

Usporedba različitih metoda ispitivanja citotoksičnosti amiodarona u ljudskoj želučanoj staničnoj liniji (AGS)

Jović, Nevena

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:152:126432>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

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



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

Nevena Jović

**USPOREDBA RAZLIČITIH METODA
ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI
AMIODARONA U LJUDSKOJ
ŽELUČANOJ STANIČNOJ LINIJI (AGS)**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

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

Nevena Jović

**USPOREDBA RAZLIČITIH METODA
ISPITIVANJA CITOTOKSIČNOSTI
AMIODARONA U LJUDSKOJ
ŽELUČANOJ STANIČNOJ LINIJI (AGS)**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je izrađen na Medicinskom fakultetu Osijek na Katedri za farmakologiju.

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

Rad ima 28 radnih listova, 4 tablice i 3 slike.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Stanične linije	1
1.1.1. Ljudska želučana stanična linija (AGS)	2
1.2. Amiodaron	2
1.3. Oksidativni stres	4
1.4. Metode ispitivanja citotoksičnosti	5
2. CILJ	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Ustroj studije	8
3.2. Materijali	8
3.3. Metode	8
3.3.1. Određivanje stanične proliferacije i preživljenja	9
3.3.2. Određivanje oksidacijskog stresa	10
3.3.3. Određivanje lipida i triglicerida	10
3.4. Statističke metode	12
4. REZULTATI	13
5. RASPRAVA	19
6. ZAKLJUČAK	22
7. SAŽETAK	23
8. SUMMARY	24
9. LITERATURA	25
10. ŽIVOTOPIS	28

KRATICE

AGS (engl. *Human gastric adenocarcinoma cell-line*) – Ljudska želučana stanična linija izolirana iz adenokarcinoma

AMD – Amiodaron

DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid*) – Deoksiribonukleinska kiselina

DMF – Dimetilformamid

DMSO – Dimetil sulfoksid

DTNB (engl. *Dithionitrobenzoate*) – 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina

FBS (engl. *Fetal bovine serum*) – Fetalni goveđi serum

GSH (engl. *Glutathione*) – Reducirani glutation

GSSG (engl. *Glutathione disulfide*) – Oksidirani glutation

HDL (engl. *High-density lipoproteine*) – Lipoproteini visoke gustoće

LPO – Lipidna peroksidacija

MTT (engl. *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) – 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid

NAC – N-acetil cistein

ORO – engl. *Oil Red O*

PBS (engl. *Phosphate buffered saline*) – Fosfatno puferirana otopina

ROS (engl. *Reactive oxygen species*) – Reaktivni kisikovi spojevi

RPMI-1640 – engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*

TNB (engl. *5-thio-2-nitrobenzoic acid*) – 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina

1. UVOD

1.1. Stanične linije

Stanična kultura je prvi put opisana početkom 20. stoljeća. Ovakav tip studije proizašao je iz potrebe za proučavanjem ponašanja stanica izvan okruženja sustavnih promjena koje se javljaju u organizmu tijekom homeostaze i stresa. Kultura stanica koristi se za proučavanje staničnog razvoja i diferencijacije, patološke studije, razvoj molekularne biologije, proizvodnju cjepiva, monoklonalnih antitijela te u brojne druge svrhe u sterilnim uvjetima kako bi se kultura održala duže i spriječila kontaminacija. Osim u virologiji i onkologiji, stanična kultura pokazala se korisnom i u istraživanju djelovanja brojnih medicinskih proizvoda. Kulturu stanica treba smatrati potencijalnim izvorom patogenih mikroorganizama te je bitno napomenuti kako kultura ljudskih stanica ima veću mogućnost prijenosa infekcije od kulture stanica životinjskog tkiva (1). Primarne stanične linije dobivaju se izravno iz izrezanog tkiva tako da se izdvojeno tkivo mehanički, enzimatski ili kombinacijom usitni do malih fragmenata pa sve do pojedinačnih stanica. U početku su stanice heterogene, ali kasnije prevladavaju fibroblasti. Mogu se dobiti iz normalnog, embrionalnog ili zrelog i tumorskog tkiva (2). Stanice primarne linije zadržavaju većinu funkcija i svojstava tkiva iz kojeg su nastale pa primarna kultura najbolje odražava *in vivo* uvjete i stoga je najprikladnija za ispitivanja svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice. Subkultivacijom primarne kulture razvija se stanična linija (3). Normalne stanice dijele se ograničen broj puta prije nego što izgube mogućnost proliferacije i izumru. Neke druge stanične linije procesom transformacije postaju besmrtni te se mogu neograničeno dijeliti. Tako se dobivaju kontinuirane stanične linije koje se najčešće koriste u znanstveno-istraživačkom radu (3, 4). Za rast u kulturi, stanice trebaju hranjive sastojke kojima su okružene *in vivo*, a među njima su esencijalne aminokiseline, vitamini, glukoza, soli i serum sisavaca. Sve koncentracije trebaju biti strogo definirane i podešene (2). Prednosti stanične kulture su dosljednost i ponovljivost rezultata, visoka kontrola fizikalno-kemijskog okruženja i fizioloških stanja, ekonomičnost, potrebne manje količine reagensa, izbjegavanje etičkih pitanja vezanih uz uporabu životinja za pokuse i jeftiniji testovi probira (1, 2). S druge strane, glavni nedostaci su strogo sterilni, aseptični uvjeti, veliki trud, napor i trošak za relativno malu količinu stanica te potreba za visoko kvalificiranim osobljem (1). Kontaminacija mikroorganizmima je veliki problem i nedostatak kada su u pitanju stanične kulture, iako je do sada znatno smanjena sterilnim uvjetima rada, antibioticima i korištenjem kabineta za sigurnosni rad s laminarnim protokom zraka. Kontaminacija se može primijetiti promjenom pH

te posljedično promjenom boje ili zamućenošću medija, nepoznatim česticama u mediju ili zrnatošću pod mikroskopom. Mikoplazma je jedan od najozbiljnijih kontaminanata u staničnoj kulturi te može dovesti do promjene u staničnoj biokemiji, antigenosti ili staničnom rastu i razvoju, a ne možemo ju otkriti rutinskom mikroskopijom (2).

1.1.1. Ljudska želučana stanična linija (AGS)

Ljudska želučana stanična linija (eng. *Human gastric adenocarcinoma cell-line*, AGS) je izolirana iz želučanog adenokarcinoma 54-godišnje žene, bijele rase. Ova stanična linija prikladna je za transfekciju, odnosno unos virusne deoksiribonukleinske kiseline (engl. *Deoxyribonucleic acid*, DNA) u stanicu te se može koristiti u genetskom inženjerstvu. Izvedena je od fragmenata tumora pacijenata koji nisu primili terapiju. Hiperploidna je humana stanična linija s tumorogenim karakteristikama. Vrijeme udvostručenja populacije je oko 20 sati, odgovarajuća temperatura uzgoja je 37 °C i zahtijeva promjenu medija svakih 2 do 3 dana (5). Ono što se može zaključiti o ovim stanicama prilikom rada s njima, jeste da u svom pogodnom periodu rasta, rastu i dijele se iznimno brzo te ih je moguće dijeliti, odnosno rasaditi svaka 24 sata. No, prilikom sporijeg rasta, može se dogoditi da i do 5 dana ne dosegnu dovoljnu konfluentnost bez obzira na to što rastu u potpuno istim uvjetima kao i ranije. Prilično su male u usporedbi sa stanicama humanog hepatocelularnog karcinoma kao što su HuH7 i stanicama hepatocelularnog karcinoma štakora kao što su HTC te su pokazale manju osjetljivost na infekciju.

Mogu se koristiti za proučavanje progresije karcinoma želuca, za određivanje razine ekspresije transkripta-1 povezanog s rakom debelog crijeva, za proučavanje adhezije *Lactobacillus* sps. na sluznicu želuca te za antitumorska testiranja (5).

Uzgoj stanica odvija se u mediju RPMI-1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*) sa 100 µg/ml streptomicina, 100 IU/ml penicilina, 10 % fetalnog govedjeg seruma (engl. *Fetal bovine serum*, FBS) inaktiviranog toplinom na 56 °C i vlažnoj atmosferi, s 5 % CO₂ – 95 % O₂.

