold) dodavanjem 2,4 ml pufera u 9,6 ml vode.

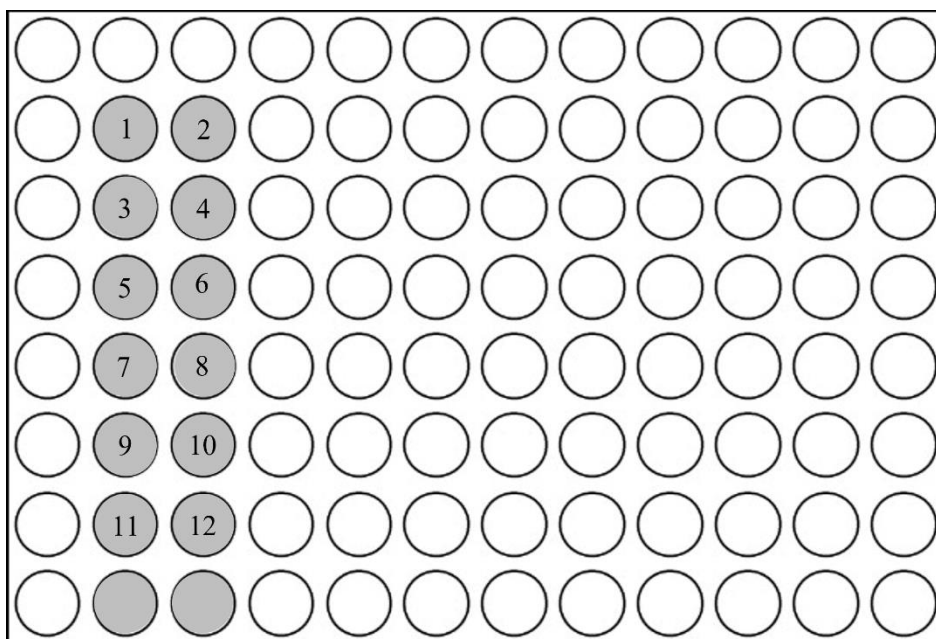
Enzimaska otopina (6 U/ml, 0,25ml) dobivena je razrjeđivanjem 3,8 ml glutation reduktaze (kataloški broj G2424, 400 U/ml), do konačnog volumena od 250 ml s 1x puferom.

NADPH otopina (0,16 mg/ml, 2,5 ml) dobivena je dodavanjem 10 µl NADPH stock otopine (40 mg/ml) u 2,5 ml 1x pufera.

Radna otopina (8 ml) pripremljena je dodavanjem 228 ml razrijeđene enzimske otopine (6 units/ml) i 228 ml DTNB stock otopine (1,5 mg/ml) u 8 ml 1x pufera. Ova se otopina može čuvati do 3h na sobnoj temperaturi.

3.3.5.5. Postupak izvođenja GSH

1. Čitač mikrotitarskih ploča postavljen je na 412 nm s kinetičkim očitanjem u intervalima od 1 minute tijekom 5 minuta.
2. Reakcijska shema postavljena prikazana je Slikom 3.
3. Svako ispitivanje izvedeno je u duplikatu. U svaku jažicu dodano je 5 μ l uzorka. Reakcije su na mikrotitarskoj ploči raspoređene na način prikazan Slikom 3.



Slika 3. Shema prikazuje organizaciju eksperimenta na mikrotitarskoj ploči s 96 jažica, zasjenjene jažice sadrže Huh7 stanice. Jažice označene brojevima od 1 do 4 sadrže duplikate dviju kontrola. Brojevima od 5 do 8 označene su stanice tretirane su AMD koncentracije 40 μ M, a brojevima od 9 do 12 označene su jažice sa stanicama tretiranim AMD koncentracije 20 μ M. Nenumerirane zasjenjene jažice sadržavaju samo 10 μ l 5% - tne otopine SSA kiseline kao slijepu probu. Sliku je izradila autorica.

4. U svaku jažicu dodano je 150 μ l radne smjese i promiješano resuspendiranjem pipetom.
5. Mikrotitarska ploča inkubirana je 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je dodano 50 μ l razrijeđene otopine NADPH i promiješano resuspendiranjem.
6. Pomoću čitača mikrotitarskih ploča izmjerena je apsorbancija u svakoj jažici.

3.3.6. Oil red O

3.3.6.1. Princip metode

Određivanje triglicerida i lipida provedeno je primjenom ORO bojanja u kojem liposolubilna diazo boja oboji neutralne masti crvenom, a jezgre stanica plavom bojom. ORO boja ima izgled crvenog praha, a maksimalna apsorpcija joj je na 518 nm. Preparati su promatrani svjetlosnim mikroskopom i mikrofotografirani fotoaparatom Olympus DP70 uz uvećanje 1:1000.

3.3.6.2. Priprema stanica

Stanice su uzgojene u mikrotitarskoj ploči sa šest jažica u koncentraciji 3×10^5 st/ml. Nakon 24 sata rasta, stanice su tretirane dvjema različitim koncentracijama amiodarona. Nasađeni su biološki duplikati za obje koncentracije te dvije kontrolne jažice. Raspored i organizaciju eksperimenta na mikrotitarskoj ploči opisuje Slika 2.

3.3.6.3. Priprema boje

ORO stock otopina pripremljena je otapanjem 0,5 g ORO u 100 ml 99%-tnog izopropanola. Otopina je zatim dobro promiješana i ostavljena da stoji 20 minuta. Ovakva je otopina stabilna godinu dana.

