

# Osobitosti toksičnosti paracetamola na modelima jetrenih stanica ljudi i štakora

---

Nikolić, Josip

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:119155>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-29**



**ODJEL ZA  
BIOLOGIJU**  
Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Josip Nikolić

**Osobitosti toksičnosti paracetamola  
na modelima jetrenih stanica ljudi i štakora**

Završni rad

Osijek, 2019.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Završni rad**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za biologiju**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Biologija

## **OSOBITOSTI TOKSIČNOSTI PARACETAMOLA NA MODELIMA**

### **JETRENIH STANICA LJUDI I ŠTAKORA**

**Josip Nikolić**

**Rad je izrađen na:** Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku

**Mentor:** Dr.sc. Mirta Sudarić Bogojević, doc.

**Komentor:** Dr.sc. Martina Smolić, izv. prof.

#### **Kratak sažetak završnog rada:**

Paracetamol je lijek koji se koristi kao analgetik i antipiretik koji u preporučenim dozama nije štetan za organizam, a metabolizira se u jetri. U prekomjernim količinama je štetan zbog povećane koncentracije njegovog štetnog metabolita, NAPQI, čime se remeti elektron-transport lanac i povećava se produkcija reaktivnih kisikovih jedinki. U radu je provedeno istraživanje otpornosti dviju staničnih linija na povećane koncentracije paracetamola kroz različite vremenske periode: HTC (*Hepatoma tissue culture*), izolirane iz hepatokarcinoma štakora i Huh7, izolirane iz hepatokarcinoma čovjeka. Huh7 stanična linija pokazala je veću otpornost na toksičnost od HTC.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** paracetamol, hepatotoksičnost, HTC, Huh7

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju, te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Biology**

**Undergraduate university study programme in Biology**

**Scientific Area:** Natural sciences

**Scientific Field:** Biology

**CHARACTERISTICS OF PARACETAMOL TOXICITY IN  
HUMAN AND RAT HEPATIC CELL MODELS**

**Josip Nikolić**

**Thesis performed at:** Faculty of Medicine Osijek, Department of Pharmacology

**Supervisor:** Mirta Sudarić Bogojević, PhD, Asst. Prof.

**Cosupervisor:** Martina Smolić, PhD, Assoc. Prof.

**Short abstract:**

Paracetamol is an analgesic and antipyretic drug which is metabolized in the liver and it is not toxic in recommended doses. Overdose with paracetamol causes the formation of its reactive metabolite NAPQI which disrupts the electron transport and increases the production of reactive oxygen species. In this work, resistance to higher concentrations of paracetamols was observed between two cell lines through different periods of time: HTC (*Hepatoma tissue culture*), isolated from rat hepatoma and Huh7, isolated from human hepatoma. Huh7 has shown greater resistance to increased concentrations than HTC.

**Original in:** Croatian

**Key words:** paracetamol, hepatotoxicity, HTC, Huh7

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Thesis Repository of the National and University Library in Zagreb.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Mehanizam toksičnosti.....	2
1.1.1. Formiranje adukta i inicijacija oksidacijskog stresa.....	2
1.1.2. JNK kinaza i amplifikacija oksidacijskog stresa.....	3
1.1.3. Dinamika mitohondrija i autofagija.....	3
1.1.4. Nekroze uslijed predoziranja paracetamolom.....	4
1.2. Modeli jetrenih staničnih linija.....	5
1.3. Cilj rada.....	6
2. MATERIJALI I METODE.....	7
3. REZULTATI.....	8
4. RASPRAVA.....	19
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. LITERATURA.....	23

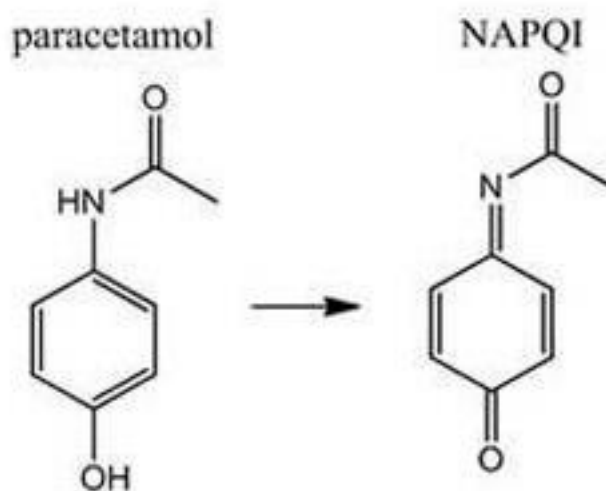
## 1. UVOD

Jetra je odgovorna za detoksifikaciju i eliminaciju potencijalno štetnih tvari (Van Summeren i sur. 2013). Budući da je glavni organ u kojemu se razgrađuju i detoksiciraju lijekovi i kemijski spojevi, ijetrogena (grč. *iatros* – liječnik) oštećenja su dosta česta. Smatra se da je u 10 % bolesnika u dobi do 40 godina sa slikom akutnoga hepatitisa zapravo riječ o oštećenju uzrokovanom lijekovima, što raste na 40% nakon 40. godine života. Toksička oštećenja nastaju zbog izravnog toksičnog djelovanja štetnog agensa, zbog stvaranja aktivnih toksičnih metabolita tijekom razgradnje u jetri ili je pak riječ o imunosno posredovanom oštećenju, pri čemu neki lijek ili njegov metabolit postaje haptent koji određene stanične proteine pretvara u neoantigene. S obzirom na to, razlikujemo predvidivo (ovisno o dozi) i nepredvidivo (neovisno o dozi) oštećenje (Damjanov 2011). Neovisno o dozi se još dijeli na alergijski (imunološki posredovano) i nealergijsko (neimunološki posredovano) (Kuna i sur. 2018). Kod predvidivog oštećenja uvijek se nalazi nekroza jetrenih stanica, oštećenje nastupa u kratko vrijeme nakon unošenja štetnog agensa u organizam, opseg oštećenja ovisi o količini agensa, a toksičnost se može reproducirati i u eksperimentalnim modelima. Ovoj skupini pripada paracetamol (acetaminofen, skraćeno APAP) te neki drugi lijekovi koji u terapijskim dozama ne izazivaju nekrozu. Nepredvidivo oštećenje nije ovisno o količini uzetog lijeka te kod ovog oštećenja obično postoji dulje razdoblje latencije između izloženosti lijeku i pojave simptoma, pa su zato takvi slučajevi velik dijagnostički problem. Primjer lijeka s nepredvidivim djelovanjem je anestetik halotan. Toksičko oštećenje obuhvaća najrazličitije morfološke promjene u jetri, odnosno, lijekovi mogu izazvati patološke promjene koje oponašaju bilo koju jetrenu bolest (Damjanov 2011). Paracetamol je široko korišten analgetik i antipiretik te u preporučenim dozama nije štetan. Ipak, prekomjerne doze dovode do zatajenja jetre kako kod životinja, tako i kod čovjeka (Kaplovitz 2005). Većina testova koji su trebali objasniti mehanizam toksičnosti paracetamola provedeni su na miševima, štakorima i hrčcima (Tee i sur. 1987; Masubuchi i sur. 2005; Reid i sur. 2005). Toksičnost paracetamola zasnovana je na njegovoj biotransformaciji pomoću enzimskog kompleksa citokrom P450 oksidaze u N-acetil-*p*-benzokinonimin (NAPQI). Pomoću glutation transferaze (GST) se detoksificira NAPQI konjugacijom sa glutationom (GSH). Međutim, u prekomjernim količinama paracetamola, GSH se troši te se NAPQI veže za proteine i u konačnici za samu DNA, što uzrokuje oksidacijski stres (Hinson i sur. 2004; Hinson i sur. 2010). Mitohondrij predstavlja središte

gdje se uključuju različiti signali odgovorni za inicijaciju smrti hepatocita, bilo da se radi o apoptozi, nekrozi ili autofagiji.

### 1.1. Mehanizam toksičnosti

Kao što je već navedeno, paracetamol u preporučenim dozama nije toksičan. Tipično je konjugiran sa glukuronskom kiselinom i sulfatom, koji su njegovi glavni metaboliti, a potom se izlučuju urinom. Manji dio paracetamola oskidira pomoću citokrom P450 sustava te nastaje reaktivni metabolit NAPQI. Pomoću GSH se sprječava negativan učinak NAPQI. Prekomjernim unosom paracetamola znatno se troši GSH te se NAPQI može vezati za proteine i DNA. Stopa oporavka GSH znatno utječe na ozljedu, jer indukcija glutamat-cistein ligaze koja je zaslužna za sintezu GSH predstavlja mehanizam uočen kod ženki miševa u svrhu obrane od ozljeda jetre uzrokovanih paracetamolom (Du i sur. 2014).



Slika 1. Strukturna sličnost između paracetamola i njegovog reaktivnog metabolita NAPQI (Web 1)

#### 1.1.1. Formiranje adukta i inicijacija oksidacijskog stresa

Iako su se mitohondriji smatrali važnim staničnim organelima zbog svoje uloge u sintezi ATP-a, danas je evidentno da su također uključeni u razne stanične signalizacije, uključujući staničnu smrt (Baines 2010). Specifične mete u mitohondriju kao što su alfa podjedinica ATP sintaze podliježu formiranju adukta. Također su detektirani paracetamol adukti na proteinima glicin amidinotransferaza, protein Parkinsonove bolesti 7 (PARK7) te peroksiredoksin 6 u kulturi hepatocita što upućuje da formiranje adukta nije pojava koja

uključuje sve mitohondrijske proteine već ima specifične proteine na koje se veže (Xie i sur. 2015). Formiranje adukata rezultira povećanom produkcijom superoksida, a time ugrožava i respiraciju. Važnost produkcije superoksida pokazuje činjenica da miševima sa manjkom enzima superoksid dismutaze (SOD2), koja ima ulogu u uklanjanju reaktivnih kisikovih jedinica, prekomjerna količina paracetamola uzrokuje veća oštećenja jetre (Ramachandran i sur. 2011). Veća količina superoksida bi omogućila reakciju sa dušikovim (II) oksidom (NO) čime bi nastao peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>). Peroksinitrit se može vezati za tirozinske ostatke proteina te time ugroziti njihovu funkciju.