1.2. Amiodaron

Amiodaron (AMD) je jedan od najboljih antiaritmika. Pripada klasi III antiaritmijskih lijekova. Blokira natrijeve, kalijeve i kalcijeve kanale u srčanom tkivu čime dovodi do produljenja srčanog akcijskog potencijala. Također, inhibira alfa i beta adrenergične receptore i time smanjuje simpatičku stimulaciju srca, dovodi do negativnog kronotropnog učinka i smanjuje

srčanu potrebu za kisikom. Može uzrokovati vazodilataciju poticanjem oslobađanja dušikova oksida i endotelnih faktora ovisnih o ciklooksigenazi (6).

Kationski je amfifilni spoj sposoban ometati mitohondrijsku funkciju te na taj način poticati razvoj masne jetre. Neprtonirani i lipofilni oblik lijeka prolazi kroz mitohondrijsku membranu te se protonira i ostaje zarobljen unutar mitohondrija. Visoka intramitohondrijska koncentracija lijeka inhibira beta-oksidaciju i ometa transport elektrona u lancu vodeći posljedično do akumulacije masnih kiselina i produkcije reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive oxygen species*, ROS-a).

Propisuje se pacijentima s fibrilacijom atrijske i ventrikularne aritmije te se koristi za njihovo suzbijanje i sprječavanje recidiva u slučaju rezistencije na konvencionalno liječenje (6, 7). Ima složenu farmakokinetiku, metabolizira se u jetrenom sustavu citokroma P450 i izlučuje fecesom. Izlučivanje bubrezima je minimalno (6). Glavni metabolit ovog lijeka je N-desetilamidaron. Jednako kao i osnovna inačica lijeka, ima dug poluživot eliminacije i nakuplja se u zahvaćenim tkivima. AMD i njegov metabolit inhibiraju lizosomske fosfolipaze i tvore kompleks lijek-fosfolipid otporan na razgradnju te tako dovode do lizosomske fosfolipidoze (7).

Topljiv je u organskim otapalima kao što su etanol, dimetil sulfoksid (DMSO) i dimetilformamid (DMF). Topljivost AMD-a u etanolu iznosi približno 5 mg/ml i približno 10 mg/ml u DMSO i DMF. Slabo je topljiv u vodenim otopinama. Njegova stabilnost je dvije godine, a može biti stabilan i duže (8).

Izravna citotoksičnost, stvaranje slobodnih radikala, razvoj lizosomske fosfolipidoze i destabilizacija membrane mogući su stanični mehanizmi toksičnosti. Poznato je kako je molekularni mehanizam AMD-om inducirane stanične smrti uzrokovan oksidativnim oštećenjem. Oksidativni stres obično nastaje ili zbog povećane proizvodnje ROS-a ili smanjenog antioksidativnog kapaciteta stanica. Prvi od navedenih mehanizama prisutan je u slučaju citotoksičnosti izazvane AMD-om (9). Kako bi se provjerio status oksidativnog stresa kao odgovora na AMD (IC₅₀/2, IC₅₀) nakon 24 sata izloženosti, mjeri se proizvodnja malondialdehida i 4-hidroksinonenala kao biomarkera peroksidacije lipida. IC₅₀ vrijednosti definirane su kao koncentracija koja uzrokuje 50 % gubitka preživljenja stanica. Citotoksični učinci AMD-a na kultivirane stanice nakon 24 sata inkubacije mjere se 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid (engl. *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, MTT) testom. Rezultati ukazuju da liječenje AMD-om uzrokuje značajno smanjenje

preživljenja stanica na način ovisan o dozi, no postoji različita citotoksičnost u odnosu jedne stanične linije na drugu (10).

AMD može imati ozbiljne nuspojave širokog spektra, uključujući fotosenzibilnost, gastrointestinalne tegobe, hepatotoksičnost te poremećaj rada štitnjače. Nuspojave su reverzibilne prirode i nestaju smanjenjem doze ili prekidom terapije (6).

1.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres može se definirati kao metaboličko stanje organizma u kojemu dolazi do povećanja količine ROS-a. Remeti se ravnoteža u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema povećanom stvaranju radikala ili smanjenoj antioksidativnoj zaštiti stanica. ROS nastaju iz molekularnog kisika tijekom normalnog metabolizma u procesu prijenosa elektrona na molekulu kisika. Reducirani su i izrazito reaktivni. Glavni spojevi u organizmu su superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Superoksidni anion i hidroksilni radikal pripadaju skupini slobodnih radikala, a vodikov peroksid pripada reaktivnim intermedijerima koji nisu slobodni radikali, ali uzrokuju reakcije u kojima oni nastaju. Slobodni radikali su nestabilni atomi ili molekule koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Njihovi nespareni elektroni daju im visoku reaktivnost budući da vode do oduzimanja ili davanja elektrona drugim molekulama kako bi sparili svoj elektron i postigli stabilnost. Proizvode se u normalnim fiziološkim procesima i brzo se sparuju s prostorno bliskim biomolekulama te ukoliko je broj antioksidansa i citoprotektivnih enzima nedostatan, nastaje oksidativni stres. Kao posljedica oksidativnog stresa može doći do lomova unutar molekule DNA, povećane koncentracije unutarstaničnog kalcija, oštećenja membranskih ionskih transportera te peroksidacije lipida (11). Kako bi se umanjile posljedice oksidativnog stresa, tijelo ima obrambeni mehanizam koji uključuje superoksid dismutazu, katalazu i glutation (12).

Glutation je jedan od najjačih i najvažnijih antioksidansa u svakoj stanici tijela dobiven iz aminokiselina L-cistein, L-glutaminske kiseline i glicina (11). Na sebe veže štetne spojeve i tako smanjuje njihovu biološku aktivnost. Može biti u oksidiranom (engl. *Glutathione disulfide*, GSSG) i reduciranom (engl. *Glutathione*, GSH) obliku, a GSSG se reducira glutation reduktazom u GSH. GSH je uglavnom prisutan u većim količinama, a iz omjera GSH i GSSG dobiju se podaci o jačini oksidacijskog stresa stanice (11, 13). Mjerenje GSH, GSSG i srodnih spojeva važno je za procjenu redoks statusa bioloških sustava *in vivo* i *in vitro* (14). GSH se

oksidira 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (engl. *Dithionitrobenzoate*, DTNB) i kao rezultat nastaje GSSG i 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. *5-thio-2-nitrobenzoic acid*, TNB). Brzina stvaranja TNB-a je proporcionalna zbroju GSH i GSSG u uzorku i određuje se mjerenjem TNB-a na 415 nm (13, 14).

Jedno od sredstava koje dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala i vodikovog peroksida unutar mitohondrija je AMD. Lipidna peroksidacija (LPO) predstavlja oksidativnu razgradnju lipida u kojoj slobodni radikali oduzimaju elektrone lipidima u staničnoj membrani, a štetna je posljedica terapije AMD-om. Višak joda uzrokuje stres u nekim tkivima, a AMD dejodinizacijom oslobađa višak joda u cirkulaciju i dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji uzrokuju povećanu LPO. Time AMD izaziva oksidativna oštećenja povećanjem količine slobodnih radikala što povećava i razinu superoksid dismutaze kako bi se neutralizirao učinak ROS-a (12).

U procjenu oksidativnog stresa može se uključiti kvantificiranje lipida, oksidativno oštećenje proteina i proizvodnja dušikova monoksida. Budući da poremećaji unutar mitohondrija dovode do stvaranja superoksidnog aniona i vodikova peroksida, procjena oksidativnog stresa može uključivati i aktivnost superoksid dismutaze i katalaze (15).