ORO radna otopina pripremljena je dodavanjem 6 ml ORO stock otopine u 4 ml destilirane vode. Otopina je dobro promiješana i nakon 15 minuta stajanja filtrirana filter papirom. Ovakvu je otopinu potrebno pripremiti 15 minuta prije upotrebe i ostaje stabilna 2 sata.

3.3.6.4. Bojanje preparata

1. Fiksacija: Medij je uklonjen sa stanica i stanice su dvaput isprane $1 \times$ PBS-om. U svaku jažicu dodano je po 2 ml 10%-tnog formalina nježnim pipetiranjem uz zid jažice. Sadržaj je nježno promiješan kruženjem mikrotitarske ploče o podlogu i inkubiran 30 minuta.
2. Formalin je uklonjen i stanice su dvaput oprane vodom. Stanicama je dodano 2 ml 60%-tnog izopropanola i inkubirane su 5 minuta.
3. 60%-tni izopropanol je uklonjen i stanice su ravnomjerno prekrivene radnom otopinom Oil Red O. Sadržaj mikrotitarske ploče nježno je promiješan klizanjem ploče kružnim pokretima o podlogu. Stanice su ostavljene 15 minuta u otopini ORO.
4. Otopinu ORO je uklonjena i stanice su 2-5 puta isprane destiliranom vodom dok nijedna suvišna mrlja nije bila vidljiva.
5. Stanicama je dodan hematoksilin i inkubirane su 1 minutu.

6. Hematoksilin je uklonjen i stanice su 2-5 puta isprane vodom.
7. Stanice su pokrivene destiliranom vodom za pohranu i promatranje pod mikroskopom.

3.3.7. DAPI bojanje

3.3.7.1. Princip metode

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) je plavo-fluorescentna DNA boja korištena za vizualizaciju molekula DNA pod fluorescentnim mikroskopom spojenim na vrlo osjetljivu video kameru. DAPI boja pokazuje dvadeseterostruko povećanje fluorescencije nakon vezanja na adenin-timin regije dvolančane DNA.

3.3.7.2. Bojanje preparata

1. Stanice su fiksirane u 10%-tnom formalinu.
2. Uzorak je nakratko ispran fosfatnim puferom (1×PBS).
3. Temeljna otopina DAPI razrijeđena je na 300 nM u PBS-u. Dodano je približno 300 µL ove DAPI otopine svakom preparatu prije dodavanja pokrovnog stakalca, pazeći da su stanice potpuno prekrivene.
4. Preparati su inkubirani 1-5 minuta.
5. Uzorak je ispran nekoliko puta u PBS-u. Višak pufera s pokrovnog stakalca je ocijeđen i preparati su pregledani.

3.3.8. Statističke metode

Numerički podaci obrađeni su u računalnom programu u MedCalc, (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija). P vrijednosti * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ smatraju se statistički značajnim. Rezultati su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. U slučaju raspodjela koje ne slijede normalnu razdiobu, numerički su podaci opisani medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike između dvaju nezavisnih skupina normalno raspodijeljenih numeričkih podataka testirane su Studentovim T-testom. U slučajevima kad varijable nisu slijedile normalnu raspodjelu, korišten je neparametrijski analog Man-Whitney U test. Analiza razlika među srednjim vrijednostima procijenjena je analizom varijance (ANOVA), a u slučaju raspodjela koje ne slijede normalnu razdiobu, razlike između više nezavisnih skupina testirane su Kruskal–Wallis testom.

4. REZULTATI

Provedeno je istraživanje na Huh7 stanicama tretiranima AMD-om u dvije različite koncentracije (40 μ M i 20 μ M). Metodom MTT izmjerena je stanična metabolička aktivnost i proliferacija, mjerenjem GSH prikazana je količina ROS-a nastalih kao posljedica djelovanja AMD-a, a ORO bojanjem provedeno je određivanje triglicerida i lipida. Eksperimenti su provedeni na tehničkim triplicatima i biološkim duplikatima, svaka metoda ponovljena je tri puta.

4.1. MTT

Mjerenjem stanične metaboličke aktivnosti i proliferacije MTT metodom dobivene su vrijednosti apsorbancije. Studentovim t-testom utvrđena je značajna razlika između vrijednosti pri koncentracijama od 40 μ M AMD u odnosu na kontrolu, uz razinu statističke značajnosti $P < 0,001$. Studentovim t-testom također je utvrđena i razlika između kontrolne i skupine tretirane koncentracijom od 20 μ M AMD-a uz razinu statističke značajnosti $P < 0,001$. Analizom varijance (ANOVA) utvrđena je statistički značajna razlika među srednjim vrijednostima triju skupina, a Post hoc Student-Newman-Keuls test potvrdio je značajno više vrijednosti u kontrolnoj skupini u odnosu na skupine tretirane koncentracijama od 40 μ M AMD i 20 μ M AMD. Studentov t-test između skupina tretiranih 40 μ M AMD i 20 μ M AMD pokazao je da nema statistički značajne razlike.

Tablica 1. Stanično preživljenje Huh7 stanica tretiranih različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata u odnosu na netretiranu kontrolu.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95% raspon pouzdanosti)	p*
Kontrola 40 μ M AMD	0,814 (0,233) 0,159 (0,035)	-0,655 (od-0,805 do -0,505)	<0,001
Kontrola 20 μ M AMD	0,814 (0,233) 0,271 (0,060)	-0,543 (od -0,694 do -0,392)	<0,001

*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.