### **1.1.2. JNK kinaza i amplifikacija oksidacijskog stresa**

Formiranje paracetamol-protein adukta inicira oksidacijski stres, no sam ovaj događaj je nedovoljan da bi uzrokovao staničnu smrt. Uočeno je da je potrebna aktivacija JNK kinaze za taj proces. JNK se aktivira neposredno nakon unosa prekomjerne količine paracetamola i ostaje aktivna tijekom signalne kaskade koja inducira staničnu smrt (Hanawa i sur. 2008). Aktivacija i fosforilacija se odvijaju u citosolu, a zatim se takva JNK translocira u mitohondrij gdje se veže za Sab protein na vanjskoj strani membrane mitohondrija. Ovakvo vezanje uzrokuje inhibiciju p-Src na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani, čime se zaustavlja transport elektrona i stvaraju reaktivne kisikove jedinice (engl. ROS-*Reactive Oxygen Species*). ROS u konačnici povećavaju oksidacijski stres (Saito i sur. 2010).

### **1.1.3. Dinamika mitohondrija i autofagija**

Mitohondriji su dinamični organeli koji prolaze kroz morfološke promjene u procesima mitohondrijske fuzije i fisije. Ovi procesi nužni su za homeostazu i bioenergetiku mitohondrija (Silva Ramos i sur. 2016). Fuzija i fisija regulirani su GTPaznim proteinima kao OPA1 (engl. *Optic atrophy 1*), Mfn 1/2 (mitofuzin 1/2) i Drp1 (engl. *Dynamin related protein 1*). OPA 1 i Mfn 1/2 potiču mitohondrijsku fuziju, a Drp1 fisiju kod sisavaca (Zhao i sur. 2013). Utjecaj prevelike doze paracetamola na dinamiku mitohondrija prvi put je uočen kada je primijećen znatan rast Drp1 te njegova translokacija do mitohondrija nakon predoziranja paracetamolom (Ramachandran i sur. 2013). Promatrane su i interakcije između Bax i Drp1. Kako se oba translociraju do mitohondrija nakon predoziranja paracetamolom, pretpostavlja se da upravo ta translokacija olakšava fisiju, što inicira



otvaranje MPTP (engl. *mitochondrial permeability transition pore*) (Ramachandran i Jaeschke 2017).

Uklanjanje oštećenog mitohondrija autofagijom usporava ozljede inducirane paracetamolom. Za indukciju autofagije nakon predoziranja paracetamolom potrebna je translokacija Parkina, koji je E3 ubikvitin ligaza. Njegov *knockdown* pojačava ozljedu jetre, dok delecija Parkina čini životinje otpornima na paracetamol, vjerojatno zbog kompenzacije i stvaranja adaptivnog mehanizma (Williams i sur. 2015). Delecija autofagnog gena *Atg5* vodi do kronične ozljede, regeneracije i upale što je još jedan primjer zaštite od paracetamola. Mehanizam je zasnovan na stalno aktivnom Nrf2 sa velikom produkcijom GSH i povećanom proliferacijom hepatocita (Ni i sur. 2012). Ovi mehanizmi pokazuju značaj autofagije tijekom ozljede jetre (Ramachandran i Jaeschke 2017).

#### **1.1.4. Nekroze uslijed predoziranja paracetamolom**

Djelovanjem paracetamola proteini se otpuštaju iz međumembranskog prostora mitohondrija. Citokrom c je jedan od takvih, a uključen je u proces apoptoze. Međutim, iako se citokrom c otpušta, kaspaze se ne aktiviraju. Istraživanja su pokazala da postoje molekule koje određuju način stanične smrti. Stanica ulazi u staničnu smrt u kontroliranim uvjetima, a sam proces nazvan je reguliranom nekrozom. Nekroptoza, oblik regulirane nekroze, aktivira se pomoću TNF 1 receptora (engl. *Tumor necrosis factor receptor 1*) što vodi do sklapanja kompleksa: nekrosoma (Vandenabeele i sur. 2010). Nekrosom se sastoji od dvaju receptor-djelujućih kinaza, RIP1 i RIP3 te od MLKL proteina (engl. *mixed lineage kinase domain-like protein*). Signal koji prolazi kroz specifične domene RIP1 i RIP3 aktivira dodatne RIP3 molekule te se time pojačava. Smatra se da je RIP3 oligomerizacija minimum potreban za poticanje nastanka nekrosoma. RIP3 tako predstavlja svojevrsan prekidač između nekroze i apoptoze. Aktivirani RIP3 veže MLKL i fosforilira ga. Takav MLKL putuje prema dijelovima bogatima fosfolipidom gdje djeluje na sami integritet membrane i uzrokuje nekrotičnu staničnu smrt (Zhang i sur. 2016). Povećana koncentracija RIP3 uočena je nakon predoziranja paracetamolom, a njegova genetička delecija je usporila staničnu smrt (Ramachandran i sur. 2013). Kod ozljede jetre uzrokovane paracetamolom, blokada RIP1 ili RIP3 djelovala je obrambeno. Izrađen je visoko selektivni RIP3 inhibitor koji je uspješno djelovao na tretman paracetamolom na ljudskim hepatocitima *in vitro* te na *in vivo* mišjem modelu (Li i sur. 2014). Dokazano je da su reaktivne kisikove jedinice, kao glavne molekule

u paracetamol signalnoj kaskadi, uključene u RIP3-induciranu nekroptozu u kardiomiocitima (Zhang i sur. 2016).

## 1.2. Modeli jetrenih staničnih linija

Postoji više modela za praćenje mehanizama bolesti jetre uzrokovane lijekovima (engl. *DILI-drug induced liver injury*): primarne kulture ljudskih hepatocita, stanične linije dobivene iz karcinoma jetre, inženjerstvom jetrenog tkiva, ljudske pluripotentne stanice te životinjski modeli.

Primarne kulture hepatocita smatraju se zlatnim standardom za istraživanja jetre. Također, daju značajne i predvidive rezultate u farmakološkim i toksikološkim *in vitro* istraživanjima. Hepatociti su diferencirane stanice koji ispoljavaju mnoge jetrene funkcije te zadržavaju ekspresiju enzima faze 1 i faze 2 određeni vremenski period. Testovima provedenim na ovakvim staničnim linijama moguće je otkriti sam mehanizam DILI-a (Kuna i sur. 2018). Mnogi lijekovi koji uzrokuju teški DILI uzrokuju povećanu produkciju ROS, što je indikacija oksidacijskog stresa.

Prednosti staničnih linija dobivenih iz jetrenih karcinoma uključuju dostupnost, jednostavno rukovanje te neograničen potencijal rasta. Ograničenost linija kao što su HepG2, Hep3B ili Huh7 je ta što su lišene nekih osnovnih funkcija normalnog hepatocita, poglavito kapaciteta biotransformacije. Brojna istraživanja pokazala su da je ekspresija enzima faze 1 i 2 kod HepaRG stanica gotovo ista kao kod primarne kulture hepatocita. Ipak, ekspresija enzima citokrom P450 sustava kod HepaRG je znatno niža u odnosu na primarne hepatocite. Diferencijacija se može i poboljšati ako se tretiraju sa 2%tnim dimetil sulfoksidom (DMSO). HepaRG se pokazala dobrim alatom za ispitivanje kroničnih efekata lijekova *in vitro*. Još uvijek se rade istraživanja koja se bave njihovom pogodnošću za detekciju djelovanja lijekova kojima je potrebna aktivacija preko citokrom P450 sustava (Vlach i sur. 2019). HepaRG stanice slično su reagirali na tretman paracetamolom kao i primarni hepatociti.

Ljudske pluripotentne stanice se prema skorijim istraživanjima smatraju više predvidivim u odnosu na ostale modele. Stanična linija hiPSC (engl. *human induced pluripotent stem cell*) ima fenotip sličan primarnim hepatocitima, što ju čini pogodnom za istraživanje hepatotoksičnosti te potencijalno boljim kandidatom od životinjskih modela i staničnih linija

dobivenih iz jetrenih karcinoma. Stanična linija hESC (engl. *human embryonic stem cell*) je još uvijek neuspješna u smislu diferencijacije do metabolički sposobnog hepatocita pa se izbjegava korištenje ove linije do standardiziranja protokola.

Životinjski modeli se često koriste za proučavanje patogeneze jetre te su prilikom prekliničkih ispitivanja još uvijek neizostavan dio. Najčešće se koriste glodavci jer imaju sličnu fiziologiju kao i ljudi (Bhakuni i sur. 2015) čime se lakše dobiva uvid u hepatotoksičnost. Potreba za testiranjem na životinjama javlja se iz razloga što stanične linije ne funkcioniraju identično kao i sama jetra, primjerice, nemaju svoj imunološki sustav koji ima važnu ulogu u razvijanju DILI-a (Kuna i sur. 2018). Pored glodavaca (prvenstveno miševa i štakora), testiralo se i na psima, svinjama i majmunima. Sličnost hepatotoksičnosti između vrsta ogleda se u brzini formiranja štetnog metabolita NAPQI. Alanin aminotransferaza (ALT) je biomarker čija se povećana količina prilikom predoziranja paracetamolom kod čovjeka primjećuje 12 sati nakon trovanja, dok se kod glodavaca povećane količine u serumu vide nakon 4 do 6 sati. Makaki rakojed (*Macaca fascicularis* Raffles, 1821) smatra se vrijednim životinjskim modelom jer je od dosadašnjih korištenih srodstveno najbliži čovjeku, a pokazuje i sličnosti u enzimima zaduženim za metaboliziranje lijekova.

### 1.3. Cilj rada

Cilj rada ovog istraživanja je bio:

1. Odrediti postotak preživljenja (vijabilnosti) HTC i Huh7 stanica pri različitim koncentracijama i različitom vremenskom periodu izloženosti paracetamolu.
2. Metodom mikrofotografiranja prikazati morfološke promjene HTC i Huh7 stanica nakon izloženosti prekomjernoj koncentraciji paracetamola.