1.4. Metode ispitivanja citotoksičnosti

Ispitivanje citotoksičnosti od velike je važnosti za *in vitro* studije. Lijekovi citotoksični učinak na stanice ostvaruju sprječavanjem sinteze proteina ili uništavanjem stanične membrane. Zbog toga je važno koristiti jeftina, pouzdana i ponovljiva ispitivanja citotoksičnosti i stanične održivosti koja su utemeljena na različitim staničnim funkcijama (16). *In vitro* testovi za ispitivanje toksičnosti određuju takozvanu bazičnu citotoksičnost. Bazična citotoksičnost odnosi se na rezultat nastao međudjelovanjem neke ispitivane tvari i procesa uključenih u život i proliferaciju stanica, odnosno radi se o učinku ispitivane tvari na preživljavanje stanica u kulturi. Na taj način dobiju se podaci o koncentraciji ispitivane tvari, vremenu izlaganja stanica i mehanizmu djelovanja (3). Razlikuju se kolorimetrijska, fluorimetrijska i luminometrijska ispitivanja te testovi isključivanja boje.

Kolorimetrijski testovi koriste reagense koji razvijaju boju kao odgovor na preživljenje stanica te tako omogućavaju kolorimetrijsko mjerenje preživljenja stanica spektrofotometrom. Primjenjivi su na adherentne ili suspenzijske stanične linije (16). Velika prednost *in vitro* testova je u mogućnosti standardizacije. Najčešće korišteni *in vitro* test za ispitivanje

citotoksičnosti je MTT test, kolorimetrijski test redukcije tetrazolijeve soli. Zasniva se na mjerenju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije žutog MTT tetrazolija u plavoljubičasti, intracelularni, netopljivi formazan pomoću NADH. Izmjerena apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u uzorku, a preživljenje stanica izražava se kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i kontrolnih stanica (3, 16, 17). Metoda je jednostavna, sigurna, reproducibilna, ali njeni nedostaci su netopljivost formazana u vodi i nastanak kristala u stanici koji se prije mjerenja apsorbancije trebaju otopiti u DMSO ili izopropanolu. Uvijek je potrebno provesti kontrolna ispitivanja zbog lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata uzrokovanih pozadinskim smetnjama što dovodi do precjenjivanja preživljenja stanica (16). Budući da je MTT osjetljiv na svjetlost, ispitivanje se provodi u mraku (17).

Testovi isključivanja boje jedni su od vrlo jednostavnih i široko korištenih metoda za određivanje citotoksičnosti. U takvim metodama, žive stanice „isključuju“ boju, a mrtve stanice ne. Jedan od tih testova je test tripanskim plavilom. Tripansko plavilo je velika negativno nabijena molekula. Ovaj se test temelji na tome da žive stanice koje imaju netaknutu staničnu membranu isključuju ovu boju, odnosno boja ne može proći u stanicu, dok kod mrtvih stanica zbog oštećenja membrane, boja može prodrijeti. Prema tome, mrtve stanice imaju plavu citoplazmu, a žive stanice prozirnu. Broj živih i mrtvih stanica se određuje svjetlosnim mikroskopom kao postotak netretiranih kontrolnih stanica. Metoda je jeftina i jednostavna, a mrtve stanice se jako brzo oboje plavo. Problem je što se stanice broje pomoću hemocitometra te su moguće greške u brojanju, npr. zbog mjehurića zraka, gubitka stanica ili netočnog razrjeđivanja. Jedan od velikih nedostataka ove metode je to što ne razlikuje zdrave žive stanice od onih koje možda gube osnovne funkcije pa se ne smatra dovoljno osjetljivom metodom za *in vitro* ispitivanje citotoksičnosti (16). Kao alternativa tripanskom plavilu, zbog njegove toksičnosti, koristi se eritrozin B odobren za bojanje hrane. Eritrozin boji citoplazmu mrtvih stanica u crveno, a žive stanice zadržavaju prozirnu citoplazmu (18, 19).

2. CILJ

Ciljevi istraživanja su:

1. procijeniti preživljenje AGS stanica pri različitim koncentracijama tijekom 24 sata izloženosti AMD-u
2. izmjeriti količinu GSH u AGS stanicama pri različitim koncentracijama tijekom 24 sata izloženosti AMD-u
3. pomoću mikrofotografiranja prikazati promjene morfologije stanica tretiranih prekomjernom dozom AMD-a, kao i nastanak i distribuciju lipidnih kapljica “Oil red O” (ORO) bojanjem
4. usporediti IC50 AMD-a MTT-om, mjerenjem GSH-a i ORO bojanja

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani pokus.

3.2. Materijali

Za potrebe istraživanja korištena je AGS stanična linija (ATCC CRL-1739, Manassas, VA, SAD), izolirana iz želučanog adenokarcinoma 54-godišnje žene, bijele rase.

Kemikalije koje su se koristile:

RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD).

100 µg/ml streptomicina, 100 IU/ml penicilina (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD), 10 % FBS-a (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD).

Trypsin/EDTA (PAN-Biotech, Aidenbach, Njemačka).

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

MTT 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), tripansko plavilo, Trypan Blue (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD), Glutathione Assay Kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, SAD).

ORO boja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 4',6-diamidino-2-fenilindol.

3.3. Metode

AGS stanice uzgajane su u RPMI-1640 mediju sa 100 µg/ml streptomicina, 100 IU/ml penicilina, 10 % FBS-a inaktiviranog toplinom na 56 °C i vlažnoj atmosferi, s 5 % CO₂.

Stanice su uzgojene u jednosloju u pločama sa 96 jažica za MTT te u pločama sa 6 jažica za GSH i ORO bojanje te su izložene različitim koncentracijama AMD-a u tri replike. Randomizacija je učinjena blok dizajnom te su svi eksperimenti ponovljeni tri puta.

3.3.1. Određivanje stanične proliferacije i preživljenja

Test tripanskim plavilom

Testom tripanskim plavilom utvrđeno je preživljenje stanica u suspenziji. Korištena je alternativa tripanskog plavila za bojanje stanica, eritrozina. Nakon što su stanice dosegle konfluentnost 80 – 90 %, nasadene su na mikrotitarske pločice za određeni test. Primarno su odlijepljene od podloge na kojoj su rasle tretiranjem tripsinom (5 ml). Nakon inkubacije od nekoliko minuta (za AGS je to 7 – 8 minuta) dodan je isti volumen medija da bi se neutralizirao tripsin te su stanice centrifugirane (1000 rpm, 6 minuta). Poslije centrifuge, supernatant je odličen i dodan je odabrani volumen medija s obzirom na količinu taloga te je sve resuspendirano. Pipetom je odvojeno 10 µl stanične suspenzije te je pomiješano sa 10 µl eritrozina u maloj tubici, zatim je to resuspendirano i dodano je po 10 µl te suspenzije sa svake strane stakalca na Bürker-Türkovoj komorici. Stanice su brojane ručno i pomoću hemocitometra na svjetlosnom mikroskopu. Prozirna citoplazma je bila prisutna u živim stanicama, dok je kod mrtvih stanica citoplazma bila crvene boje.

MTT test

Kolorimetrijska je metoda temeljena na metaboličkoj aktivnosti stanica. Test je proveden kroz 3 dana, a prethodilo mu je brojanje stanica opisano u odlomku ispred. Nakon što su stanice prebrojane pomoću hemocitometra na svjetlosnom mikroskopu, izračunat je potreban volumen stanica i medija kako bi stanice bile nasadene u točnoj koncentraciji na pločice sa 96 jažica. Rađeni su biološki duplikati, a tehnički triplikati. U svaku jažicu stavljeno je 100 µl dobivene suspenzije te je pločica ostavljena u inkubatoru 24 sata kako bi stanice u jažicama postale konfluentne. Nakon što su stanice dosegle visoku konfluentnost, tretirane su AMD-om. U ovom slučaju, od 80 mM AMD-a pravljena je željena koncentracija te su rađena serijska razrjeđenja u falkonicama od 15 ml. Medij je vađen iz svih jažica u kojima su nasadene stanice i vršeno je tretiranje AMD-om koncentracijama od većih prema manjima. U prvi red jažica stavljen je medij bez FBS-a kao kontrola. Nakon 24 sata, u mraku, zbog osjetljivosti MTT-a na svjetlost, u svaku jažicu dodano je 10 µl MTT-a točno u medij i inkubirano je na 4 sata. Zatim, izvan kabineta za sigurnosni rad, dodano je po 100 µl izopropanola u svaku jažicu te je pipetom resuspendirano kako bi se razbili kristalići formazana. U stanicama koje su žive reducirana je blijedo žuta tetrazolijeva sol u plavoljubičasto obojene kristale formazana djelovanjem staničnih dehidrogenaza. Primjenom alkohola otopljeni su kristali formazana, a intenzitet obojenja određen je spektrofotometrijski na čitaču mikrotitarskih pločica (iMark™ Microplate

Apsorbance Reader, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, SAD) pri valnoj duljini od 595 nm.