4.2. GSH

Mjerenjem GSH određena je količina ROS-a nastalih kao posljedica djelovanja AMD-a. Dobivene su vrijednosti apsorbancije koje su proporcionalne količini GSH. Mjerna velična GSH je u nanomolima (nmol). Značajno su niže vrijednosti pri koncentracijama od 40 μ M AMD u odnosu na kontrolu (Studentov t-test, $P < 0,001$), kao i kod koncentracija 20 μ M AMD (Studentov t-test, $P = 0,001$) (Tablica 2).

Tablica 2. Količina GSH u Huh7 stanicama tretiranim različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata u odnosu na netretiranu kontrolu.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95% raspon pouzdanosti)	p*
Kontrola	0,063 (0,007)	-0,014	< 0,001
40 μ M AMD	0,050 (0,003)	(od -0,020 do -0,007)	
Kontrola	0,063 (0,007)	-0,013	< 0,001
20 μ M AMD	0,051 (0,003)	(od -0,019 do -0,006)	

* 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.

Primjenom Studentovog t-testa na dvjema tretiranim skupinama uočeno je da nema značajnih razlika između stanica tetiranih 40 μ M AMD i 20 μ M AMD (Tablica 3).

Tablica 3. Usporedba količine GSH u Huh7 stanicama tretiranim dvjema različitim koncentracijama AMD-a.

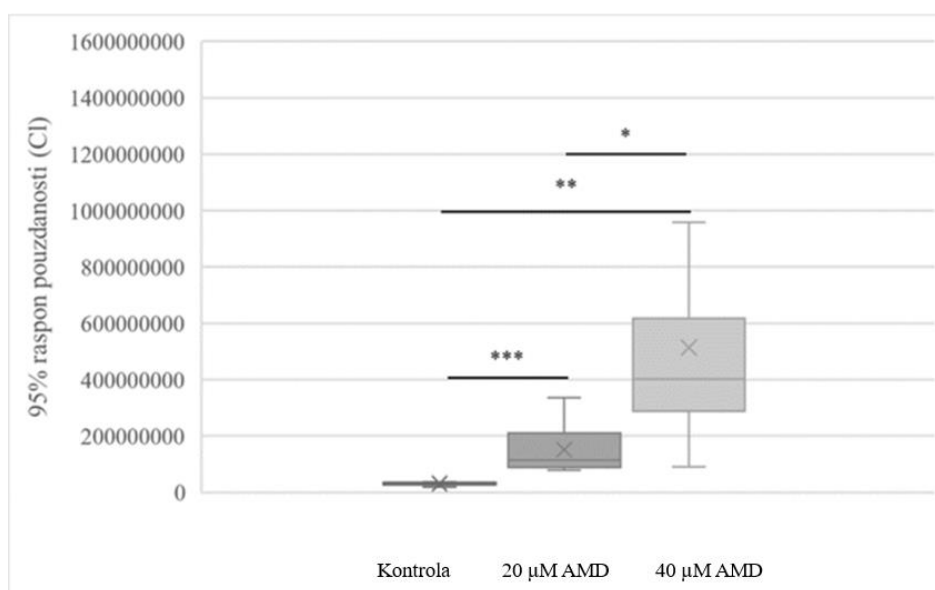
	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95% raspon pouzdanosti)	p*
40 μ M AMD	0,063 (0,007)	0,001	0,560
20 μ M AMD	0,050 (0,003)	(od -0,002 to 0,004)	

* Studentov T-test; P vrijednost = 0,560 nije smatrana statistički značajnom. Prikazani podaci reprezentativni su za najmanje tri neovisna eksperimenta. AMD = Amiodaron; SD = standardna devijacija.

4.3. Oil red O i DAPI

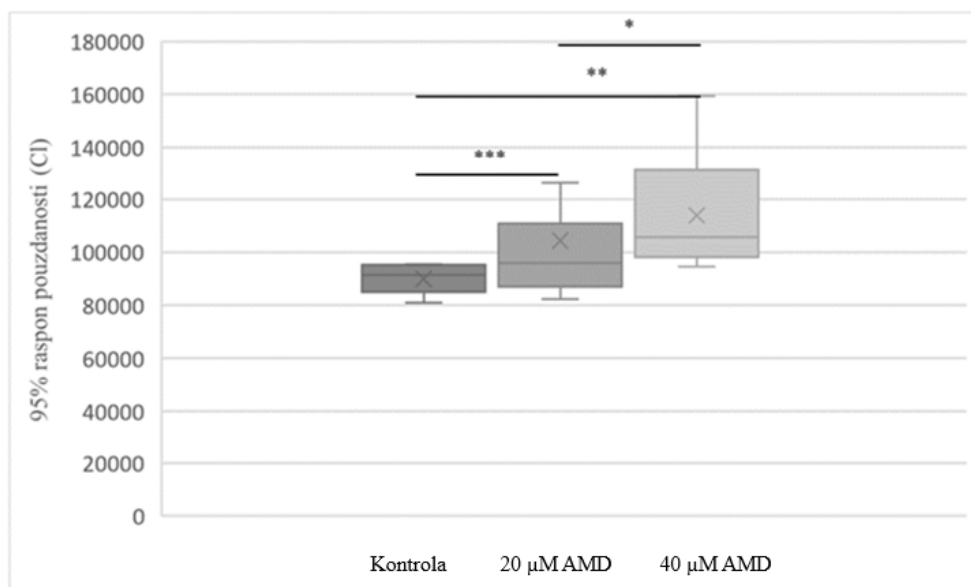
Određivanje triglicerida i lipida provedeno je primjenom ORO bojanja u kojem liposolubilna diazo boja oboji neutralne masti crvenom, a jezgre stanica plavom bojom. DAPI bojanje korišteno je za vizualizaciju staničnih jezgri. Preparati su promatrani svjetlosnim mikroskopom i mikrografirani fotoaparatom Olympus DP70 uz uvećanje 1:1000. Fotografije su obrađene i kvantificirane u računalnom programu Fiji (ImageJ2, GitHub).