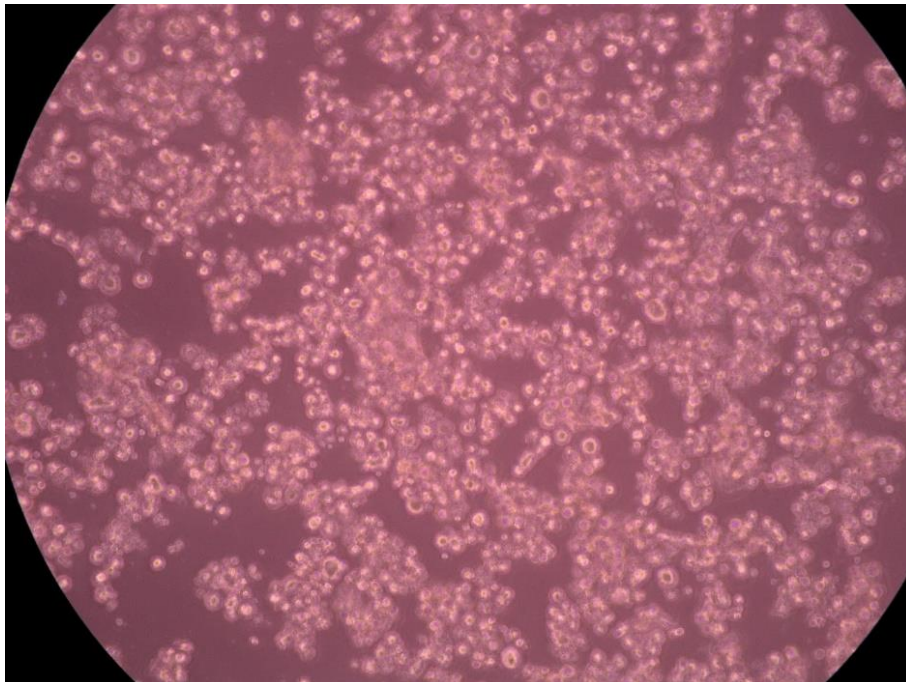
## 2. MATERIJALI I METODE

Korištene stanične linije su HTC (engl. *Hepatoma tissue culture*) i Huh7 (izolirane iz hepatokarcinoma čovjeka). Prije samog provođenja eksperimenta, stanice se nasade u Petrijevim zdjelicama koje sadržavaju 10 ml DMEM hranjivog medija sa L-glutaminom (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka) i FBS-om (Thermo Fisher Ebsdorfergrund, Hessen, Njemačka). Nakon nasađivanja, stanice se inkubiraju na 37 °C sa 5% CO<sub>2</sub>. Pomoću mikroskopa promatra se konfluentnost stanica, gdje se mrtve stanice razlikuju od živih tako što plutaju u mediju. Sa stanicama se nastavlja rad kada postignu oko 85-90% konfluentnosti. Da bi stanice što dulje mogle opstati u kulturi, koristi se metoda „*cell splitting*“ ili „*passaging*“ (omjer 1:2) pri čemu se hranjivi medij vadi iz kulture te se istoj dodaje 5 ml Trypsin/EDTA (PAN-Biotech, Aidembach, Bavaria, Njemačka). Tripsinizacija je važan korak jer pomaže u odvajanju stanica od same podloge. Tripsinizirane stanice se inkubiraju na 5 min, nakon čega se sadržaj iz Petrijeve zdjelice (tripsin i stanice) pipetira u Falcon tubu u kojoj se nalazi 5 ml svježeg medija te se resuspendira. Centrifugiranjem stanica 7 min na 2000 rpm odvaja se tripsin kao supernatant. Zdrave stanice se nasađuju na *24-well plate*, 2x10<sup>5</sup> stanica po jažici. Stanice se tretiraju sa različitim koncentracijama paracetamola (Acros Organics, New Jersey, SAD) 24 h nakon nasađivanja. Prilikom tretmana paracetamolom na *24-well plate* dodaje se medij bez faktora rasta. Brojanje stanica vrši se 2 h nakon tretmana paracetamolom i nakon 24 h. Tretman koncentracijama traje 24 h. Korištene koncentracije paracetamola su 5 mM, 10 mM i 20 mM. Stanice se u *24-well plate* nasađuju u duplikatima uz kontrolnu skupinu, tj, ona koja se ne tretira sa paracetamolom. Brojanje stanica u ovom radu rađeno je pomoću hemocitometra, a korišteno bojilo je tripansko plavilo, Trypan blue (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). 10 µl smjese stanica i bojila se nanose na hemocitometar. Žive stanice razlikuju se od mrtvih pod mikroskopom jer su bijele boje, dok su mrtve plavo obojene zbog bojila koje prodire kroz njihove membrane. Hemocitometrom su brojane stanice u četiri kvadranta, dok se u središnjem kvadrantu nisu brojale. Osim mikroskopiranja, cjelokupan postupak izvođen je u laminaru.

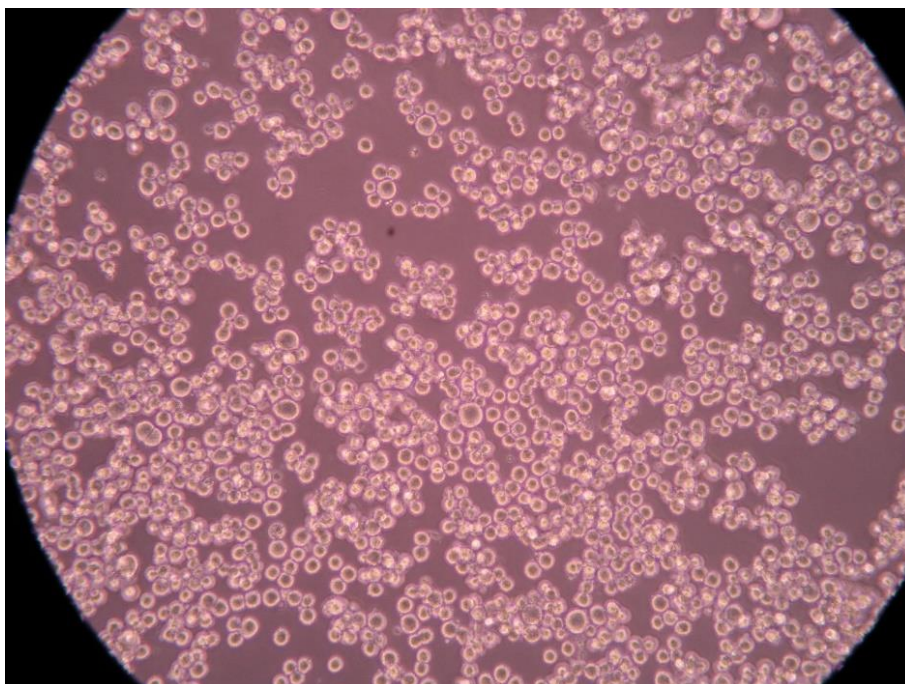
### 3. REZULTATI

Istraživanje je provedeno u lipnju 2019. godine na Zavodu za farmakologiju, Medicinskog fakulteta u Osijeku. Uzorci su rađeni u duplikatima. HTC i Huh7 stanice tretirane su sa koncentracijama paracetamola od 0 mM, 5 mM, 10 mM i 20 mM. Praćena je djelotvornost kroz različite vremenske periode, nakon 2 i 24 h. Stanice su pokazale ovisnost vijabilnosti o vremenu izlaganja toksikantu. Tretiranjem stanica različitim koncentracijama paracetamola uočeno je smanjenje brojnosti stanica. Što je korištena veća koncentracija, to je brojnost stanica bila manja. Primjećuje se da su HTC stanice više osjetljive od Huh7 stanica. Također, brojnost se i kod jednih i kod drugih razlikuje nakon 2 i 24 h, točnije, djelotvornost paracetamola bolje se očituje nakon 24 h.

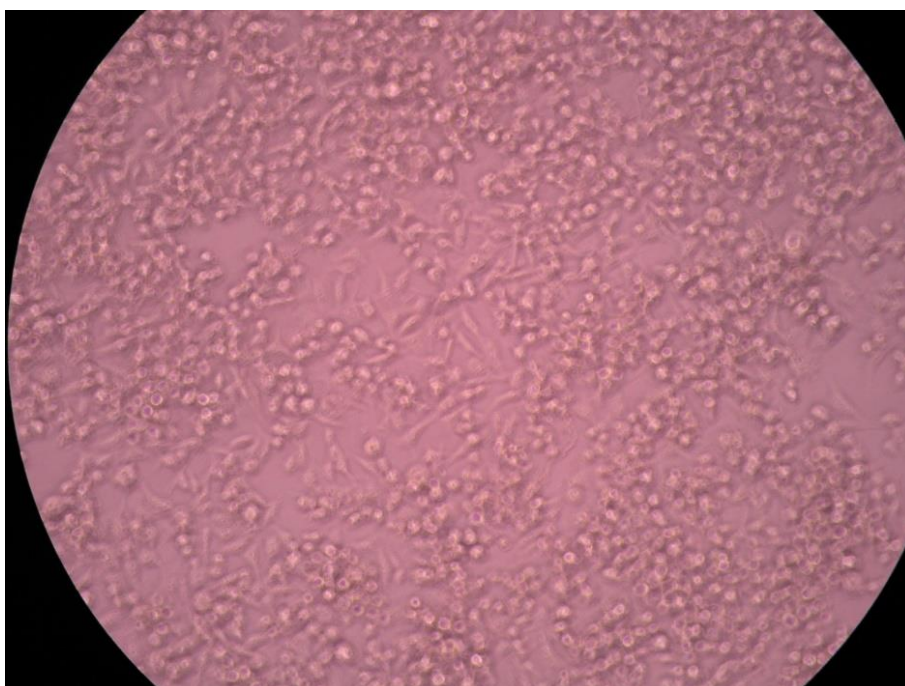
Uočava se manja razlika u brojnosti HTC stanica u kontrolnom uzorku, uzorku tretiranom s 5 mM paracetamola nakon 2 h te uzorku tretiranom s 10 mM paracetamola nakon 2 h (Slike 2, 3 i 4).