3.3.2. Određivanje oksidativnog stresa

Koncentracija glutationa mjerena je spektrofotometrijski pomoću komercijalno dostupnog kita (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD), prema protokolu proizvođača. Početak postupka je jednak kao za MTT i uključuje brojanje stanica. Ovaj put stanice su nasadene na ploče sa 6 jažica pri čemu je u svaku jažicu dodano 2 ml stanične suspenzije. Nakon 24 sata, kada su stanice dosegle visoku konfluentnost, tretirane su AMD-om. Prve su jažice bile kontrola, medij bez FBS-a, a u preostale su stavljene dvije osnovne koncentracije AMD-a. U slučaju AGS stanica, IC50 AMD-a je bio 30 μM te je to bila početna koncentracija, a druga je bila 15 μM . 24 sata nakon tretiranja, provedene su predradnje za mjerenje GSH prema uputi proizvođača, svi uzorci nasadeni su na pločicu sa 96 jažica te je ona stavljena u čitač. Metoda je zasnovana na mjerenju redukcije DTNB-a katalitičkim količinama GSH, pri čemu nastaje žuto obojeni produkt TNB i GSSG. Porast apsorbancije mjereno je pri valnoj duljini od 415 nm, a dogodio se zbog nastajanja TNB-a.

3.3.3. Određivanje lipida i triglicerida

Promjene morfologije stanica tretiranih prekomjernom dozom AMD-a, nastanak i distribucija lipidnih kapljica određena je ORO bojanjem.

ORO boja korištena je za vizualizaciju lipida i neutralnih triglicerida, nastalih kao posljedica utjecaja lijekova. Izgleda kao crveni prah te ima maksimalnu apsorpciju na 518 nm. Nasadivanje stanica jednako je kao i za GSH gdje je nakon brojanja stanica, po 2 ml stanične suspenzije nasadeno u svaku jažicu ploče sa 6 jažica koje imaju na dnu pokrovna stakalca.

Priprema pokrovnih stakalaca uključuje protokol pranja s jednim dijelom vodikova peroksida (30%) pomiješanog s 9 dijelova koncentrirane (96 %) sumporne kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

1. U Erlenmeyerovu tikvicu sa širokim grlom od 300 μl stavljeno je 100 pokrovnih stakalaca (20 x 20 mm²), a mješavina sumporne kiseline i vodikovog peroksida izlivena je na stakalce.
2. Da bi se sva stakalca natopila otopinom, sve je miješano nježnim kružnim pokretima, tri puta u 30 minuta.

3. Materijali i metode

3. Nakon 30 minuta, unutar kabineta za sigurnosni rad, kiselina je izlivena iz tikvice u kantu od 5 l destilirane vode kako bi se sigurno razrijedila. 200 ml svježe destilirane vode dodano je u tikvicu sa stakalcima da bi se razrijedila preostala kiselina.
4. Poklopci su isprani vodom koja je odbačena u kemijski otpad.
5. 200 ml destilirane vode izliveno je u tikvicu i stavljeno na orbitalni shaker na 100 rpm sat vremena.
6. Nakon sat vremena, voda je izbačena iz tikvice i dodano je 200 ml destilirane vode. Ciklus pranja je ponovljen još 5 puta. Ukupno 6 sati pranja.
7. Nakon zadnjeg pranja, destilirana voda je odbačena, pokrovna stakla su osušena dodatkom 100 ml metanola, a tikvica je rotirana 5 minuta. Metanol je zatim odbačen u kemijski otpad.
8. Preko otvora tikvice stavljena je aluminijska folija, a stakalca su suho sterilizirana na 270 °C 5 sati.
9. Nakon sterilizacije, u svaku od 6 jažica ploče dodano je jedno pokrovno stakalce sa sterilnom pincetom. Stakalca su tretirana nekom adhezivnom molekulom kako bi se osiguralo čvrsto prianjanje stanica. Za to je korišten poli-D-lizin.
10. Otopina poli-D-lizina dobivena je otapanjem 5 mg poli-D-lizina u prahu u 5 ml sterilne deionizirane vode u konačnoj koncentraciji 1 mg/ml.
11. Da bi se priredila radna otopina, otopina poli-D-lizina je razrijeđena 1:200, sa sterilnom deioniziranom vodom, te je u svaku jažicu dodano 1,25 ml radne otopine.
12. Poli-D-lizin je inkubiran 1 sat u inkubatoru i nakon toga je uklonjen.
13. Poklopci su sušeni preko noći u sterilnom laminaru pod UV-C svjetlom.

Nakon nasađivanja, stanice su tretirane AMD-om. 24 sata kasnije, stanice su tretirane formalinom i fosfatno puferiranom otopinom (engl. Phosphate buffered saline, PBS). Tako su stajale u hladnjaku do bojanja. Za bojanje je priređena radna otopina te je filtrirana. PBS je izvađen iz jažica, a boja je nanijeta tako da su stakalca bila potpuno natopljena. Nakon toga, isprano je PBS-om te je u njemu i čuvano u hladnjaku do slikanja.

Za gledanje stanica korišten je invertni mikroskop (Axioscop 2 Mot Microscope, Carl Zeiss, Göttingen, Njemačka) na kojem su lipidi bili prikazani u crvenoj boji. Fotografiranje je izvedeno na ZEISS filter setu 1 (1/55; DAPI, plavo obojenje) i ZEISS filter setu 9 (1/2,8; Oil Red O, crveno obojenje), za svaku koncentraciju po 5 parova slika.

3.4. Statističke metode

Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u slučaju raspodjele koja ne slijedi normalnu razdiobu, medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike između dviju nezavisnih skupina normalno raspodijeljenih numeričkih podataka testirane su Studentovim T-testom, a u slučaju kada varijable nisu slijedile normalnu raspodjelu koristio se neparametrijski analog (Kruskal-Wallis test). Statistička analiza učinjena je programom MedCalc (Version 20.027, MedCalc Software Ltd). P vrijednosti *P < 0,05, **P < 0,01 i ***P < 0,001 smatraju se statistički značajnim.

4. REZULTATI

Radi usporedbe različitih metoda ispitivanja citotoksičnosti AMD-a prema AGS stanicama, stanice su nasađene na ploču sa 96 jažica za potrebe MTT-a te na ploče sa 6 jažica za GSH i ORO bojanje. Korišten je RPMI-1640 medij uz 10 % FBS-a te 100 µg/ml streptomicina i 100 IU/ml penicilina na 37 °C i 5 % CO₂. Stanice su nakon postizanja visoke konfluentnosti 80 – 90 % tretirane AMD-om. Istraživanje je provedeno na AGS stanicama tretiranim AMD-om u dvije različite koncentracije (30 µM i 15 µM).

Za kvantifikaciju smanjenog preživljenja stanica tretiranih AMD-om u odnosu na kontrolnu skupinu, korištena je MTT analiza.

Značajno su niže vrijednosti pri koncentracijama od 30 µM AMD-a u odnosu na kontrolu (razlika -1,051; uz 95 % interval pouzdanosti razlike od -1,18 do -0,93; Studentov t-test, $P < 0,001$), kao i između kontrolne i skupine s koncentracijom od 15 µM AMD-a (razlika -0,56; uz 95 % interval pouzdanosti razlike od -0,79 do -0,33; Studentov t-test, $P < 0,001$) (Tablica 1).

Tablica 1. Stanično preživljenje AGS stanica nakon izlaganja različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata određeno MTT testom u odnosu na netretiranu kontrolu.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	<i>P</i> *
Kontrola	1,223 (0,2)		
30 µM AMD	0,172 (0,02)	-1,051 (od -1,18 do -0,93)	<0,001
Kontrola	1,223 (0,2)		
15 µM AMD	0,664 (0,33)	-0,56 (od -0,79 do -0,33)	<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.