Rezultat kvantifikacije su pozitivno korigirane vrijednosti integrirane gustoće podijeljene s brojem stanica. Intenzitet obojenja proporcionalan je količini masti. Vrijednosti su testirane Kruskal-Wallis testom i primijenjena je Bonferonijeva korekcija za broj skupina. Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u medijanima između skupina. Post hoc test pokazao je da je ova razlika u značajno nižim vrijednostima kontrolne skupine u odnosu na skupine tretirane 40 μM AMD i 20 μM AMD, dok između dviju tretiranih skupina nema statistički značajne razlike.

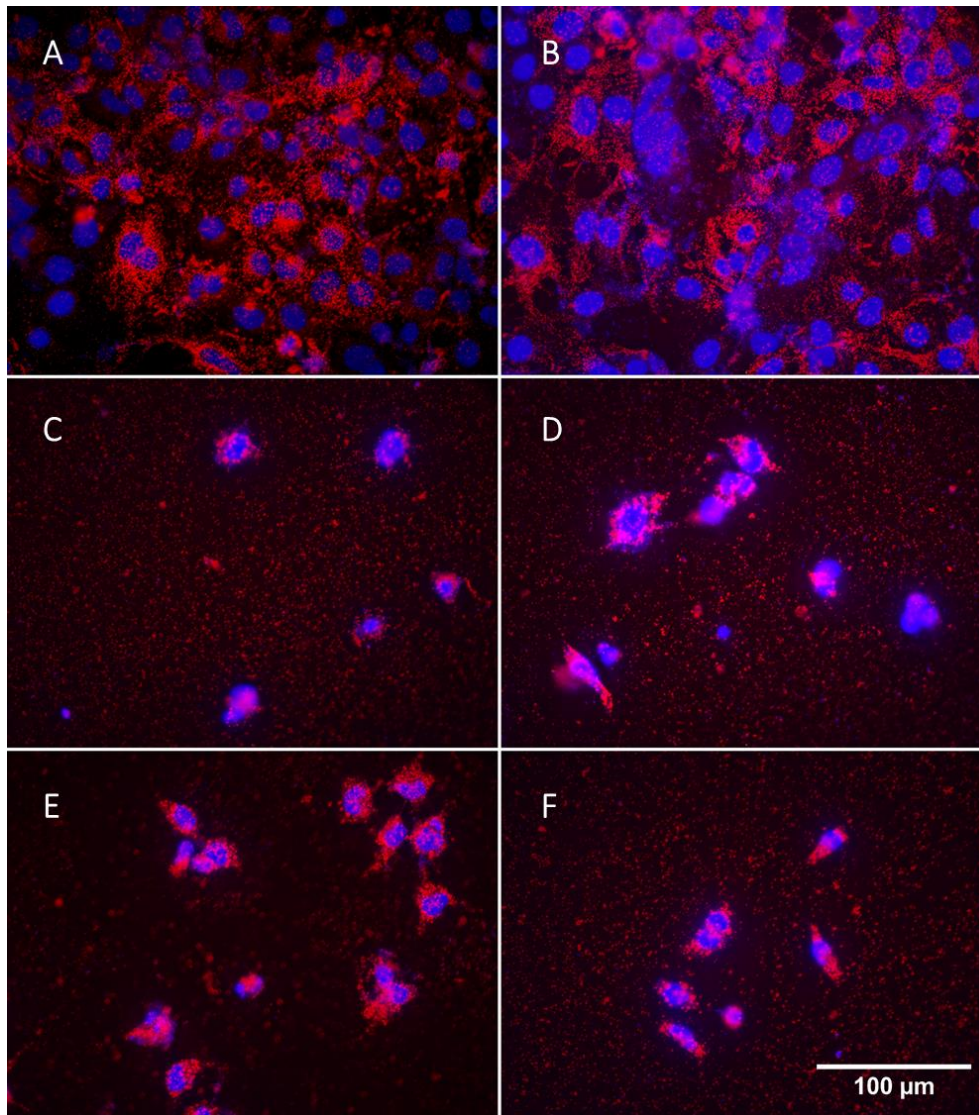


Slika 4. Grafički prikaz usporedbe integrirane gustoće obojenja ORO bojanjem između kontrolne skupine Huh7 stanica te skupina tretiranih 40 μM AMD i 20 μM AMD. Kruskal-Wallis test za jednake medijane, $H(\chi^2) = 22,89$, $H_c(\text{tie corrected}) = 22,89$, $p = 0,00001071$; Dunnov post HOC test s Bonferonijevom korekcijom za broj grupa grupa * $p = 0,181$, ** $p = 0,012$, *** $p < 0,001$.

Veličina masnih kapljica dobivena je analizom fotografija u računalnom Fiji (ImageJ2, GitHub). Rezultati su vrijednosti integrirane gustoće obojenja. Kruskal-Wallis testom utvrđeno je da postoji značajna razlika u medijanima između skupina. Post hoc test dokazao je značajno više vrijednosti u skupini tretiranoj 40 μM AMD u odnosu na kontrolu, dok između tretiranih skupina te kontrolne skupine i skupine tretirane 20 μM AMD nema statistički značajne razlike.