Slika 2: HTC stanična kultura, kontrola (2 h) (foto: J. Nikolić)

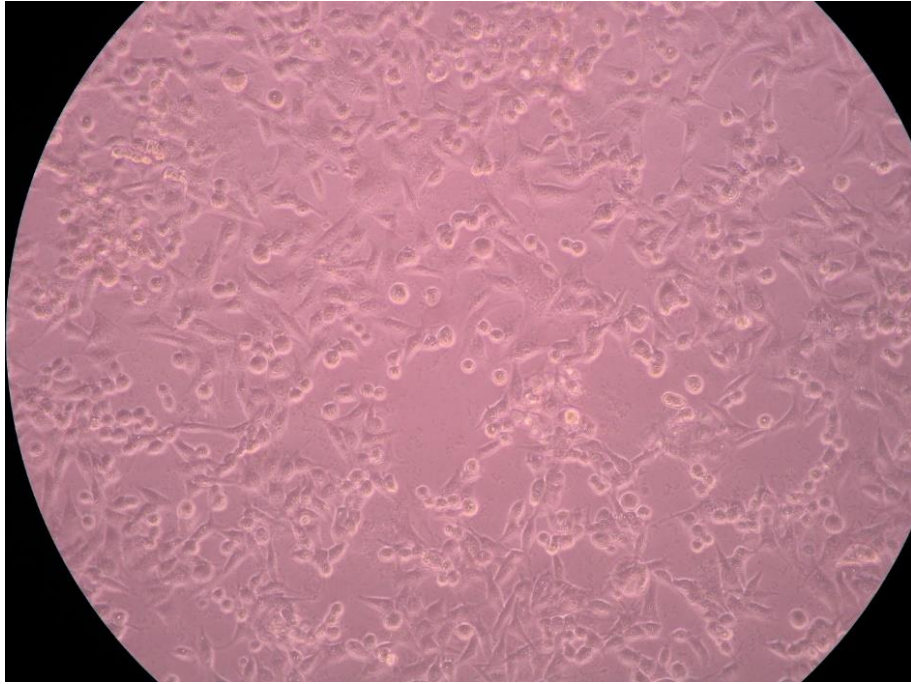


Slika 3: HTC stanična kultura, 5 mM APAP (2 h) (foto: J. Nikolić)



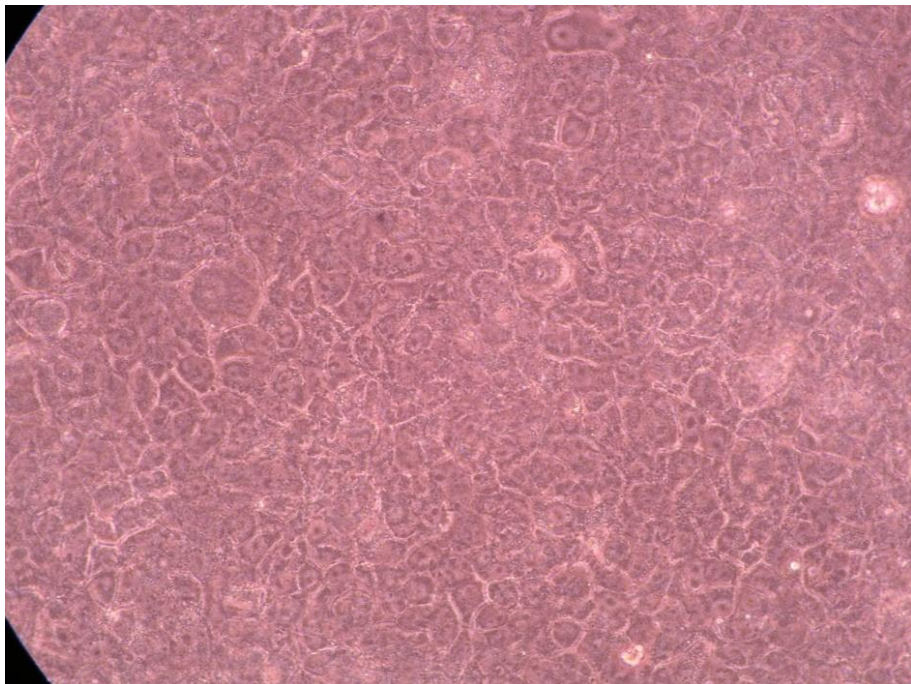
Slika 4: HTC stanična kultura, 10 mM APAP (2 h) (foto: J. Nikolić)

S koncentracijom od 20 mM paracetamola nakon 2 h uočava se smanjenje brojnosti stanica, vijabilnost 45-50 % (Slika 5).

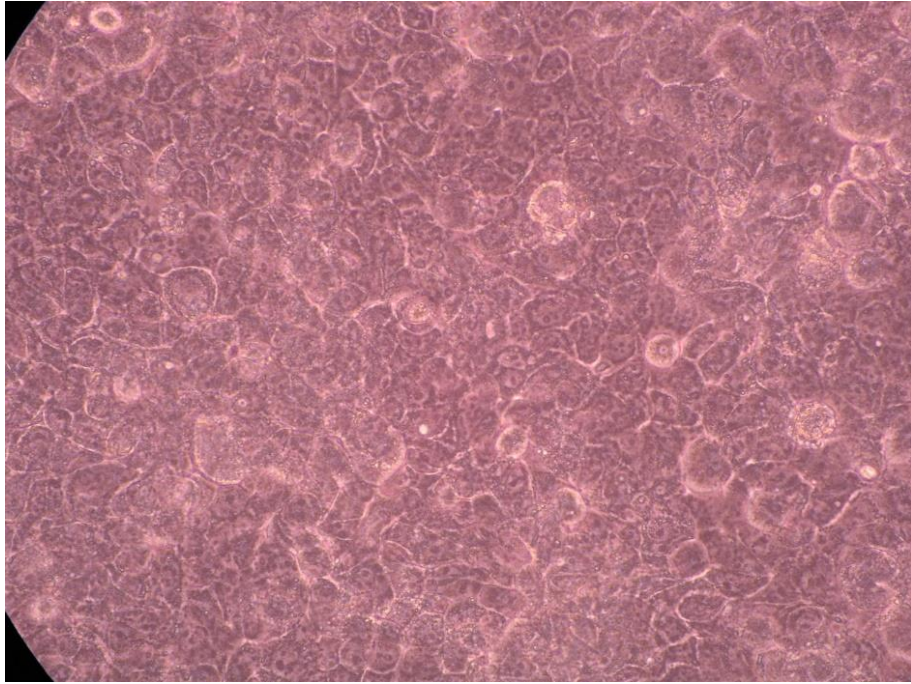


Slika 5: HTC stanična kultura, 20 mM APAP (2 h) (foto: J. Nikolić)

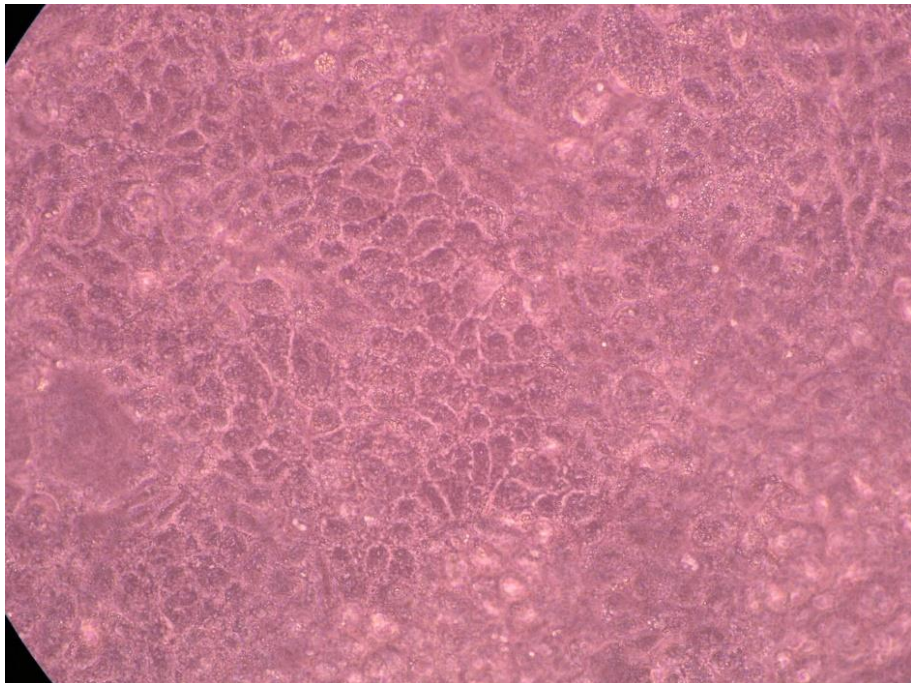
Kod Huh7 stanica nije uočena veća toksičnost 2 h nakon tretmana u uzorcima s koncentracijama paracetamola od 5 mM i 10 mM, gdje su vijabilnosti oko 90 % (Slike 6, 7 i 8).