Značajno su više vrijednosti pri koncentraciji od 15 µM AMD-a u odnosu na koncentraciju od 30 µM AMD-a (razlika 0,492, uz 95 % raspon pouzdanosti od 0,28 do 0,70; Studentov t test, $P < 0,001$) (Tablica 2).

Tablica 2. Stanično preživljenje AGS stanica nakon izlaganja različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata određeno MTT testom između različitih koncentracija AMD-a.

	Aritmetička sredina (SD)	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	P*
30 μ M AMD	0,172 (0,02)	0,492 (od 0,28 do 0,70)	<0,001
15 μ M AMD	0,664 (0,33)		

*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.

Za procjenu oksidativnog stresa stanice nakon tretiranja stanica različitim koncentracijama AMD-a, mjerena je količina GSH. Koncentracija glutationa izravno je proporcionalna izmjerenim apsorbancijama pri 415 nm.

Značajno su niže vrijednosti apsorbancije (pri 415 nm) pri koncentracijama od 15 μ M AMD-a u odnosu na kontrolu (razlika -0,007; uz 95 % interval pouzdanosti razlike od -0,013 do -0,001; Studentov t-test, P = 0,02), dok nema značajnih razlika između kontrole i skupine s koncentracijom od 30 μ M AMD-a (Tablica 3).

Tablica 3. Količina GSH nakon izlaganja AGS stanica različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata određeno GSH metodom u odnosu na netretiranu kontrolu.

	Aritmetička sredina (SD) nmol/ml uzorka	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	P*
Kontrola	0,061 (0,01)	-0,005 (od -0,0113 do 0,0007)	0,08
30 μ M AMD	0,056 (0,005)		
Kontrola	0,061 (0,01)	-0,007 (od -0,013 do -0,001)	0,02
15 μ M AMD	0,054 (0,004)		

*Studentov T-test; P vrijednosti *P < 0,05 smatrane su statistički značajnim. Prikazani podaci reprezentativni su za najmanje tri neovisna eksperimenta. AMD = Amiodaron; SD = standardna devijacija.

Uspoređujemo li koncentracije od 30 μ M AMD-a i 15 μ M AMD-a, uočavamo da nema značajnih razlika (Tablica 4).

Tablica 4. Količina GSH nakon izlaganja AGS stanica različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata određeno GSH metodom između različitih koncentracija AMD-a.

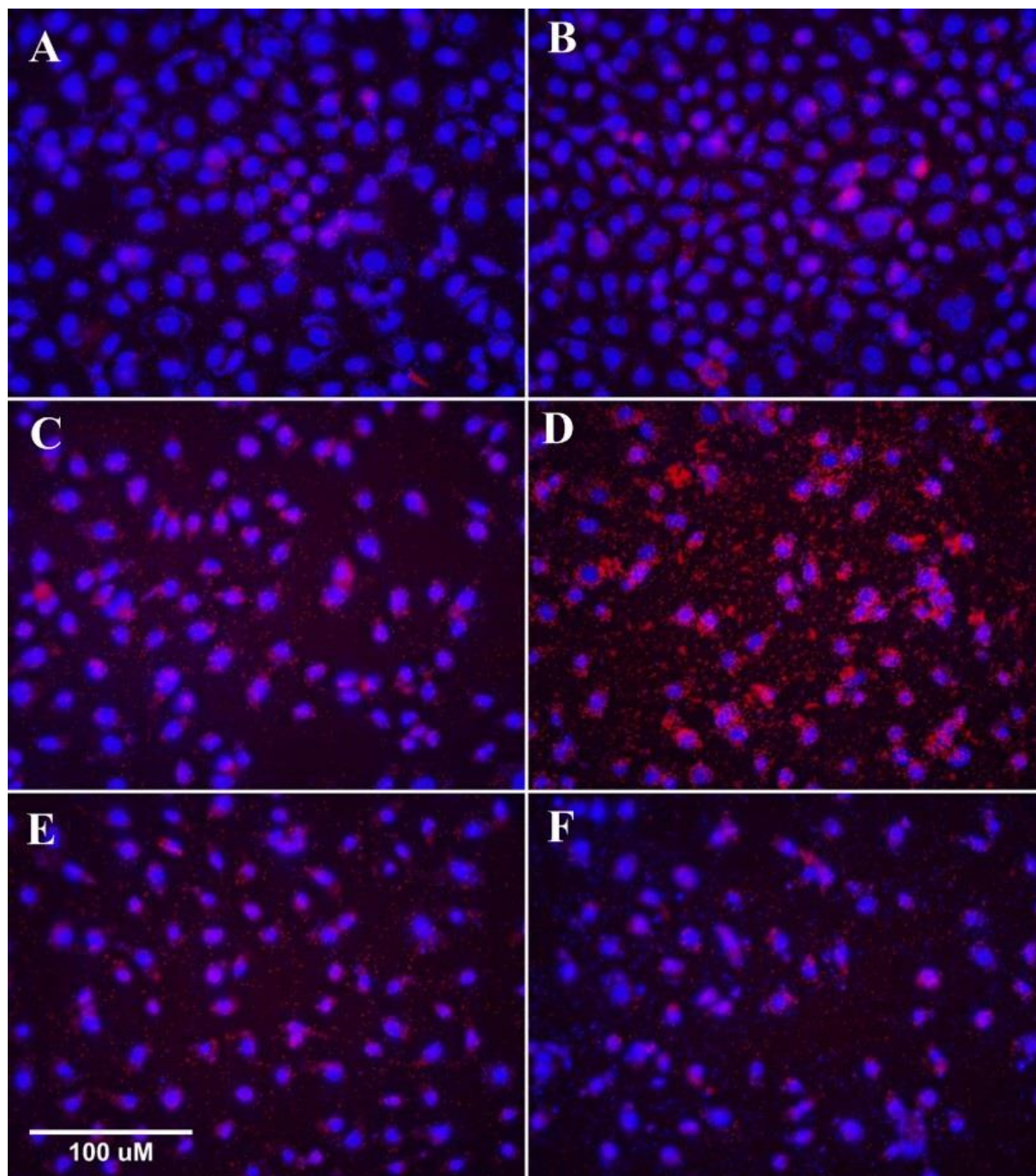
	Aritmetička sredina (SD) nmol/ml uzorka	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	<i>P</i> *
30 μ M AMD	0,056 (0,005)	-0,0016 (od -0,0049 do 0,0018)	0,35
15 μ M AMD	0,054 (0,004)		

*Studentov T-test; *P* vrijednost = 0,35 nije smatrana statistički značajnom. Prikazani podaci reprezentativni su za najmanje tri neovisna eksperimenta. AMD = Amiodaron; SD = standardna devijacija.

Za prikaz promjene u morfologiji stanica i distribucije lipidnih kapljica u stanicama tretiranim AMD-om, primijenjeno je ORO bojanje.

Promjene na AGS stanicama, nakon ORO bojanja, evaluirane su invertnim mikroskopom. Pri tome, uočeno je povećanje broja i veličine lipidnih kapljica u citosolu stanica tretiranih AMD-om (Slika C, D, E i F) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika A i Slika B). Vidljiva je razlika u broju lipidnih kapljica i između skupina stanica tretiranih koncentracijom 30 μ M AMD-a (Slika C i Slika D) i stanica tretiranih koncentracijom 15 μ M AMD-a (Slika E i Slika F). Najviše lipidnih kapljica vidi se pri visokoj koncentraciji AMD-a od 30 μ M (Slika D).