Slika 5. Razlika u integriranoj gustoći obojenja (aritmetička sredina i standardna devijacija) pojedinačne masne kapljice među različitim skupinama stanica obojanih ORO bojanjem. Kruskal-Wallis test za jednake medijane, $H(\chi^2) = 11,24$, $H_c(\text{tie corrected}) = 11,25$, $p = 0,004$; Dunnov post HOC test s Bonferonijevom korekcijom za broj grupa $*p = 0,281$, $**p = 0,281$, $***p < 0,001$.



Slika 6. Huh7 stanice obojane ORO i DAPI bojanjem. DAPI bojanje (plavo) vizualizira DNA, a ORO bojanje (crveno) masne kapljice. Za DAPI bojanje korišten je ZEISS filter set 01, a za ORO ZEISS filter set 09. Fotografije A i B prikazuju stanice kontrolne skupine, C i D su fotografije stanica tretiranih 40 μ M AMD, a fotografije E i F prikazuju stanice tretirane s 20 μ M AMD. Sliku je izradila autorica korištenjem Fiji (ImageJ2, GitHub) računalnog softwarea.

5. RASPRAVA

Ovim su istraživanjem uspoređene tri različite metode određivanja citotoksičnosti. Nizom eksperimenata određena je stanična vijabilnost Huh7 stanica, izmjerena je količina staničnog GSH te je ORO bojanjem vizualizirana promjena morfologije stanica tretiranih dvjema različitim koncentracijama amiodarona. Istraživanje je provedeno na Huh7 staničnoj liniji, a ustrojeno je kao randomizirani kontrolirani pokus „block dizajna“. Stanično preživljenje određeno je MTT metodom, a količina GSH izmjerena je kompletom za ispitivanje GSH. Analizirane su i uspoređene razlike izmjerenih vrijednosti kontrolne (netretirane) skupine stanica, stanica tretiranih koncentracijom od 40 μM AMD i stanica tretiranih 20 μM AMD za svaku provedenu metodu.

U našoj studiji, mjerenjem staničnog preživljenja MTT metodom utvrđene su statistički značajno manje vrijednosti u skupini stanica tretiranih koncentracijom od 40 μM AMD u odnosu na kontrolu. Vrijednosti izmjerene u skupini stanica tretiranih 20 μM AMD također su statistički značajno manje od vrijednosti kontrolne skupine. S pretpostavkom da je preživljenje u kontrolnoj (netretiranoj) skupini 100%, preživljenje stanica tretiranih 40 μM AMD iznosi 20,26%, a preživljenje stanica u skupini tretiranoj 20 μM AMD 34,8%. Iako razlika između dviju tretiranih skupina (40 μM AMD i 20 μM AMD) postoji, utvrđeno je da nije statistički značajna.

E. El Golli-Bennour i suradnici svojim su istraživanjem procijenili izravne učinke AMD-a na kulturama stanica jetre, epitela i bubrega. Stanično preživljenje ispitano je MTT metodom, a rezultati su pokazali da tretman AMD-om u koncentracijama od 20 do 180 μM uzrokuje značajno smanjenje staničnog preživljenja koje ovisi o dozi AMD (19).

Durukan i suradnici u svojem su istraživanju 2012. godine na L929 mišjoj staničnoj kulturi fibroblasta proveli ispitivanje citotoksičnosti AMD-a kako bi usporedili citoprotektivne učinke često korištenih antioksidansa. Preživljenje stanica mjereno je nakon 24-satne inkubacije MTT testom, zatim je uspoređen citoprotektivni učinak odabranih antioksidansa. Zaključili su da citotoksični učinak AMD-a do koncentracije od 80 μM nije doveo do značajnog smanjenja staničnog preživljenja. Citotoksični učinak utvrđen je kod koncentracije 100 μM i višim koncentracijama (20). Rezultati našeg istraživanja na Huh7 stanicama potvrdili su ovakav citotoksični učinak AMD-a ovisan o dozi.

Abičić je 2018. godine proveo istraživanje u kojem su jetrene (Huh7) stanice tretirane AMD-om i tamoksifenom u dvije koncentracije (5 i 10 μM). Nakon 24-satne inkubacije u tretiranim stanicama uočeno je povećanje broja i veličine lipidnih kapljica te o dozi ovisno smanjenje broja jetrenih stanica nakon tretiranja stanica s 5 i 10 μM AMD-a i tamoksifena (21). Ovakav lipogeni učinak i smanjeno stanično preživljenje u ovisnosti o dozi AMD-a potvrđen je i našim istraživanjem.

Visoke intramitohondrijske koncentracije AMD-a uzrokuju značajan oksidativni stres u stanicama. GSH metodom izmjeren je reducirani oblik staničnog glutaciona. Kontrolna (netretirana) skupina nije doživjela oksidativni stres uzrokovan AMD-om, stoga je pretpostavljen udio reduciranog staničnog glutaciona u kontrolnoj skupini 100%. U slučaju oksidativnog stresa, reducirani oblik glutaciona veže slobodne radikale i kao produkt nastaje GSSG. U skupini tretiranoj 40 μM AMD utvrđene su statistički značajno niže vrijednosti GSH u odnosu na kontrolnu skupinu. Stanice tretirane najvećom koncentracijom AMD-a imale su 79,00% reduciranog oblika GSH, što sugerira da je 21% reduciranog GSH utrošeno u obrani stanica od oksidativnog stresa. Stanice tretirane 20 μM AMD pokazale su nešto manji odgovor na oksidativni stres s 80,41% GSH. Ovo smanjenje količine GSH od nešto manje od 20% je statistički značajno u odnosu na kontrolu, ali između dviju tretiranih skupina nije utvrđena statistički značajna razlika.