Slika 6: Huh7 stanična kultura, kontrola (2 h) (foto: J. Nikolić)



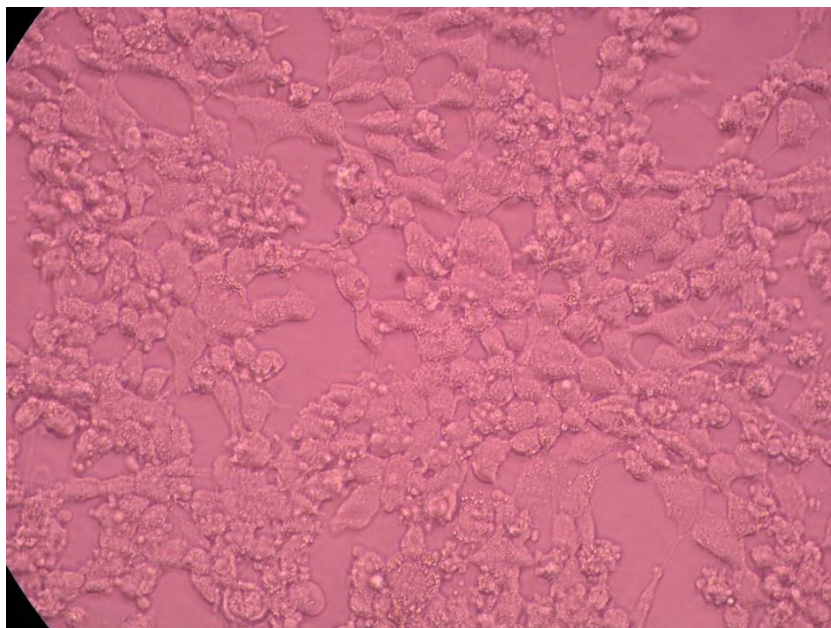
Slika 7: Huh7 stanična kultura, 5 mM APAP (2 h) (foto: J. Nikolić)



Slika 8: Huh7 stanična kultura, 10 mM APAP (2 h) (foto: J. Nikolić)

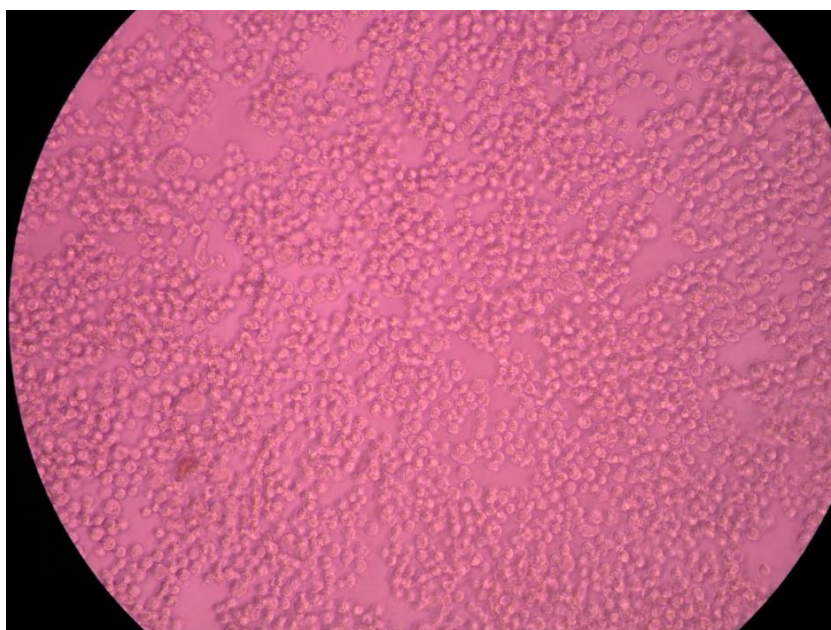


Manji broj stanica se primjećuje u uzorku tretiranom s 20 mM paracetamola (vijabilnost 55-60 %) (Slika 9).

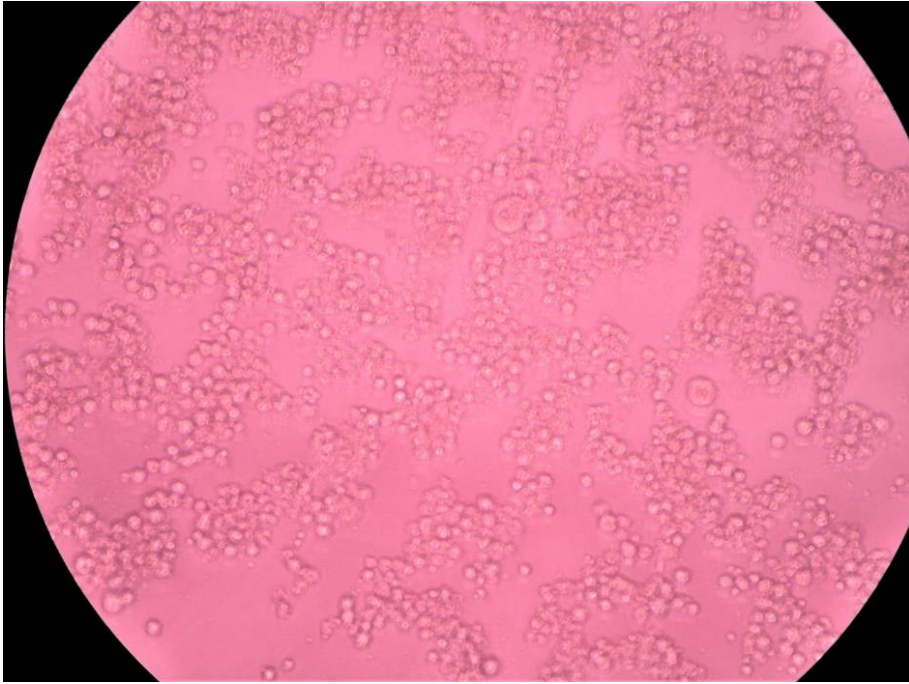


Slika 9: Huh7 stanična kultura, 20 mM APAP (2 h) (foto: J. Nikolić)

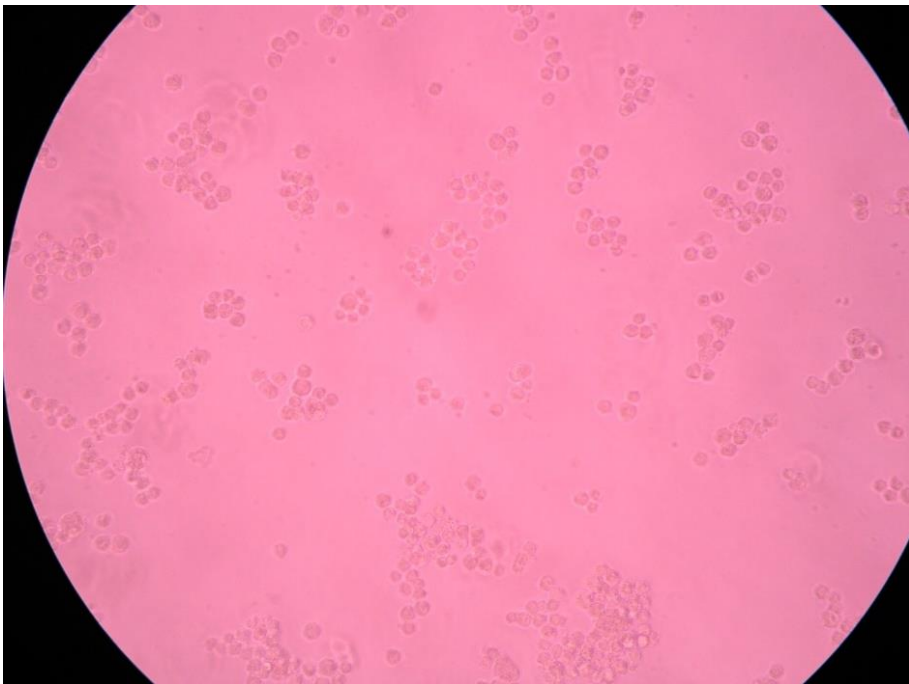
Nakon 24 h, kod HTC linije je primjetna razlika u smanjenju broja stanica idući ka većim koncentracijama paracetamola (Slika 10). Vijabilnost uzorka s 5 mM paracetamola (Slika 11) je oko 55 %, uzorka s 10 mM paracetamola (Slika 12) oko 30 %, i uzorka s 20 mM paracetamola (Slika 13) oko 15 %.



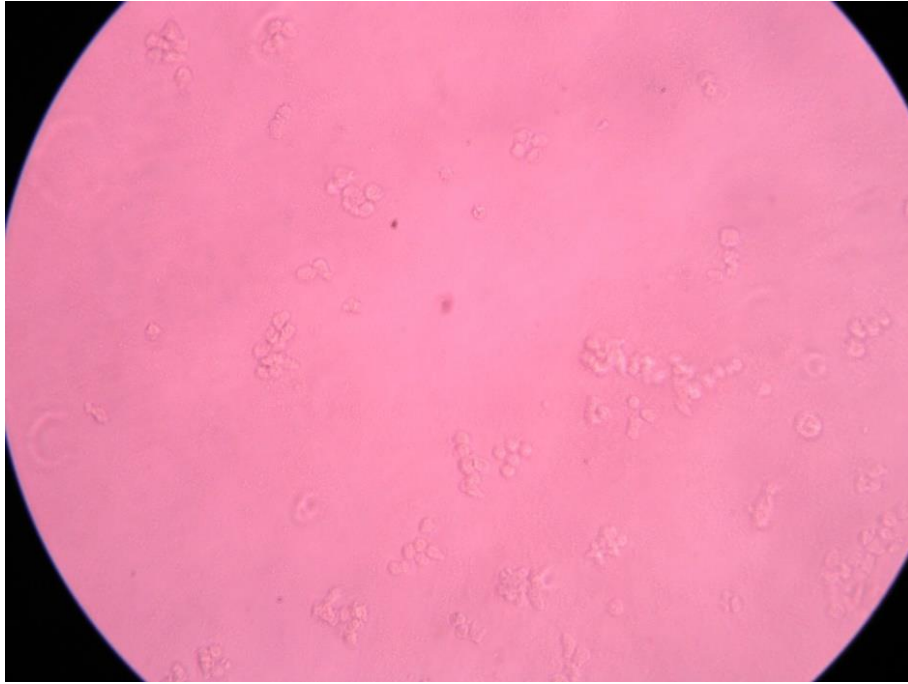
Slika 10: HTC stanična kultura, kontrola (24 h) (foto: J. Nikolić)



Slika 11: HTC stanična kultura, 5 mM APAP (24 h) (foto: J. Nikolić)