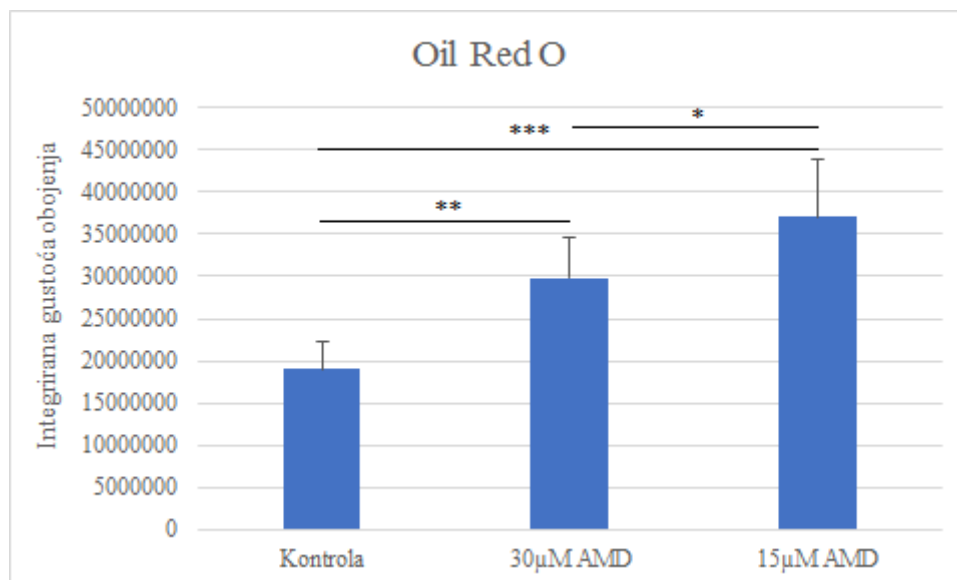
Osim toga, važno je uočiti i o dozi ovisno smanjenje broja stanica nakon tretmana AMD-om. Vidljivo je veliko smanjenje broja stanica koje su prethodno tretirane s 30 μ M AMD-a (Slika C i Slika D) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika A i Slika B). Isto tako, vidi se i smanjeni broj stanica tretiranih nižom koncentracijom AMD-a od 15 μ M (Slika E i Slika F) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika A i Slika B). Manje je vidljiva razlika u broju stanica između skupina tretiranih različitom koncentracijom AMD-a.



Slika 1. Mikroskopski prikaz lipidnih kapljica (crveno - ORO bojanje) i jezgri stanica (plavo - DAPI bojanje) u AGS stanicama tretiranim AMD-om tijekom 24h. A i B – RPMI-1640 (netretirana kontrola); C i D – amiodaron (30 μM AMD); E i F – amiodaron (15 μM AMD). Sliku je napravio autor korištenjem ImageJ 1.53c računalnim *softwareom*.

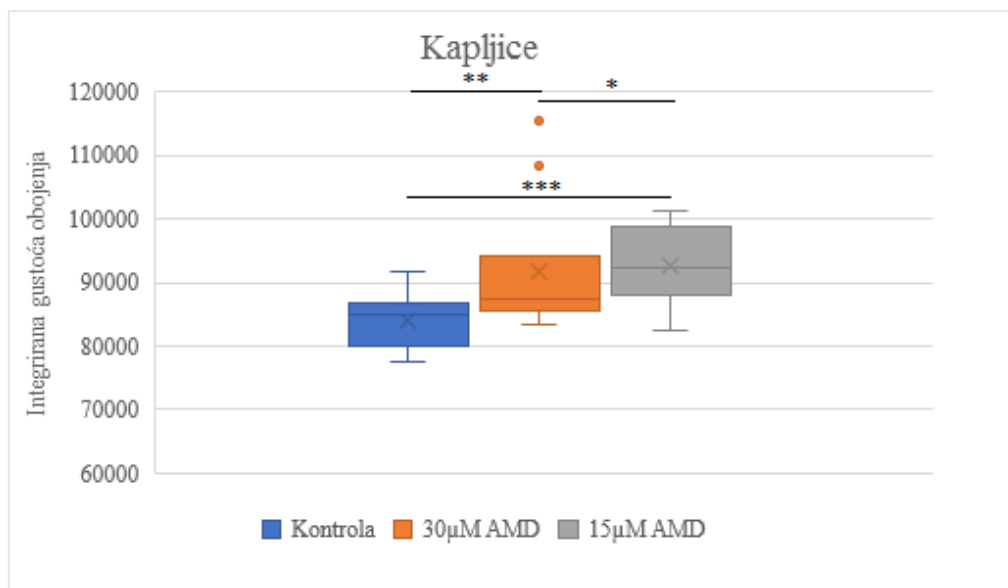
Na razini $P < 0,05$ ($P < 0,001$) uz vrijednost $F = 31,52$ značajno su više vrijednosti pri koncentraciji od 15 μM AMD-a u odnosu na kontrolu, isto kao i između kontrole i skupine od

30 μM AMD-a. Značajno su više vrijednosti pri koncentraciji od 15 μM u odnosu na koncentraciju od 30 μM AMD-a. Značajno su najviše vrijednosti zabilježene pri koncentraciji od 15 μM AMD-a (Slika 2).



Slika 2. Razlika u integriranoj gustoći obojenja (aritmetička sredina i standardna devijacija) AGS stanica među različitim skupinama primjenom ORO testa. Kontrola nije tretirana amiodaronom. Jednostrana ANOVA, $F(2, 29) = 31,52$, $P = 8,69 \times 10^{-8}$, post HOC Tukey HSD $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

Na razini $P < 0,05$ ($P = 0,017$) uz vrijednost $H_c = 8,18$ značajno su više vrijednosti pri koncentraciji od 15 μM AMD-a u odnosu na kontrolu, isto kao i između kontrole i skupine od 30 μM AMD-a. Uspoređujemo li koncentracije od 30 μM AMD-a i 15 μM AMD-a, uočavamo da nema značajnih razlika (Slika 3).



Slika 3. Razlika u integriranoj gustoći obojenja (aritmetička sredina i standardna devijacija) pojedinačne masne kapljice među različitim skupinama primjenom ORO testa. Kruskal-Wallis test za jednake medijane, $H(\chi^2) = 8,18$, $H_c(\text{tie corrected}) = 8,18$, $P = 0,017$; Dunnov post HOC test s Bonferonijevom korekcijom za broj grupa $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

5. RASPRAVA

AMD je antiaritmik koji se zbog svoje visoke lipofilnosti akumulira u masnom tkivu i dobro prokrvljenim organima kao što su jetra, pluća i koža (20). Koristi se za liječenje ventrikularne i supraventrikularne aritmije, no primjena mu je ograničena zbog ozbiljnih, životno opasnih nuspojava (21).

Svrha ovog istraživanja bila je ispitati preživljenje AGS stanica pri različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata izloženosti stanica. Mjerila se i količina GSH u tretiranim stanicama, u istim uvjetima, GSH metodom. ORO bojanjem dokazivale su se promjene u broju i morfologiji stanica te nastanak lipidnih kapljica kao posljedica tretiranja stanica.

U istraživanju koje je proveo Abičić 2018. godine, jetrene (Huh7) stanice nasađene su na ploče sa 6 jažica. Tretirane su AMD-om i tamoksifenom u dvije koncentracije (5 i 10 μM) nakon inkubacije od 24 sata. U stanicama tretiranim AMD-om i tamoksifenom, uočeno je povećanje broja i veličine lipidnih kapljica u odnosu na kontrolnu skupinu. Isto tako, dokazano je o dozi ovisno smanjenje broja jetrenih stanica nakon tretiranja stanica s 5 i 10 μM AMD-a i tamoksifena. Abičić je u svom istraživanju dokazao lipogeni učinak AMD-a i tamoksifena na jetrenim stanicama (17). U istraživanju koje smo proveli na AGS stanicama tretiranim različitim koncentracijama AMD-a tijekom 24 sata, također je dokazano povećanje broja i veličine lipidnih kapljica u tretiranim stanicama u odnosu na kontrolnu skupinu te je potvrđeno smanjeno stanično preživljenje u ovisnosti o dozi AMD-a. Ovo je istraživanje potvrdilo zaključke o AMD-u koje je Abičić dobio u svom radu.