Chakraborty i suradnici proveli su 2014. godine *in vivo* istraživanje na mužjacima štakora s ciljem ispitivanja oksidativnog stresa uzrokovanog AMD-om u organima osjetljivima na stres kao što su bubrezi, jetra, nadbubrežna žlijezda i testisi. Dokazano je povećanje lipidne peroksidacije, porast aktivnosti katalaze i superoksid dismutaze u jetri, bubrezima i testisima u tretiranoj skupini štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom (netretirani štakori). Ovo istraživanje dovelo je do zaključaka da izloženost AMD-u razvija stres za metabolizam te da dejodinizacija AMD-a dovodi do prekomjerne količine joda u cirkulaciji zbog čega se stvaraju ROS i slobodni radikali što rezultira staničnim oštećenjem organa osjetljivih na stres (22). Naše je istraživanje pokazalo statistički značajno povećanje odgovora na oksidativni stres u tretiranim skupinama u odnosu na kontrolnu, stoga se da zaključiti da izlaganje AMD-u uistinu izaziva značajan oksidativni stres.

Vitins i suradnici proveli su *in vivo* istraživanje na miševima s ciljem dokazivanja povezanosti AMD-a s pojavom jetrene steatoze. AMD je primijenjen u dozama: 0,2, 0,7, 2,2, 6,7, 20, 60 i 180 mg/kg tjelesne težine. Testiranje je provedeno nakon 1, 4 i 11 dana liječenja.

ispitivanjem markera steatoze kao što su kolesterol, trigliceridi i lipoproteini visoke gustoće (HDL – *engl. high-density lipoprotein*). Rezultati njihovog istraživanja pokazali su povećanje markera steatoze u jetri te smanjenje triglicerida u serumu osobito pri visokim koncentracijama AMD-a. Njihovim su istraživanjem dokazane brojne karakteristike steatoze uzrokovane AMD-om poput povećanja triglicerida u jetri, smanjenja triglicerida u serumu, povećanja kolesterola i HDL-a u serumu. ORO bojanjem jetrenih stanica miševa, dokazano je nakupljanje lipida tipično za mikrovezikularnu steatozu, najintenzivnije u centrolobularnoj regiji (23). Rezultati našeg istraživanja na Huh7 humanim jetrenim stanicama također upućuju na nakupljanje lipida i triglicerida u stanicama tretiranim AMD-om.

Akumulacija masnih kiselina uzokovana djelovanjem AMD-a vizualizirana je primjenom ORO bojanja. Intenzitet obojenja proporcionalan je zastupljenosti masnih kiselina u stanicama. ORO je liposolubilna diazo boja koja neutralne masti boja crvenom bojom. Intenzitet obojenja bio je značajno veći u objema tretiranim skupinama u odnosu na kontrolu. Iako postoji razlika intenziteta obojenja i između tretiranih skupina, ova razlika nije statistički značajna. Provedena je i analiza veličine masnih kapljica koja govori o njihovoj metaboličkoj dostupnosti, a time i sposobnosti stanica za oporavak od ovog štetnog učinka. Statistička analiza utvrdila je značajno krupnije masne kapljice u objema tretiranim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Najveće i metabolički najteže dostupne masne kapljice dokazane su u skupini stanica tretiranih najvećom koncentracijom AMD-a. Količina i raspodjela masnih kapljica u stanicama jasno je vidljiva i na fotografijama mikroskopskih preparata. DAPI bojanjem (plavo) vizualizirana je DNA, a ORO bojanjem (crveno) neutralne masti. U kontrolnoj skupini vidljive su brojne jezgre stanica s mnoštvom sitnih masnih kapljica rasipanih oko jezgara. U skupini stanica tretiranih 40 μ M AMD znatno je manje jezgara, što govori o malom preživljenju stanica ove skupine. Masne su kapljice u ovim stanicama akumulirane u krupnije agregate što znači da su i slabije metabolički dostupne. S. Sanoh i suradnici 2017. godine proveli su istraživanje na kimeričnim miševima s humaniziranom jetrom s ciljem predviđanja hepatotoksičnosti u ljudskom organizmu. Njihovo je istraživanje pokazalo 20% više razine fosfatidilkolina u humanim hepatocitima u usporedbi s kontrolnom skupinom te viši ukupni udio fosfolipida (24). S. Wandrer i suradnici, 2020. godine svojim su istraživanjem dokazali kako liječenje bolesnika s kroničnim zatajenjem srca AMD-om dovodi do apoptotske ozljede jetre. Pacijenti liječeni AMD-om imali su značajno više serumske razine keratina-18 razdvojenog kaspazom (biomarkera apoptoze) u usporedbi sa zdravim osobama ili pacijentima koji nisu primali AMD. Nadalje, u njihovom je istraživanju liječenje hepatocita AMD-om

rezultiralo apoptozom povezanom s nakupljanjem lipida i indukcijom stresa endoplazmatskog retikuluma (25).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Stanično preživljenje značajno je manje u skupinama stanica tretiranim 40 μ M AMD i 20 μ M AMD u odnosu na kontrolnu skupinu, dok između dviju tretiranih skupina nema statistički značajne razlike u preživljenju stanica.
2. Mjerenje količine GSH u Huh7 stanicama pokazalo je statistički značajno više vrijednosti u kontrolnoj skupini u odnosu na skupine tretirane 40 μ M AMD i 20 μ M AMD, dok između dviju tretiranih skupina nema statistički značajne razlike.
3. Analiza fotografija preparata Huh7 stanica obojanih ORO i DAPI bojanjem utvrdila je značajno jači intenzitet obojenja u objema tretiranim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu, što govori o većoj akumulaciji masti u stanicama tretiranih skupina.
4. ORO bojanje također je pokazalo da su masne kapljice najkrupnije u skupini tretiranoj 40 μ M AMD, što znači njihovu težu metaboličku dostupnost i time teži oporavak ovih stanica od AMD-om uzrokovane steatoze.

7. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Ciljevi ovog istraživanja bili su određivanje stanične vijabilnosti Huh7 stanica pri različitim koncentracijama amiodarona, mjerenje količine staničnog reduciranog glutationa (GSH) u Huh7 stanicama, vizualizacija promjene morfologije stanica tretiranih različitim koncentracijama amiodarona, te prikaz nastanka i distribucije lipidnih kapljica vizualiziranih "Oil red O" bojanjem.

USTROJ STUDIJE: Randomizirani kontrolirani pokus.

MATERIJAL I METODE: Istraživanje je provedeno na staničnoj kulturi Huh7 stanične linije. Randomizacija je postignuta blok dizajnom, a eksperimenti su ponovljeni tri puta. Stanice su nakon 48 sati rasta tretirane različitim koncentracijama amiodarona. Nakon 24 sata određene su stanična vijabilnost, proliferacija i nakupljanje lipida i neutralnih triglicerida.

REZULTATI: Stanično preživljenje značajno je manje u tretiranim skupinama stanica u odnosu na kontrolnu skupinu, ali između dviju tretiranih skupina nema statistički značajne razlike. Mjerenje količine staničnog reduciranog glutationa (GSH) u Huh7 stanicama pokazalo je statistički značajno više vrijednosti u kontrolnoj skupini u odnosu na skupine tretirane 40 μM AMD i 20 μM AMD, a između dviju tretiranih skupina nema statistički značajne razlike. Oil red O bojanje pokazalo je značajno više vrijednosti u količini masnih kapljica u tretiranim skupinama u odnosu na kontrolnu, te statistički značajno krupnije masne kapljice u skupini tretiranoj 40 μM AMD.

ZAKLJUČAK: Stanično preživljenje značajno je manje u skupinama stanica tretiranim 40 μM AMD i 20 μM AMD u odnosu na kontrolnu skupinu, dok između dviju tretiranih skupina nema statistički značajne razlike u preživljenju stanica. Značajno veći oksidativni stres pretrpile su tretirane skupine u odnosu na kontrolu. Tretirane su skupine imale i više masnih kapljica, a najkrupnije su bile u skupini stanica tretiranih 40 μM AMD.

KLJUČNE RIJEČI: citotoksičnost, Huh-7, amiodaron, MTT, GSH, Oil red O, DAPI, *in vitro*

8. SUMMARY

Comparison of different methods of testing the cytotoxicity of amiodarone in human liver cell line (Huh7)

OBJECTIVES: Objectives of this study were to determine cell viability of Huh7 cells at different concentrations of amiodarone, to measure the amount of cellular reduced glutathione (GSH) in Huh7 cells, as well as to visualize changes in morphology of cells treated with different concentrations of amiodarone using Oil red O staining.

STUDY STRUCTURE: Randomized controlled trial.

MATERIAL AND METHOD: The study was conducted on Huh7 cell line cell culture. Randomization was achieved by block design, and the experiments were repeated three times. Cells were treated with different concentrations of amiodarone after 48 hours of growth. After 24 hours, cell viability, proliferation and accumulation of lipids and neutral triglycerides were determined.

RESULTS: Cell survival was significantly lower in the treated cell groups compared to the control group, but there was no statistically significant difference between the two treated groups. Measurement of the amount of cellular reduced glutathione (GSH) in Huh7 cells showed statistically significantly higher values in the control group compared to the 40 μ M AMD and 20 μ M AMD treated groups, and there was no statistically significant difference between the two treated groups. Oil red O staining showed significantly higher values in the amounts of fat droplets in the treated groups compared to the control, and statistically significantly larger fat droplets in the group treated with 40 μ M AMD.

CONCLUSION: Cell viability is significantly lower in the cell groups treated with 40 μ M AMD and 20 μ M AMD compared to the control group, while there is no statistically significant difference in cell survival between the two treated groups.. Significantly higher oxidative stress was suffered by the treated groups compared to the control. The treated groups also had more fat droplets, and the largest were in the group of treated cells of 40 μ M AMD.