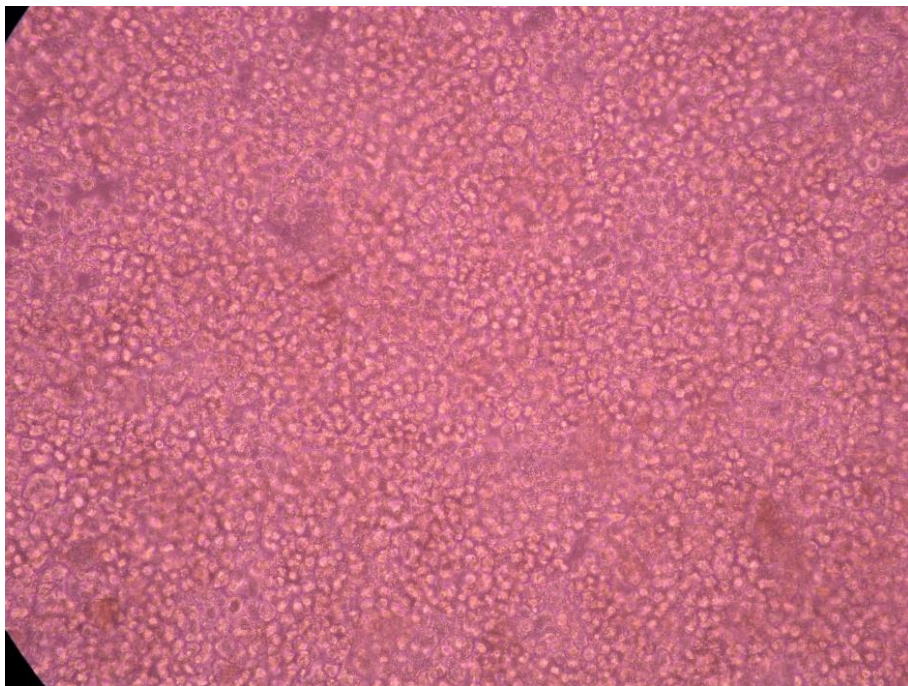


Slika 12: HTC stanična kultura, 10 mM APAP (24 h) (foto: J. Nikolić)

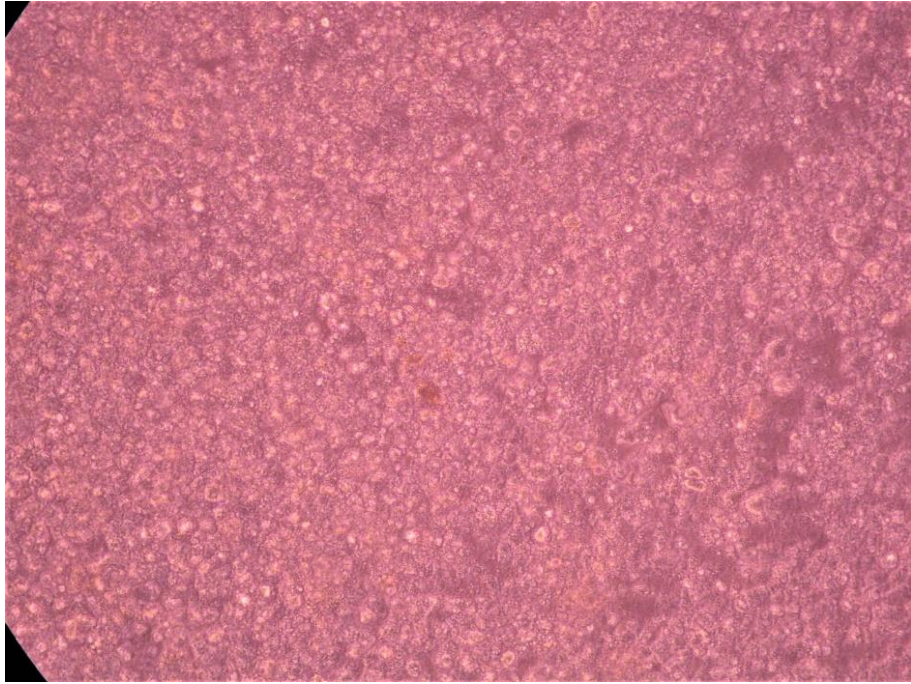


Slika 13: HTC stanična kultura, 20 mM APAP (24 h) (foto: J. Nikolić)

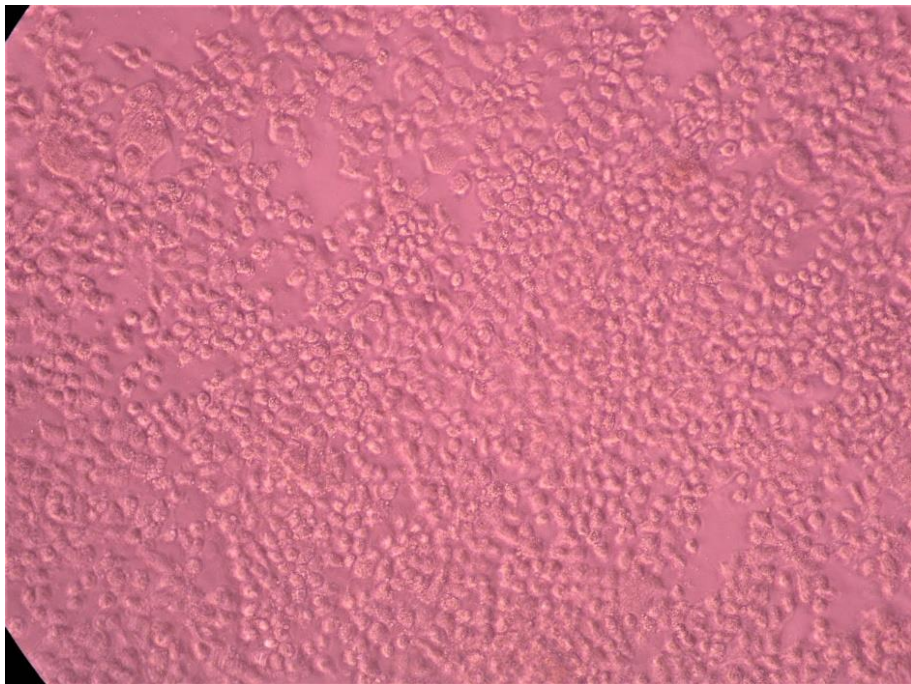
Huh7 stanice i nakon 24 h pokazuju veću otpornost od HTC (Slika 14), te je znatnija promjena brojnosti tek s tretmanom od 20 mM paracetamola, gdje je vijabilnost oko 45 % (Slika 17), dok s manjim koncentracijama nema uočljivijih promjena, s vijabilnosti oko 90 % za 5 mM i 83 % za 10 mM (Slika 15 i 16).



Slika 14: Huh7 stanična kultura, kontrola (24 h) (foto: J. Nikolić)



Slika 15: Huh7 stanična kultura, 5 mM APAP (24 h) (foto: J. Nikolić)

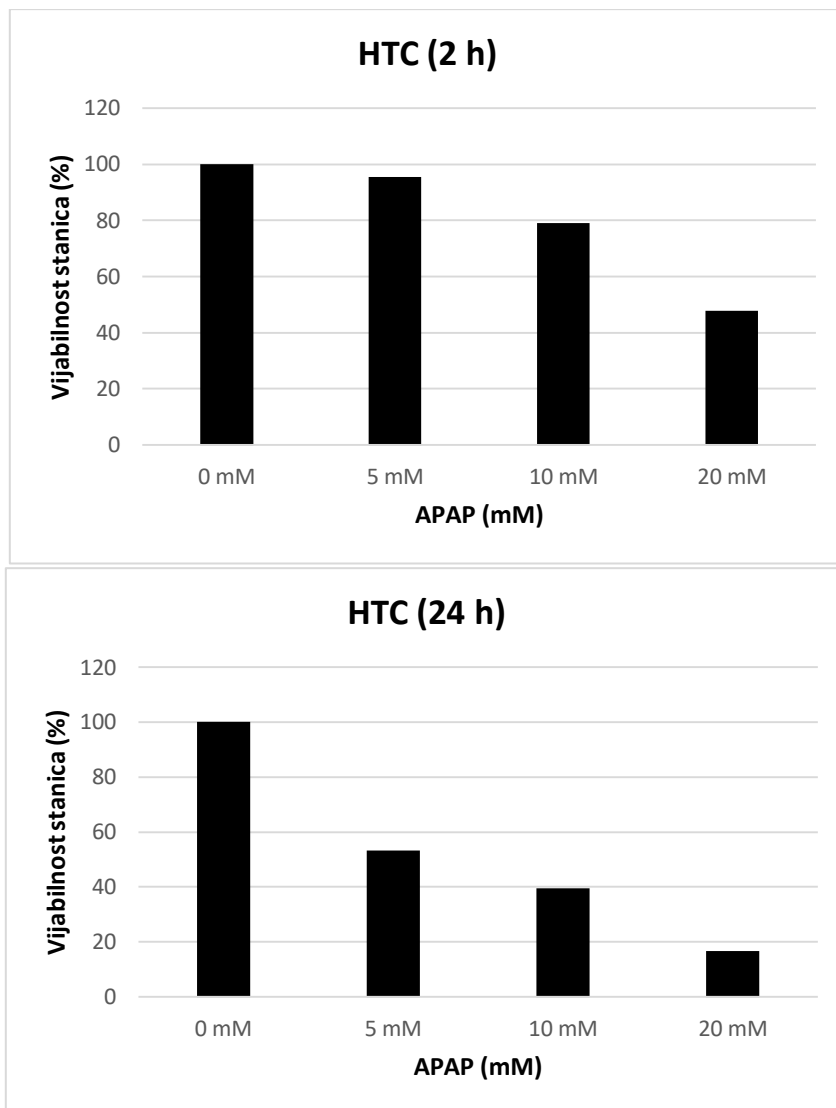


Slika 16: Huh7 stanična kultura, 10 mM APAP (24 h) (foto: J. Nikolić)

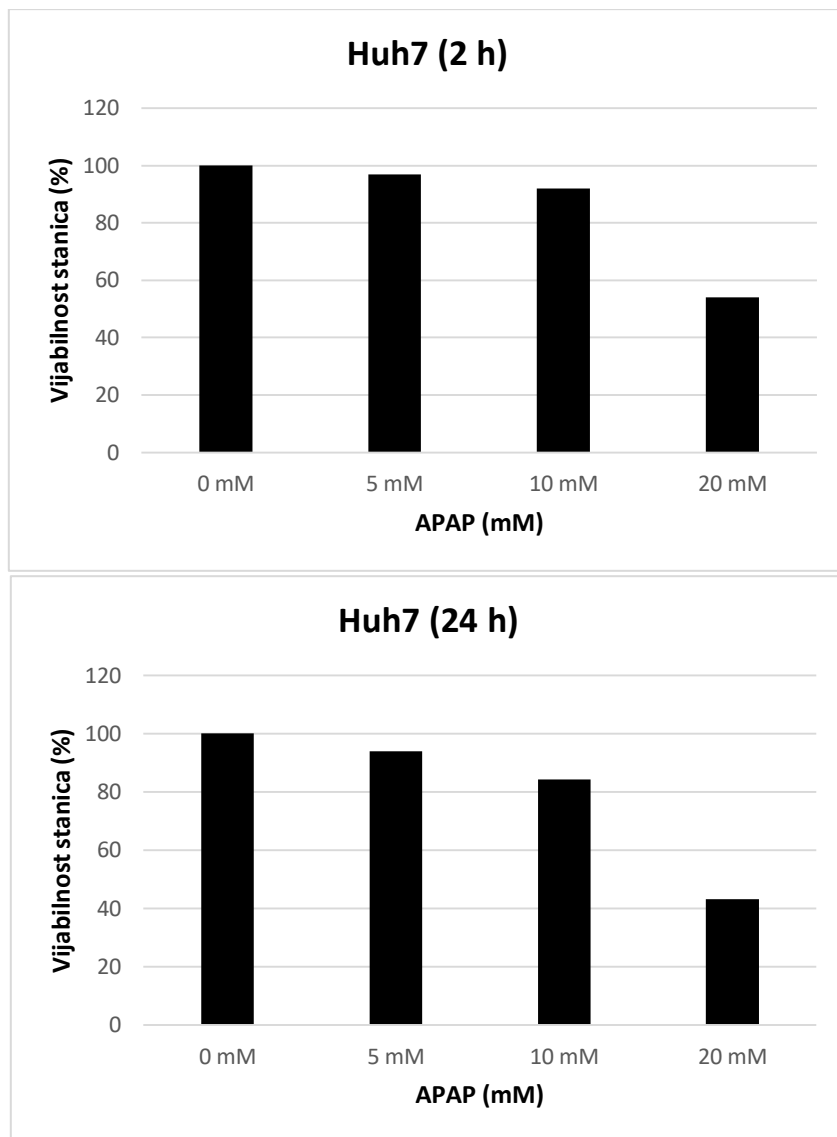


Slika 17: Huh7 stanična kultura, 20 mM APAP (24 h) (foto: J. Nikolić)

Tretiranjem nakon 2 h primjećuje se sličnost kod oba tipa stanica u vijabilnosti kod tretmana s 5 mM paracetamola u odnosu na njihove kontrole. S 10 i 20 mM paracetamola vijabilnost je viša kod Huh7 stanica. Nakon 24 h HTC liniji je znatno pala vijabilnost već s najmanjom koncentracijom paracetamola. Huh7 stanice i nakon 24 h pokazuju veću otpornost od HTC. Ovim rezultatima je potvrđena već poznata ovisnost vijabilnosti hepatocita o koncentraciji paracetamola te o vremenu izlaganja istom.



Slika 18: Ovisnost vijabilnosti HTC stanica o koncentraciji APAP



Slika 19: Ovisnost vijabilnosti Huh7 stanica o koncentraciji APAP

#### 4. RASPRAVA

Huh7 stanice pokazale su se otpornijima od HTC stanica, čak i pri višim koncentracijama uspjele su održati veću brojnost od HTC. HTC stanična linija je hipersenzibilna u odnosu na ljudsku. Stanični modeli dobiveni od glodavaca u pravilu brže reagiraju na promjenu koncentracije od ljudskih modela. Hepatociti izolirani iz štakora i miševa pokazali su povišenu koncentraciju LDH nakon 24 h tretmana sa paracetamolom, i to u koncentracijama paracetamola od 2.5 mM i 1 mM. Količina intracelularnog GSH se također smanjivala u štakorskim hepatocitima tretiranim s 5 mM paracetamola te u mišjim hepatocitima na koje se djelovalo sa 1.5 mM, što upućuje na povećanu produkciju reaktivnih kisikovih jedinica (Kučera i sur. 2016). Jennitz i suradnici (2008) radili su na humanim, mišjim i štakorskim modelima. Stanice su tretirane s 5 mM, 10 mM, 20 mM i 40 mM paracetamola na 24 h te je dokazano da ljudski hepatociti imaju najveću otpornost, čime se potvrđuju i rezultati ovog rada. Nakon 24 h uočava se trend smanjenja kod HTC linije. Huh7 linija opada u brojnosti nakon 24 h tek na 20 mM paracetamola (Slika 17). Ovisnost vijabilnosti stanica o vremenu tretiranja se nakon 2 h primjećuje tek u uzorcima s 20 mM paracetamola kod obje stanične linije (Slika 5 i 9). Ovisnost vijabilnosti o vremenu tretiranja (Jennitz i sur. 2008) pokazala je da nakon 2 h tretiranja ljudskih i štakorskih hepatocita ne dolazi do smanjenja brojnosti stanica, čak i sa visokim koncentracijama (20 mM i 40 mM), što nije u skladu s provedenim eksperimentom gdje se nakon 2 h u uzorcima HTC i Huh7 s 20 mM paracetamola vidi smanjenje vijabilnosti stanica (Slika 5 i 9). Oštećene stanice ispuštaju iz svojih citoplazmi određene molekule koje služe kao biomarkeri. Hamid i suradnici (2018) u svom radu o hepatoprotektivnoj ulozi biljke đumbir *Zingiber zerumbet* Linnaeus 1758, tretirali su štakorske hepatocite sa određenim koncentracijama paracetamola te su uočili da se koncentracije ALT i AST povećavaju, što ukazuje da se broj stanica smanjuje jer veća koncentracija enzima/biomarkera znači da se oštećuju membrane i postaju propusnije. Usporedbom mišjeg i štakorskog modela (Kučera i sur. 2016) je utvrđeno da štakorski pri već nižim koncentracijama paracetamola imaju povišenu aktivnost kaspaze 3, proteina kod mnogih sisavaca koji je zaslužan za iniciranje apoptoze, dok kod mišjeg ne dolazi do povećane aktivnosti istog pri višim koncentracijama paracetamola. Razlika u odgovoru na toksikant je vjerojatno različit skup enzimskih kompleksa koji se uključuju prilikom dishomeostaze, tako da je isti moguće primijeniti i na čovjeka te objasniti zašto je ljudski model, kako je i očekivano, najotporniji. Apoptoza nakon prevelike količine paracetamola nije slučajan proces, već uvjetovan i kontroliran određenim molekulama. Patofiziološka



važnost JNK amplifikacije provedena je na modelima glodavaca sa raznim JNK inhibitorima i utišavanjima JNK gena. Slični efekti JNK aktivacije uzrokovane paracetamolom potvrđeni su i kod ljudskih hepatocita, no inhibicija JNK je samo djelomično zaustavila staničnu smrt (Xie i sur. 2014). Još uvijek se ne zna je li uzrok tome razlika u vrstama na kojima se provodio eksperiment ili su razlike u uzorcima (stanične kulture u odnosu na *in vivo* ispitivanja). Pored bolesti jetre uzrokovane lijekovima, postoje i razni drugi načini induciranja hepatotoksičnosti (kemijski modeli, radijacija, trovanje metalima, prehrana) (Bhakuni i sur. 2015). Yang i suradnici (2018) istraživali su efekte prekomjerne količine bakra (Cu) na kokošje hepatocite te je zaključeno da Cu uzrokuje oksidacijski stres. Kao i pod utjecajem paracetamola, narušene membrane hepatocita otpuštaju ALT, AST i NO, veća je produkcija reaktivnih kisikovih jedinki, a prisutna je i deplecija GSH. Cu također utječe na ekspresiju Bak1, Bax te ostalih gena važnih u procesu apoptoze. Iako se glodavci često koriste kao laboratorijski modeli, hepatotoksičnost između njih i čovjeka je različita, bilo da se radi o dozi toksikanta, farmakokinetici ili patogenezi. Brzina formiranja reaktivnog metabolita NAPQI je drugačija između vrsta, a isto tako i sposobnost uklanjanja paracetamola konjugacijom. ALT kao primarni biomarker hepatotoksičnosti prilikom predoziranja paracetamolom kod čovjeka se u serumu može detektirati tek nakon 12 h, do se kod glodavaca primjećuje nakon 4 do 6 h. Utvrđena je veća otpornost i sličnost metabolizma kod makaki rakojeda (*Macaca fascicularis* Raffles, 1821) i čovjeka nego sa modelima glodavaca, što se može objasniti filogenetskim odnosima, odnosno, bliske srodnosti čovjeka i majmuna (Tamai i sur. 2016). Smanjenje brojnosti hepatocita sa paracetamolom primijećena je i sa HepaRG linijom gdje su u tretiranim uzorcima bile prisutne brojne mrtve stanice, konfluentnost se izgubila i počele su se formirati nakupine hepatocita, takozvani klasteri (*cluster*) (Van den Eede i sur. 2015). Ispitivanjem toksičnosti paracetamola u ovisnosti o vremenu na HepG2 staničnoj liniji u nižim koncentracijama (0.4 mM paracetamola) brojnost stanica nakon 12, 24 i 48 h ostala je nepromijenjena. Viša koncentracija (4 mM paracetamola) nakon 12 h nije dovela do promjene brojnosti, no nakon 24 i 48 h se broj stanica znatno smanjio (Fox i sur. 2010). Međustanični spoj *zonula occludens* (engl. tight junction) održava polarnost stanica, a oštećenje ovog proteinskog kompleksa je jedan od važnijih indikatora patogeneze raznih bolesti. Niske doze paracetamola remete normalnu funkciju *tight junction*-a (5 mM), a na višim se događaju fenotipske promjene F-aktina i njegova postupna redukcija te se narušava integritet samih stanica (10 mM i 20 mM) (HepaRG i mišji model) (Gamal i sur. 2017). Ispitivanjem hepatoprotektivne uloge biljne vrste *Lauridia tetragona* R.H. Archer 1997, bogate

antioksidativnim polifenolima pratila se i vijabilnost HepG2 stanica u ovisnosti o dozi paracetamola. Korištenjem visokih koncentracija (10 mM, 50 mM i 100 mM) paracetamola vijabilnost uzoraka se smanjivala (Odeyemi i Devar 2019). Rodrigues i suradnici (2015) ispitivanjem hepatotoksičnosti paracetamola na različitim ljudskim modelima (HepaRG, HepG2, hHEP, hHSPK-HPC) su zaključili da je različita osjetljivost između staničnih linija. HepaRG imaju najvišu aktivnost gena povezanih s oštećenjem jetre u usporedbi s primarnim hepatocitima, dok HepG2 daju najbrži odgovor na tretman.

## 5. ZAKLJUČAK

Brojna su istraživanja provedena na temu hepatotoksičnosti paracetamola na različitim modelima te je otkriven mehanizam toksičnosti. Ipak, još uvijek je potrebno naći prikladan model za ispitivanje. Činjenica je da, iako štakorski, mišji ili drugi modeli mogu poslužiti za proučavanje, metabolizam nije identičan u usporedbi s čovjekovim, što je također potvrđeno u brzini formiranja NAPQI i sličnim parametrima. Ovim istraživanjem ustanovljeno je da humana stanična linija Huh7 ima veću otpornost u odnosu na štakorsku, HTC. Uzrok veće otpornosti mogao bi biti uključivanje drugih metaboličkih puteva i većeg broja enzimskih kompleksa u cilju obrane od toksikanta. Kod čovjeka je također proces konjugacije učinkovitiji u usporedbi s glodavcima. Za bolje razumijevanje fizioloških promjena jetre u budućnosti bi se istraživanja trebala usmjeriti na *in vivo* modele, gdje bi se, za razliku od hepatokarcinomskih staničnih linija, mogla dobiti potpunija slika štetnog djelovanja paracetamola.

## 6. LITERATURA

- Baines, C.P. (2010) Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol.* 1: 156.
- Bhakuni, G. S., Bedi, O., Bariwal, J., Deshmukh, R., Kumar, P. (2016) Animal models of hepatotoxicity. *Inflammation Research*, 65: 13–24.
- Damjanov, I., Jukić, S., Nola, M. (2011) Patologija. Treće izdanje, Medicinska naklada, Zagreb.
- Du, K., Williams, C.D., McGill, M.R., Jaeschke, H. (2014) Lower susceptibility of female mice to acetaminophen hepatotoxicity: Role of mitochondrial glutathione, oxidant stress and c-jun Nterminal kinase. *Toxicology and applied pharmacology.* 281: 58–66.
- Foster, A. J., Chouhan, B., Regan, S. L., Rollison, H., Amberntsson, S., Andersson, L. C., Morgan, P. (2019) Integrated in vitro models for hepatic safety and metabolism: evaluation of a human Liver-Chip and liver spheroid. *Archives of Toxicology*, 93: 1021–1037.
- Fox, B. C., Devonshire, A. S., Schutte, M. E., Foy, C. A., Mínguez, J., Przyborski, S., Marshall, D. (2010) Validation of reference gene stability for APAP hepatotoxicity studies in different in vitro systems and identification of novel potential toxicity biomarkers. *Toxicology in Vitro*, 24: 1962–1970.
- Gamal, W., Treskes, P., Samuel, K., Sullivan, G. J., Siller, R., Srsen, V., Nelson, L. J. (2017) Low-dose acetaminophen induces early disruption of cell-cell tight junctions in human hepatic cells and mouse liver. *Scientific Reports*, 7: 1–16.
- Hamid, A., Lee, L. S., Karim, S. R., & Jufri, N. F. (2018) Hepatoprotective effects of zerumbone against paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 25: 64–71.
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W.A., Han, D., Kaplowitz, N. (2008) Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *The Journal of biological chemistry.* 283: 13565–77.
- Hinson, J.A., Reid, A.B., Mccullough, S.S., James, L.P. (2004) Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug Metab Rev*, 36: 805-22.

Hinson, J.A., Roberts, D.W., James, L.P. (2010) Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 196: 369-405.

Jemnitz, K., Veres, Z., Monostory, K., Kóbori, L., Vereczkey, L. (2008) Interspecies differences in acetaminophen sensitivity of human, rat, and mouse primary hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 22: 961–967.

Kaplovitz, N. (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature Reviews*, 4: 489-499.

Kučera, O., Endlicher, R., Rychtrmoc, D., Lotková, H., Sobotka, O., Červinková, Z. (2017) Acetaminophen toxicity in rat and mouse hepatocytes in vitro. *Drug and Chemical Toxicology*, 40: 448–456.

Kuna, L., Bozic, I., Kizivat, T., Bojanic, K., Mrso, M., Kralj, E., Smolic, R., Wu, G., Smolic, M. (2018) Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. *Current Drug Metabolism*, 19: 830–838.

Li, J.X., Feng, J.M., Wang, Y., Li, X.H., Chen, X.X., Su, Y. (2014) The B-Raf(V600E) inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell death & disease*. 5: 1278.

Li, R., Liu, F., Chang, Y., Ma, X., Li, M., Li, C., Wang, D. (2017) Glutathione S-transferase A1 (GSTA1) as a marker of acetaminophen-induced hepatocyte injury in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27: 401–407.

Masubuchi, Y., Suda, C., Horie, T. (2005) Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Hepatology* 42: 110-116.

Odeyemi, S., Dewar, J. (2019) *Repression of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in HepG2 Cells by Polyphenolic Compounds from Lauridia tetragona (L.f.) R.H. Archer. Molecules*, 24: 2118 -2136.

Ramachandran, A., Lebofsky, M., Weinman, S.A., Jaeschke, H. (2011) The impact of partial manganese superoxide dismutase (SOD2)-deficiency on mitochondrial oxidant stress, DNA fragmentation and liver injury during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 251: 226–33.

Ramachandran, A., McGill, M.R., Xie, Y., Ni, H.M., Ding, W.X., Jaeschke, H. (2013)

Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology*. 58: 2099–108.

Reid, A.B., Kurten, R.C., McCullough, S.S., Brock, R.W., Hinson, J.A. (2005) Mechanisms of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition in Freshly Isolated Mouse Hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312: 509-516.

Riaz, N., Wolden, S. L., Gelblum, D. Y., Eric, J. (2016) *HHS Public Access*. 118: 6072–6078.

Rodrigues, R. M., Heymans, A., De Boe, V., Sachinidis, A., Chaudhari, U., Govaere, O., De Kock, J. (2016) Toxicogenomics-based prediction of acetaminophen-induced liver injury using human hepatic cell systems. *Toxicology Letters*, 240: 50–59.

Saito, C., Lemasters, J.J., Jaeschke, H. (2010) c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 246 :8–17.

Silva Ramos, E., Larsson, N.G., Mourier, A. (2016) Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochimica et biophysica acta*. 1857: 1277–83.

Tamai, S., Iguchi, T., Niino, N., Mikamoto, K., Sakurai, K., Sayama, A., Mori, K. (2017) A monkey model of acetaminophen-induced hepatotoxicity; phenotypic similarity to human. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42: 73–84.

Tee, L.B.G., Davies, D.S., Seddon, C.E., Boobis, A.R. (1987) Species differences in the hepatotoxicity of paracetamol are due to differences in the rate of conversion to its cytotoxic metabolite. *Biochemical Pharmacology* 36: 1041-1052.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G.(2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*. 11: 700–14.

Van den Eede, N., Cuykx, M., Rodrigues, R. M., Laukens, K., Neels, H., Covaci, A., Vanhaecke, T. (2015) Metabolomics analysis of the toxicity pathways of triphenyl phosphate in HepaRG cells and comparison to oxidative stress mechanisms caused by acetaminophen. *Toxicology in Vitro*, 29:8, 2045–2054.

- Van Summeren, A., Renes, J., Lizarraga, D., Bouwman, F. G., Noben, J.-P., van Delft, J. H. M., Mariman, E. C. M. (2013) Screening for Drug-Induced Hepatotoxicity in Primary Mouse Hepatocytes Using Acetaminophen, Amiodarone, and Cyclosporin A as Model Compounds: An Omics-Guided Approach. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 17:2, 71–83.
- Vlach, M., Quesnot, N., Dubois-Pot-Schneider, H., Ribault, C., Verres, Y., Petitjean, K., Loyer, P. (2019) Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity. *Sensors*, 19:10, 2245.
- Williams, J.A., Ni, H.M., Haynes, A., Manley, S., Li, Y., Jaeschke, H. (2015) Chronic Deletion and Acute Knockdown of Parkin Have Differential Responses to Acetaminophen-induced Mitophagy and Liver Injury in Mice. *The Journal of biological chemistry*. 290: 10934–46.
- Xie, Y., McGill, M.R., Dorko, K., Kumer, S.C., Schmitt, T.M., Forster, J. (2014) Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*. 279: 266–74.
- Xie, Y., McGill, M.R., Du, K., Dorko, K., Kumer, S.C., Schmitt, T.M. (2015) Mitochondrial protein adducts formation and mitochondrial dysfunction during N-acetyl-m-aminophenol (AMAP)-induced hepatotoxicity in primary human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*. 289: 213–22.
- Yang, F., Pei, R., Zhang, Z., Liao, J., Yu, W., Qiao, N., Tang, Z. (2019) Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 54: 310–316.
- Zhang, J., Yang, Y., He, W., Sun, L. (2016) Necrosome core machinery: MLKL. *Cell Mol Life Sci*. 73: 2153–63.
- Zhang, T., Zhang, Y., Cui, M., Jin, L., Wang, Y., Lv, F. (2016) CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat Med*. 22: 175–82.
- Zhao, J., Lendahl, U., Nister, M. (2013) Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cell Mol Life Sci*. 70: 951–76.