Golli-Bennour i suradnici proveli su 2010. godine istraživanje na tri stanične linije i ispitali djelovanje AMD-a na ekstrakardijalna tkiva. Koristili su stanične linije hepatocita (HepG2), epitelne stanice (EAhy 926) i bubrežne stanice (Vero). Stanice su tretirane rastućim koncentracijama AMD-a (od 20 do 180 μM). Citotoksični učinak AMD-a na stanice ispitan je MTT testom nakon inkubacije od 24 sata. Rezultati su jasno pokazali da AMD inhibira staničnu proliferaciju i stvara ROS. Uočena je različita toksičnost AMD-a s obzirom na staničnu liniju te je bila značajno veća u bubrežnim i epitelnim stanicama nego u hepatocitima. HepG2 stanice bile su manje osjetljiva stanična linija na AMD, dok su Vero stanice bile najosjetljivije. Rezultati su dokazali da tretiranje AMD-om uzrokuje značajno o dozi ovisno smanjenje preživljenja stanica (10). U modelu AGS stanica koje smo koristili, AMD je imao jednak učinak kao na stanice ovog istraživanja. Tretiranje AMD-om dovodi do smanjenog staničnog preživljenja i to na način ovisan o dozi te je potvrđen njegov citotoksični učinak.

Durukan i suradnici 2012. godine svojim su istraživanjem dokumentirali citotoksične učinke AMD-a na medij stanične kulture i usporedili citoprotektivne učinke često korištenih antioksidansa. Korištena je L929 mišja stanična kultura fibroblasta. Prva skupina stanica tretirana je rastućim koncentracijama AMD-a (od 20 do 180 μM), a druga i treća skupina prethodno su izložene jednostrukoj ekvimolarnoj dozi vitamina C i N-acetil cisteina (NAC). Preživljenje stanica mjereno je nakon 24 sata MTT testom i uspoređen je citoprotektivni učinak navedenih agensa. Njihovo istraživanje dalo je zaključak da citotoksični učinak AMD-a do koncentracije od 80 μM nije značajno smanjio preživljenje stanica. Citotoksični učinak zabilježen je tek kod koncentracija 100 μM na više. U ovim koncentracijama su i vitamin C i NAC imali citoprotektivne učinke i povećali preživljenje stanica. U koncentracijama od 100, 140 i 180 μM vitamin C i NAC imali su jednake zaštitne učinke, dok je u koncentracijama od 120 i 160 μM vitamin C bio učinkovitiji (9). Rezultati na AGS stanicama potvrdili su citotoksični učinak AMD-a ovisan o dozi koji je ostvaren u ovom istraživanju.

Wu i suradnici 2008. godine koristili su AGS stanice za ispitivanje antiproliferativnog i kemosenzibilnog djelovanja luteolina. Luteolin je jedan od flavonida koji se često koriste. Njegovo je antikancerogeno djelovanje dokazano. Stanice su tretirane luteolinom u koncentracijama od 0, 10, 20 i 40 μM tijekom 24, 48 i 72 sata te je vitalnost stanica ispitana MTT testom. Njihovo istraživanje pokazalo je da luteolin inhibira rast stanica raka želuca na način ovisan o dozi i vremenu. Dokazali su da luteolin ima antiproliferativne i kemosenzibilne učinke na AGS stanice te da ima obećavajuću ulogu u liječenju raka želuca (22).

Jedno istraživanje na štakorima izvedeno je 2014. godine. Chakraborty i suradnici ispitivali su učinke izloženosti AMD-u na razvoj oksidativnog stresa u organima osjetljivima na stres kao što su bubrezi, jetra, nadbubrežna žlijezda i testisi. Mužjaci odraslih štakora podijeljeni su u dvije skupine, kontrolnu i tretiranu. Tretirana skupina kroz 30 dana oralno je dobivala AMD (0,17 mg/kg tjelesne težine). Izloženost AMD-u povećala je razinu LPO uz istovremeni porast aktivnosti katalaze i superoksid dismutaze u jetri, bubrezima i testisima u usporedbi s kontrolom. Zaključeno je da izloženost AMD-u razvija stres za metabolizam i 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 (12). Za razliku od ovog istraživanja, rezultati na AGS stanicama nisu dokazali učinak AMD-a na razvoj oksidativnog stresa te nisu potvrdili povećanu koncentraciju antioksidansa GSH u stanicama tretiranim AMD-om.

Toksičnost AMD-a ispitana je u brojnim istraživanjima, na različitim vrstama staničnih linija i različitim metodama. Tijekom 2014. godine Vitins i suradnici proveli su *in vivo* istraživanje na skupini miševa tretiranih AMD-om. Doze AMD-a su bile 0,2, 0,7, 2,2, 6,7, 20, 60, 180 mg/kg tjelesne težine. Testiranje je provedeno nakon 1, 4 i 11 dana liječenja. Svrha istraživanja je bila dokazati povezanost AMD-a s pojavom jetrene steatoze kroz ispitivanje markera steatoze kao što su kolesterol, trigliceridi i lipoproteini visoke gustoće (engl. *High density lipoproteine*, HDL). Istraživanje je pokazalo povećanje markera steatoze u jetri te smanjenje triglicerida u serumu osobito pri visokim koncentracijama AMD-a. Dokazano je da AMD igra ulogu u pojavi jetrene steatoze budući da su povećanje triglicerida u jetri, a smanjenje u serumu, te povećanje kolesterola i HDL-a u serumu karakteristični za steatozu. Povećani trigliceridi u jetri također upućuju na povećanu razinu lipida u stanicama te njihovo smanjeno lučenje kao još jednu karakteristiku steatoze. ORO bojanje, u jetrenim stanicama miševa, dokazalo je nakupljanje lipida tipično za mikrovezikularnu steatozu, najintenzivnije u centrolobularnoj regiji (23).

Ključno je definirati da je većina istraživanja, uključujući i ovo na AGS stanicama, dokazala da AMD izaziva o dozi ovisno smanjeno preživljenje stanica, kao i to da dovodi do masne promjene, odnosno uzrokuje povećanje lipidnih kapljica u tretiranim stanicama. U ovoj je studiji potvrđen lipogeni učinak AMD-a o kojem govori i istraživanje Vitinsa i suradnika, kao i istraživanje koje je proveo Abičić o kojem smo govorili ranije. Povećanje broja lipidnih kapljica te smanjeno preživljenje stanica ovisno o dozi AMD-a rezultati su koje je potvrdilo ovo istraživanje.

Važno je napomenuti da se u ovom istraživanju radila usporedba MTT testa, GSH metode i ORO bojanja pri čemu su MTT test i ORO bojanje dali očekivani rezultat i pokazali smanjeno preživljenje stanica ovisno o dozi te povećanu prisutnost lipidnih kapljica u stanicama tretiranim AMD-om. Za razliku od toga, GSH metoda u ovom istraživanju nije se pokazala učinkovitom i nije dokazala oksidativni stres i povećanu količinu antioksidansa, GSH, koji bi trebao biti prisutan u stanicama tretiranim AMD-om. Rezultati su jako slični kontroli, a kod stanica tretiranih s 15 μ M AMD-a postoji statistički značajna razlika s kontrolom koja bi čak govorila o protektivnom učinku AMD-a u toj koncentraciji.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Tretiranje AGS stanične linije AMD-om u koncentracijama od 30 i 15 μM pokazalo je smanjeno stanično preživljenje ovisno o dozi AMD-a.
2. GSH metoda nije pokazala povećanje količine GSH i dokazala posljedicu oksidativnog stresa stanica koji uzrokuje AMD.
3. ORO bojanjem dokazan je lipogeni učinak AMD-a.
4. Mikroskopski je utvrđen povećan broj i veličina lipidnih kapljica u stanicama tretiranim AMD-om u odnosu na kontrolnu skupinu.
5. Usporedbom MTT, GSH i ORO metode u dokazivanju citotoksičnosti AMD-a u koncentracijama 30 μM i 15 μM ; MTT test i ORO bojanje pokazali su smanjeno preživljenje stanica ovisno o dozi, dok GSH metoda nije dokazala pojavu oksidativnog stresa.

7. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Procijeniti postotak preživljenja humanih epitelnih gastričnih stanica (AGS) i izmjeriti količinu staničnog reduciranog glutaciona pri različitim koncentracijama tijekom 24 sata izloženosti amiodaronu, mikrofotografiranjem prikazati promjene morfologije stanica tretiranih amiodaronom, kao i nastanak i distribuciju lipidnih kaplica "Oil red O" bojanjem te usporediti IC50 amiodarona MTT-om, mjerenjem GSH-a i "Oil red O" bojanjem.

USTROJ STUDIJE: Istraživanje je provedeno kao randomizirani kontrolirani pokus.