KEY WORDS: citotoxicity, Huh7, amiodarone, MTT, GSH, Oil red O staining, DAPI, in vitro

9. LITERATURA

1. PubChem. Amiodarone [Internet]. [citirano 28. lipanj 2021.].
Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2157>
2. Pollak PT. Oral Amiodarone: Historical Overview and Development. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1998;18(6P2):121S-126S.
3. Singh BN, Vaughan Williams EM. The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. *Br J Pharmacol*. 1970;39(4):657–67.
4. Rosenbaum MB, Chiale PA, Haedo A, Lázari JO, Elizari MV. Ten years of experience with amiodarone. *Am Heart J*. 1983;106(4 Pt 2):957–64.
5. Rosenbaum MB, Chiale PA, Ryba D, Elizari MV. Control of tachyarrhythmias associated with Wolff-Parkinson-White syndrome by amiodarone hydrochloride. *Am J Cardiol*. 1974;34(2):215–23.
6. Smith TW, Cain ME. Chapter 101 - Class III Antiarrhythmic Drugs: Amiodarone, Ibutilide, and Sotalol. In: Zipes DP, Jalife J, editors. *Cardiac Electrophysiology (Fourth Edition)* [Internet]. W.B. Saunders; 2004 [citirano 25. siječanj 2022.]. p. 932–41.
Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0721603238501044>
7. Tuset V, Jaatun HJ, Dickstein K. Amiodarone infusion in the treatment of acute atrial fibrillation or flutter: high versus low dose treatment. *Heart*. 2005;91(7):964–5.
8. Kochiadakis GE, Kanoupakis EM, Igoumenidis NE, Mavrakis HE, Kafarakis PK, Vardas PE. Efficacy and safety of oral amiodarone in controlling heart rate in patients with persistent atrial fibrillation who have undergone digitalisation. *Hellenic J Cardiol*. 2005;46(5):336–40.
9. Dowd FJ. Amiodarone☆. In: *Reference Module in Biomedical Sciences* [Internet]. Elsevier; 2015 [citirano 24. siječanj 2022.].
Dostupno na:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383078077>

10. Sloskey GE. Amiodarone: a unique antiarrhythmic agent. *Clin Pharm.* 1983;2(4):330–40.
11. Hubel E, Fishman S, Holopainen M, Käkälä R, Shaffer O, Houry I, et al. Repetitive amiodarone administration causes liver damage via adipose tissue ER stress-dependent lipolysis, leading to hepatotoxic free fatty acid accumulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2021;321(3):G298–307.
12. Nicolescu AC, Ji Y, Comeau JL, Hill BC, Takahashi T, Brien JF, et al. Direct mitochondrial dysfunction precedes reactive oxygen species production in amiodarone-induced toxicity in human peripheral lung epithelial HPL1A cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;227(3):370–9.
13. Di Matola T, D'Ascoli F, Fenzi G, Rossi G, Martino E, Bogazzi F, et al. Amiodarone Induces Cytochrome c Release and Apoptosis through an Iodine-Independent Mechanism¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2000;85(11):4323–30.
14. Wu Q, Ning B, Xuan J, Ren Z, Guo L, Bryant MS. The role of CYP 3A4 and 1A1 in amiodarone-induced hepatocellular toxicity. *Toxicol Lett.* 2016;253:55–62.
15. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Larramendy ML, Soloneski S, editors. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [Internet]. InTech; 2018 [citirano 18. svibanj 2022.].
Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages>
16. Redovniković IR, Bubalo MC, Srček VG, Radošević K. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *BIOTECHNOLOGY AND NUTRITION.* 2016;7.
17. HuH-7 Cell Line Origins and Characteristics - Huh-7 Cell Line Origins and Characteristics [Internet]. [citirano 28. lipanj 2021.].
Dostupno na: <https://huh7.com/>

18. Hemocytometer grid types • Hemocytometer [Internet]. Hemocytometer. 2021 [citirano 27. siječanj 2022.].
Dostupno na: <https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-grid-types/>
19. Golli-Bennour EE, Bouslimi A, Zouaoui O, Nourira S, Achour A, Bacha H. Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64(5):425–30.
20. Durukan AB, Erdem B, Durukan E, Sevim H, Karaduman T, Gurbuz HA, et al. May toxicity of amiodarone be prevented by antioxidants? A cell-culture study. *Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2012;7(1):61.
21. Abičić I. Osobitosti toksičnosti amiodarona i tamoksifena u modelu jetrenih (HuH7) stanica. 2018 [citirano 25. svibanj 2022.];
Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/1053346>
22. Chakraborty A, Mondal C, Sinha S, Mandal J, Chandra A. Amiodarone induced oxidative stress in stress - Vulnerable organs of adult male rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2014 Jan 1;7:177–83.
23. Vitins AP, Kienhuis AS, Speksnijder EN, Roodbergen M, Luijten M, van der Ven LTM. Mechanisms of amiodarone and valproic acid induced liver steatosis in mouse in vivo act as a template for other hepatotoxicity models. *Arch Toxicol.* 2014;88(8):1573–88.
24. Sanoh S, Yamachika Y, Tamura Y, Kotake Y, Yoshizane Y, Ishida Y, et al. Assessment of amiodarone-induced phospholipidosis in chimeric mice with a humanized liver. *J Toxicol Sci.* 2017;42(5):589–96.
25. Wandrer F, Frangež Ž, Liebig S, John K, Vondran F, Wedemeyer H, et al. Autophagy alleviates amiodarone-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol.* 2020;94(10):3527–39.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Marina Relatić, studentica 2. godine, Diplomskog sveučilišnog studija Medicinsko
laboratorijska dijagnostika

Datum i mjesto rođenja: 24. srpnja 1997., Virovitica

Kućna adresa: Banovačka 36, 33520 Slatina

Tel. +385 97 666-1327

E-mail: marina.relati1@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2004. – 2012. Osnovna škola Josipa Kozarca Slatina

2012. – 2016. Srednja škola Marka Marulića Slatina, opća gimnazija

2016. – 2019. Medicinski fakultet u Osijeku, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko
laboratorijska dijagnostika

2019. – 2022. Medicinski fakultet u Osijeku, Diplomski sveučilišni studij Medicinsko
laboratorijska dijagnostika