MATERIJALI I METODE: Humana gastrična stanična linija (AGS) uzgajana je u RPMI-1640 mediju uz 10 % FBS i 100 µg/ml antibiotika/antimikotika, na temperaturi od 37 °C, u vlažnom atmosferskom zraku s 5 % CO₂. Stanice su uzgojene u pločama sa 96 jažica za potrebe MTT-a, a u pločama sa 6 jažica za GSH i Oil Red O bojanje. Tretirane su amiodaronom u koncentracijama od 30 µM i 15 µM. Promjene u vitalnosti stanica, količine GSH i pojava lipidnih kapljica u tretiranim stanicama u odnosu na kontrolu bilježene su tripanskim plavilom, MTT testom, GSH metodom i Oil Red O bojanjem.

REZULTATI: Djelovanje amiodarona u različitim koncentracijama dovelo je do o dozi ovisnog smanjenja broja AGS stanica u staničnoj kulturi. Tretiranje AGS stanica različitim koncentracijama amiodarona dovodi do povećanja broja i veličine lipidnih kapljica u citosolu AGS stanica.

ZAKLJUČAK: Usporedbom MTT, GSH i ORO metode u dokazivanju citotoksičnosti amiodarona u koncentracijama 30 µM i 15 µM; MTT i ORO pokazali su o dozi ovisno smanjenje broja stanica, dok GSH nije dokazao pojavu oksidativnog stresa. Oil Red O bojanjem dokazan je lipogeni učinak amiodarona.

KLJUČNE RIJEČI: AGS, amiodaron, glutation, kultura stanica, lipidne kapljice

8. SUMMARY

Comparison of different methods of testing the cytotoxicity of amiodarone in human gastric cell line (AGS)

OBJECTIVES: The aim of this study was to estimate the survival rate of human epithelial gastric cells (AGS) and to measure the amount of cellular reduced glutathione at different concentrations during 24 hours of amiodarone exposure, using microphotography show changes in the morphology of amiodarone-treated cells, as well as the formation and distribution of lipid droplets by “Oil red O” staining and compare the IC₅₀ of amiodarone by MTT, GSH measurement and “Oil red O” staining.

STUDY DESIGN: The study was conducted as a randomized controlled trial.

MATERIALS AND METHODS: The human gastric cell line (AGS) was grown in RPMI-1640 medium with 10 % FBS and 100 µg/ml antibiotics/antifungals, at 37 °C, in humid ambient air with 5 % CO₂. Cells were grown in 96-well plates for MTT and in 6-well plates for GSH and Oil Red O staining. They were treated with amiodarone at concentrations of 30 µM and 15 µM. Changes in cell vitality, GSH levels, and the appearance of lipid droplets in treated cells compared to controls were recorded by trypan blue, MTT assay, GSH method, and Oil Red O staining.

RESULTS: The action of amiodarone at different concentrations led to a dose-dependent decrease in the number of AGS cells in cell culture. Treatment of AGS cells with different concentrations of amiodarone leads to an increase in the number and size of lipid droplets in the cytosol of AGS cells.

CONCLUSION: By comparing MTT, GSH and ORO methods in proving the cytotoxicity of amiodarone at concentrations of 30 µM and 15 µM; MTT and ORO showed dose-dependent reduction in cell number, while GSH did not demonstrate the occurrence of oxidative stress. Oil Red O has proven the lipogenic effect of amiodarone.

KEYWORDS: AGS, amiodarone, cell culture, glutathione, lipid droplets

9. LITERATURA

1. Arango MT, Quintero-Ronderos P, Castiblanco J, Montoya-Ortíz G. Cell culture and cell analysis. U: Anaya JM, Shoenfeld Y, Royas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R., urednici. Autoimmunity: From Bench to Bedside. Bogota: El Rosario University Press; 2013. str. 741-54.
2. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to Cell Culture. *Methods Mol Biol.* 2012;806:1-13.
3. Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Radošević K. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 2016;11 (3-4):169-75.
4. Thermo Fisher Scientific Inc. Introduction to Cell Culture. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>. Datum pristupa: 7.8.2021.
5. ATCC. AGS. Dostupno na adresi: <https://www.atcc.org/products/crl-1739>. Datum pristupa: 7.8.2021.
6. Vassallo P, Trohman RG. Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications. *JAMA.* 2007;298(11):1312-22.
7. Niimi N, Yako H, Tsukamoto M, Takaku S, Yamauchi J, Kawakami E i sur. Involvement of oxidative stress and impaired lysosomal degradation in amiodarone-induced schwannopathy. *Eur J Neurosci.* 2016;44(1):1723-33.
8. Cayman Chemical. Amiodarone hydrochloride. Dostupno na adresi: <https://www.caymanchem.com/pdfs/15213.pdf>. Datum pristupa: 10.8.2021.

9. Durukan AB, Erdem B, Durukan E, Sevim H, Karaduman T, Gurbuz HA. May toxicity of amiodarone be prevented by antioxidants? A cell-culture study. *J Cardiothorac Surg.* 2012;7:61.
10. Golli-Bennour EE, Bouslimi A, Zouaoui O, Nouira S, Achour A, Bacha H. Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64(5):425-30.
11. Vujeva V. Ispitivanje stabilnosti glutationa u uzorcima plazme i krvi [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2019 [pristupljeno 16.08.2021.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:932719>.
12. Chakraborty A, Mondal C, Sinha S, Mandal J, Chandra AK. Amiodarone induced oxidative stress in stress-vulnerable organs of adult male rats. *Asian J Pharm Clin Res.* 2014;7(4):177-83.
13. Cindrić A. Djelovanje kofeina pri nastanku oksidativnog oštećenja i kristalizacije u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula LLC-PK1 [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2019 [pristupljeno 17.08.2021.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:244345>
14. Tipple TE, Rogers LK. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. *Methods Mol Biol.* 2012;889:315-24.
15. Fernandes Silva Santos L, Stolfo A, Calloni C, Salvador M. Catechin and epicatechin reduce mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by amiodarone in human lung fibroblasts. *J Arrhythm.* 2017;33(3):220-25.
16. Sultan Aslantürk Ö. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. U: Larramendy ML, urednik. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World.* London: IntechOpen; 2018. str. 1-17.
17. Abičić I. Osobitosti toksičnosti amiodarona i tamoksifena u modelu jetrenih (HuH7) stanica [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,

Medicinski fakultet Osijek; 2018 [pristupljeno 21.08.2021.] Dostupno na:
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:427706>.

18. Kim SI, Kim HJ, Lee HJ, Lee K, Hong D, Lim H i sur. Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Anal Biochem.* 2016;492:8-12.
19. Rajn M. Biološka evaluacija sintetiziranih metoksiflavona [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2019 [pristupljeno 04.01.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:162633>
20. Steinberg, E, Fluksman, A, Zemmour C, Tischenko K, Bluman-Karsch A, Brill-Karniely Y i sur. Low dose amiodarone reduces tumor growth and angiogenesis. *Sci Rep* 10. 2020; 18034. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75142-1>
21. Weng J, Tu M, Wang P, Zhou X, Wang C, Wan X i sur. Amiodarone induces cell proliferation and myofibroblast differentiation via ERK1/2 and p38 MAPK signaling in fibroblasts. *Biomed Pharmacother.* 2019; 115:108889. doi:10.1016/j.biopha.2019.108889.
22. Wu B, Zhang Q, Shen W, Zhu J. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line. *Mol Cell Biochem.* 2008; 313(1-2):125-32.
23. Vitins AP, Kienhuis AS, Speksnijder EN, Roodbergen M, Luijten M, van der Ven LTM. Mechanism of amiodarone and valproic acid induced liver steatosis in mouse in vivo act as a template for other hepatotoxicity models. *Arch Toxicol.* 2014; 88(8):1573–1588.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Nevena Jović

Datum i mjesto rođenja: 13.09.1997., Vukovar

Adresa: Školska 129, 32227 Borovo

Telefon: 0991905185

e-mail: nevenajovic03@gmail.com

Obrazovanje:

2004. – 2012. Osnovna škola Borovo, Borovo

2012. – 2016. Gimnazija Vukovar, Vukovar

2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2019. – 2022. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Osijeka Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku