

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Tomislav Kelava

**Učinak glukagona i cikličnog
adenozin-monofosfata na akutno
oštećenje jetre paracetamolom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2010.

Doktorska disertacija je izrađena na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Filip Čulo

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru , prof. dr. Filipu Čuli, na pomoći pri odabiru teme, pisanju publikacija i brojnim korisnim savjetima i razgovorima.

Zahvaljujem se dr. Ivanu Čavaru na pomoći pri planiranju i izvođenju svih pokusa, doc. dr. Katarini Vukojević i ostalim ljudima sa Zavoda za anatomiju, embriologiju i histologiju Medicinskog fakulteta u Splitu na pomoći oko izvođenja imunohistokemijske tehnike, prof. dr. Bojanu Poliću i prof. dr. Stipanu Jonjiću sa Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći te svim kolegama sa Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu koji su savjetima i susretljivošću znatno pridonijeli izradi ove disertacije.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na ljubavi i podršci.

1. UVOD	1
1.1. Paracetamol	1
1.1.1. Metabolizam paracetamola	1
1.1.2. Paracetamol i oštećenje jetre	3
1.1.3. Molekularna podloga toksičnosti	4
1.2. Biološki učinci NF- κ B i NO-a	7
1.3. cAMP	9
1.4. Glukagon	10
2. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA	14
2.1. Ciljevi istraživanja.....	14
2.2. Svrha istraživanja	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Pokusne životinje	16
3.2. Tvari i tretman životinja.....	16
3.3. Uspostava i mjerenje hepatotoksičnosti inducirane paracetamolom.....	17
3.4. Uporaba anestetika i analgetika.....	18
3.5. Krvarenje i uzimanje uzoraka krvi	18
3.6. Mjerenje koncentracije ALT-a u plazmi	18
3.7. Patohistološka analiza jetre	18
3.8. Imunohistokemijska analiza.....	20
3.9. Imunohistokemijska kvantifikacija	20
3.10. Određivanje koncentracije nitrita i nitrata u plazmi.....	21
3.11. Određivanje koncentracije GSH u jetri	21
3.12. Mjerenje koncentracije cAMP-a u jetri.....	21
3.13. Statistička obradba podataka	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Učinak glukagona na plazmatske koncentracije ALT-a i histopatološke promjene jetre u miševa s oštećenjem jetre koje je uzrokovano paracetamolom.....	23
4.1.1. Učinak glukagona primijenjenog u različitim vremenima prije ili nakon paracetamola na preživljenje miševa i plazmatske koncentracije ALT-a (vremenski odgovor)	26
4.2. Učinak db-cAMP-a i roliprama na plazmatske koncentracije ALT-a, histopatološke promjene i preživljenje miševa s oštećenjem jetre koje je uzrokovano paracetamolom	31

4.3. Učinak glukagona na koncentraciju ALT-a, koncentraciju nitrita i nitrata u plazmi, na izraženost iNOS-a i NF- κ B i na koncentraciju GSH i cAMP-a u jetri u različitim vremenima nakon otrovanja miševa paracetamolom	34
4.3.1. Koncentracija ALT-a.....	34
4.3.2. Koncentracija nitrita i nitrata.....	35
4.3.3. Imunohistokemijska analiza izraženosti iNOS-a u citoplazmi jetrenih stanica	37
4.3.4. Imunohistokemijska analiza aktivacije NF- κ B	37
4.3.5. Koncentracija GSH	41
4.3.6. Koncentracija cAMP-a	43
5. RASPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČCI	52
7. SAŽETAK.....	53
8. SUMMARY	55
9. LITERATURA.....	56
10. ŽIVOTOPIS	67

POPIS KRATICA

ALT – alanin aminotransferaza

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CO – ugljikov monoksid

CYP 450 – citokrom P450

DAB – diaminobenzidin

Db-cAMP – dibutiril ciklični adenzin monofosfat

DMF – N,N-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DTNB - 5,5-ditiobis 2-nitro-benzojeva kiselina

GSH – reducirani glutation

IL – interleukin

iNOS – inducibilna NO-sintaza

i.p. – intraperitonealno

LPS – lipopolisaharid

NAC – N-acetilcistein

NAPQI – N-acetil-p-benzokinonimin

NF- κ B – nuklearni čimbenik transkripcije kappa B

NO – dušikov-2-oksid

PDE—fosfodiesteraza

PG – propilen glikol

PGE2 – prostaglandin E2

PGI2 - prostaciklin

TNF – čimbenik nekroze tumora

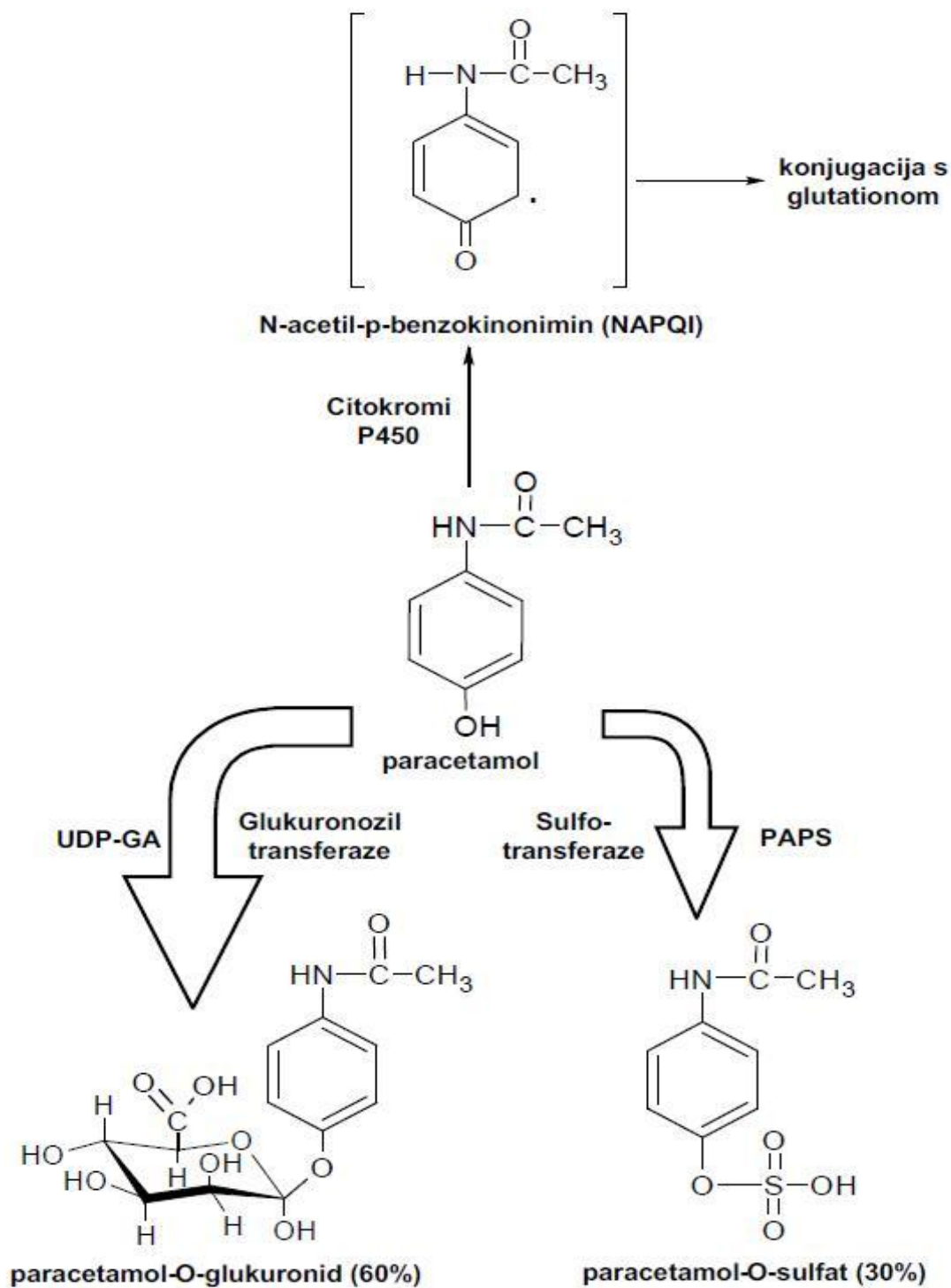
1. UVOD

1.1. Paracetamol

Paracetamol (acetaminofen; N-acetil-para-aminofenol; APAP) je kemijski spoj koji pripada skupini para-aminofenolskih spojeva, fenacetina i acetanilida (1, 2). Poput ishodišnih spojeva posjeduje analgetičko, antipiretičko i slabije protuupalno djelovanje. Paracetamol je jedan od najčešće korištenih lijekova u svijetu i dostupan je u slobodnoj prodaji, bez liječničkog recepta, sam ili u kombinaciji s drugim lijekovima. U preporučenim dozama paracetamol se smatra učinkovitim i sigurnim, a kao prednost u odnosu na nesteroidne protuupalne lijekove ističe se da njegova primjena nije praćena s visokom incidencijom gastrointestinalnog krvarenja niti s razvojem Reyeovog sindroma (3, 4).

1.1.1. Metabolizam paracetamola

Paracetamol se nakon oralne primjene brzo i gotovo u potpunosti apsorbira. Vršne plazmatske koncentracije postižu se za 30 – 60 minuta, jednoliko se distribuira u većini tjelesnih tkiva, a oko 20% paracetamola u krvi je vezano za bjelančevine plazme. Glavni način eliminacije paracetamola (90 – 95%) je konverzija u konjugate. Najvažnija mjesta konverzije su jetra i bubrezi, a osnovni metaboliti su glukuronski (60%), sulfatni (30%) i cisteinski konjugati (3%) (slika 1.1.). Oko 1-2% paracetamola se izlučuje urinom nepromijenjeno, a 5-10% paracetamola enzimi citokrom P450 (cyp 450) pretvaraju u visokoreaktivni spoj N-acetil-p-benzokinonimin (prema engl. N-acetil-p-benzoquinoneimin – NAPQI), koji ima kratko vrijeme poluživota od 0,7 sekundi. Pri niskim dozama NAPQI se brzo konjugira s glutathionom i ne uzrokuje oštećenje jetre, ali kod prekomjernih doza paracetamola NAPQI može u potpunosti iscrpiti zalihe jetrenog glutathiona i uzrokovati oštećenje jetre (5, 6). NAPQI se u toksikološkoj literaturi najčešće prikazuje kao kinonski radikal, ali u stvarnosti predstavlja ravnotežnu smjesu između fenoksi i kinonskog radikala. Pokusi sa sintetskim NAPQI-jem su pokazali da posjeduje sve kemijske, biokemijske i toksikološke odlike potrebne za objašnjenje toksičnosti paracetamola (7, 8).



Slika 1.1. Metabolizam paracetamola u jetri u terapijskim dozama. Glavni metaboliti su glukuronski (40-60%) i sulfatni (20-40%) konjugati, dok je stvaranje toksičnog metabolita, N-acetil-p-benzokinonimina (NAPQI) neznatno, te se učinkovito detoksificira konjugacijom s glutationom.

1.1.2. Paracetamol i oštećenje jetre

Paracetamol je prvi put povezan s akutnim oštećenjem jetre u pokusima na mačkama 1964. godine (9), a 1966. godine je prvi put zabilježen slučaj akutnog oštećenja jetre paracetamolom u čovjeka (10). Nakon što je osamdesetih godina prošlog stoljeća Aspirin doveden u vezu s nastankom Reyeovog sindroma, smanjuje se njegova uporaba, a dolazi do velikog povećanja uporabe paracetamola, a time dolazi i do sve češćih slučajeva otrovanja. U zadnja dva desetljeća, otrovanje paracetamolom je najčešći uzrok akutnog zatajenja jetre u zapadnom dijelu svijeta. Prema jednoj procjeni godišnje se hospitalizira više od 26000 ljudi zbog otrovanja paracetamolom, a prema drugoj otrovanje paracetamolom uzrokuje oko 500 smrti godišnje u SAD-u (11, 12).

Do akutnog oštećenja jetre dolazi tek u slučaju predoziranja ovim lijekom. Iako doza koja će uzrokovati oštećenje jetre znatno varira, smatra se da u slučaju uzimanja pojedinačne doze veće od 10 g ili 200 mg/kg (koja god je manja) postoji velika vjerojatnost oštećenja jetre (maksimalna pojedinačna terapijska doza ne bi smjela biti veća od 1 g, odnosno ukupna dnevna doza od 4 g u odraslih) (13). Čimbenici koji mogu povećati toksičnost paracetamola su starija i mlađa životna dob, gladovanje i interakcije s uzimanjem drugih sredstava koja induciraju jetrene enzime (alkohol, antiepileptici). Najčešći uzroci otrovanja su zabuna (djeca), nekritična primjena (starije osobe, psihički bolesnici, nedovoljna informiranost) i pokušaji suicida (4, 14).

Početni simptomi toksičnosti paracetamola su mučnina, povraćanje, proljev i abdominalna bol, a javljaju se nekoliko sati nakon otrovanja. Jetreno oštećenje postaje vidljivo 24 do 48 sati nakon ingestije, a praćeno je povišenom razinom serumskih aminotransferaza, laktat dehidrogenaze, bilirubina i produženim protrombinskim vremenom. Kod teških oštećenja može nastupiti encefalopatija, koma i smrt unutar nekoliko dana. Terapijski postupak obuhvaća ispiranje želuca tijekom prvih nekoliko sati, davanje aktivnog ugljena i prekursora glutaciona, acetilcisteina i metionina. Liječenje acetilcisteinom je učinkovito ako se započne unutar 8 sati od otrovanja. Zadnjih desetak godina pokušavaju se i različite preventivne mjere kao što su smanjenje broja tableta u kutiji i isticanje upozorenja na pakiranju, a predlaže se i ukidanje prodaje paracetamola bez liječničkog recepta (15, 16).

Zbog reproducibilnosti hepatotoksičnog učinka u laboratorijskih životinja (osobito u miševa), model akutnog toksičnog hepatitisa uzrokovanog paracetamolom je postao najčešći pokusni model za istraživanje toksičnog djelovanja ksenobiotika na jetru, što je vrlo važno u medicini jer je upravo hepatotoksičnost najčešće glavna prepreka za uvođenje najrazličitijih lijekova u kliničku primjenu (17, 18). Valja istaknuti da se kod miševa sva zbivanja nakon otrovanja paracetamolom zbivaju znatno brže nego u čovjeka. Tako, na primjer, do prvih vidljivih simptoma (hipotermija) dolazi već 2 sata poslije otrovanja, oštećenje jetre je vidljivo već nakon prva 2 do 2,5 sata, a acetilcistein je učinkovit u liječenju ako se primjeni u prvih 2 do 3 sata (19).

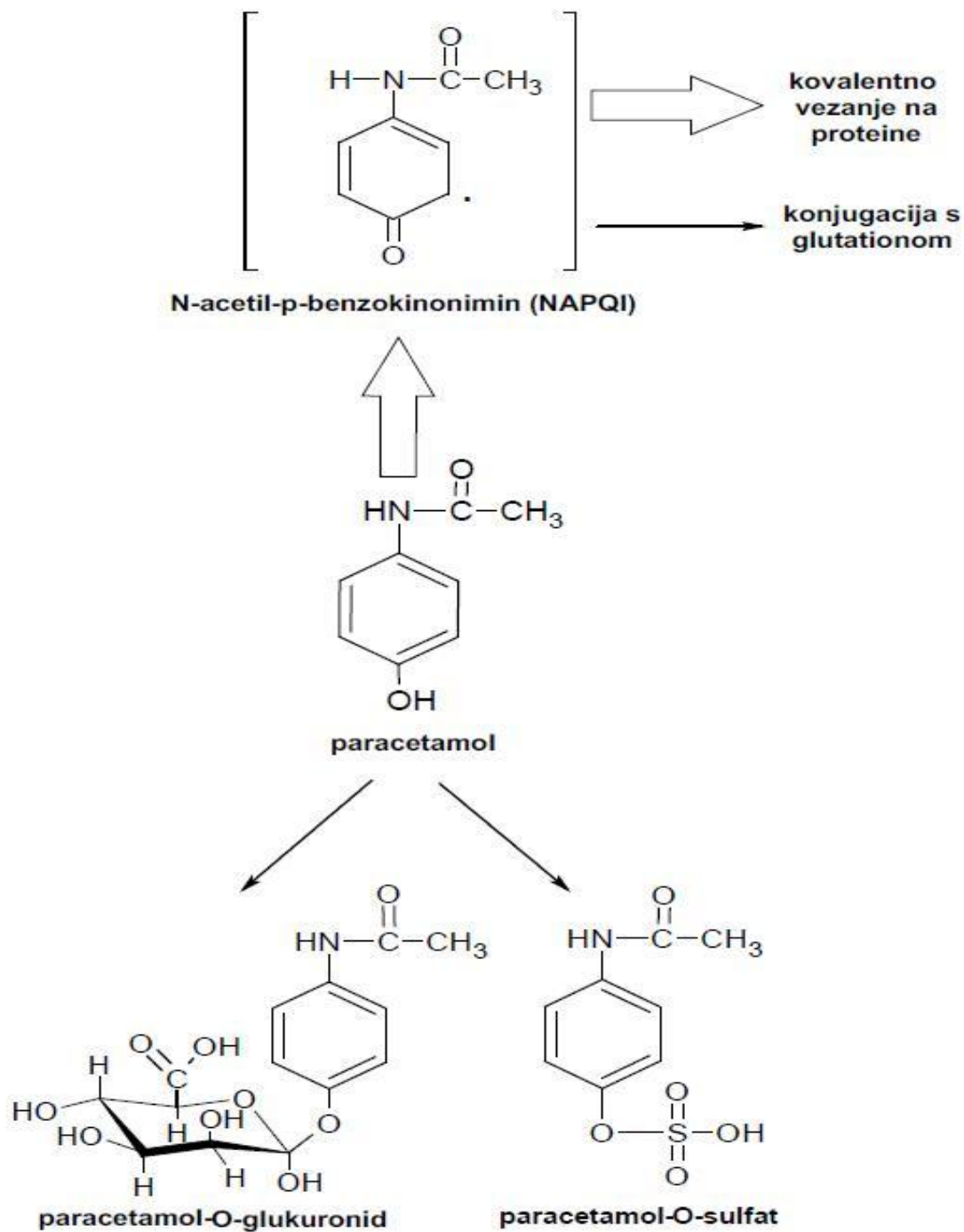
1.1.3. Molekularna podloga toksičnosti

Prema općenito prihvaćenoj teoriji o mehanizmu toksičnosti paracetamola, on je neutralan spoj koji sam po sebi nije toksičan. Do toksičnog djelovanja dolazi tek nakon njegove pretvorbe, pod utjecajem jetrenih miješanih oksidaza (P-450 ili CYPs, osobito izoforme CYP2E1, CYP3A4 i CYP3A1), u elektrofilni produkt - NAPQI. CYP enzimi su hemoproteini koji kataliziraju reakciju cijepanja molekularnog kisika pri čemu se jedan atom kisika veže s lijekom, a drugi s vodom (5, 20-23).

NAPQI se konjugira s glukuronskom i sumpornom kiselinom, a po njihovu iscrpljenju, i s glutationom (slika 1.2.). Glutation je tripeptid, sastavljen od cisteina, glutaminske kiseline i glicina, koji u jetrenim stanicama služi kao važni antioksidans. Normalno se u jetrenim stanicama nalazi u reduciranom obliku (GSH), a vežući se s različitim oksidansima prelazi u oksidirani oblik (GSSG), koji se kasnije može ponovno pretvoriti u GSH djelovanjem enzima glutation-reduktaze. Tek nakon iscrpljenja GSH dolazi do toksičnog djelovanja NAPQI-ja, vezanjem za stanične makromolekule, što dovodi do nekroze jetrenih stanica (osobito u centrolobularnim prostorima) (5, 6). Daljnji slijed događaja je predmet brojnih istraživanja i još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da je poremećaj funkcije mitohondrija jedan od glavnih uzroka smrti stanice jer dolazi do narušavanja energetske ravnoteže stanica (24), važnu ulogu mogao bi imati i ulazak kalcijevih iona u stanicu (25), također pokazano je da dolazi do stvaranja oksidativnih radikala, dušikovog-2-oksida (NO) i peroksinitrata (26, 27), koji dovode do iscrpljenja staničnih antioksidansa i lipidne peroksidacije te na taj način dalje oštećuju razne funkcije stanice. Neka su istraživanja pokazala da NAPQI uzrokuje i aktivaciju

endogenih nukleaza, što bi moglo dovesti do cijepanja molekule DNA i apoptoze stanica, ali se smatra da proces apoptoze nije glavni uzrok smrti stanica – prema jednom istraživanju nakon otrovanja paracetamolom apoptotički odumire manje od 10% hepatocita, a preostali dio nekrotički (28). Općenito se smatra da upalni medijatori imaju ulogu u patogenezi jetrenog oštećenja, vjerojatno naknadno ili usporedno s ovim biokemijskim oštećenjima. U posljednjih nekoliko godina jača spoznaja da patogeneza otrovanja paracetamolom ima dvije faze koje se međusobno nadopunjavaju i prožimaju. U prvoj fazi dolazi do kemijskog oštećenja hepatocita NAPQI-jem i drugim toksičnim metabolitima koji se kovalentno vežu na stanične molekule. U drugoj fazi raspad hepatocita uzrokuje aktivaciju upalnog odgovora koji može sudjelovati u dodatnom oštećenju jetre, ali prema nekim istraživanjima i poticati važne regenerativne mehanizme (29, 30).

U zadnja 3 desetljeća istražuje se utjecaj različitih proupalnih i protuupalnih tvari na ishod otrovanja paracetamolom i drugim ksenobioticima. U početku se uglavnom smatralo da prostanoidi i proupalni citokini pridonose toksičnom djelovanju tvari. Na primjer, pri primjeni toksične doze paracetamola, Kupfferove stanice u jetri luče prostaglandine i proupalne citokine, koji bi uzrokovali oštećenje jetrenih parenhimskih stanica (31). U prilog tome govore i nalazi da blokada Kupfferovih stanica gadolinij-kloridom smanjuje toksični učinak paracetamola (32). Međutim, u novije vrijeme je u nešto drukčijem modelu u kojem su Kupfferove stanice odstranjene, pokazano da te stanice imaju protektivno djelovanje (33). Također, pokazano je da prostaciklin (PGI₂) ima protektivan učinak na toksičnost paracetamola u miševa (34), a isto je kasnije dokazano i za prostaglandin E₂ (PGE₂) (35) i interleukin 1 (36), a za interleukin 1 je slično pokazano i u modelu akutnog oštećenja jetre zajedničkom primjenom D-galaktozamina (DGalN) i lipopolisaharida (LPS) u miševa (37). Zajedničko navedenim tvarima je da podižu razinu cikličnog adenzin monofosfata (cAMP-a) u jetri, a cAMP, kao što je detaljnije opisano kasnije, može imati brojne imunomodulatorne učinke (38).



Slika 1.2. Metabolizam paracetamola u jetri u slučaju predoziranja. Glukuronidacijski i sulfatacijski sustav nisu dostatni za detoksifikaciju paracetamola, te se značajno povećava stvaranje NAPQI-ja. GSH ne uspijeva detoksificirati velike količine NAPQI-ja, koji kovalentnim vezanjem na bitne stanične proteine uzrokuje nekrozu i apoptozu jetrenih stanica.

U posljednjih 15 godina je pokazano da nakon otrovanja paracetamolom dolazi do pojačane aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- κ B (prema engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i do pojačane izraženosti i aktivnosti enzima inducibilne NO sintaze (iNOS), što dovodi do pojačane proizvodnje dušikovog-2-oksida (NO-a) (26, 39). Uloga pojačane izraženosti i aktivnosti iNOS-a i NF- κ B u akutnom oštećenju jetre paracetamolom se intenzivno istražuje, ali još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.

1.2. Biološki učinci NF- κ B i NO-a

NF- κ B je obitelj transkripcijskih čimbenika koji dijele strukturnu podudarnost s retrovirusnim onkoproteinom v-Rel sačinjavajući tako novu skupinu proteina, NF- κ B/Rel, koja se sastoji od nekoliko strukturno povezanih proteinskih molekula koje tvore homodimere ili heterodimere. U sisavaca NF- κ B obitelj čini 5 proteina, i to NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB i c-Rel, a njihovom kombinacijom nastaju spomenuti homodimeri ili heterodimeri. U stanicama sisavaca najučestaliji i najvažniji heterodimer je p50/p65 za kojeg je NF- κ B zapravo sinonim (40). NF- κ B je prisutan u gotovo svim vrstama stanica (ubikvitarnost) i uključen je u odgovor organizma na različite poticaje poput stresa, citokina, ultraljubičastog zračenja, slobodnih radikala, bakterijskih i virusnih antigena. NF- κ B igra ključnu ulogu u regulaciji imunog odgovora domaćina na infekciju. Nasuprot tomu, nepravilna regulacija NF- κ B je povezana s brojnim bolestima kao što su karcinom, autoimune i upalne bolesti, septički šok, virusne infekcije i dr (41, 42). NF- κ B pripada skupini “brzo djelujućih” primarnih transkripcijskih faktora (tu još spadaju c-Jun, STAT, i nuklearni hormonski receptori) koji su prisutni u stanicama u inaktivnom stanju i ne zahtijevaju novu sintezu proteina da bi bili aktivirani. Naime, u inaktivnom stanju NF- κ B se nalazi vezan u citoplazmi za skupinu proteina nazvanih I κ B (prema engl. inhibitor of κ B) koji sadrže multiple kopije sekvenci nazvanih ankirinski ponavljajući sljedovi, a pomoću kojih se maskiraju aktivacijski signali sadržani u NF- κ B (40). Stimulacijom različitih receptora na staničnoj membrani dolazi do brze aktivacije NF- κ B tako što se najprije degradira I κ B, primarno putem aktivacije I κ B-kinaze (IKK). Djelovanjem IKK dolazi do fosforilacije, ubikvitinacije i degradacije I κ B u proteasomima. Time NF- κ B biva oslobođen iz spoja s I κ B, ulazi u jezgru gdje potiče ekspresiju specifičnih gena što rezultira zadanim fiziološkim odgovorom, npr. upalnim i imunološkim odgovorom, staničnom proliferacijom i dr. NF- κ B potiče ekspresiju gena koji kodiraju različite upalne medijatore, uključujući iNOS, TNF- α , IL-

1 i IL-10 i hem-oksigenazu 1. NF- κ B potiče i ekspresiju gena koji kodiraju I κ B koji se onda ponovno veže za NF- κ B i inhibira ga, dakle postoji mehanizam samokontrole (autoregulacije) (43-45).

NO-sintaze su skupina enzima zaduženih za proizvodnju NO-a iz L-arginina. NO je važna signalna molekula s brojnim biološkim funkcijama: djeluje kao vazodilatator i neurotransmiter, a također je važan produkt fagocita i djeluje toksično na mnoge bakterije. Odgovarajuće doze NO-a u tijelu su potrebne za obranu organa (jetre, pluća...) od ishemije, međutim stvaranje prekomjernih količina NO-a može dovesti do različitih poremećaja. Smatra se da akutno povećanje NO-a doprinosi razvoju septičnog šoka, a kronično povišena razina NO-a se povezuje s razvojem juvenilnog diabetesa mellitusa, multiple skleroze, ulceroznog kolitisa i brojnih drugih bolesti (46, 47).

Postoje tri izoforme NO-sintaza. Dvije izoforme su konstitucijske (cNOS prema engl. constitutive NO synthase) – jedna u endotelnim stanicama (eNOS prema engl. endothelial NO synthase ili NOS3), a druga u živčanim stanicama (nNOS prema engl. neuronal NO synthase ili NOS1). Inducibilna izoforma, iNOS ili NOS2, u normalnim stanjima je slabo izražena ili uopće nije izražena, dok nakon davanja proupalnih faktora i u nekim patološkim stanjima može doći do značajnog povećanja njene izraženosti u mnogim tjelesnim organima: slezeni, plućima, jetri i bubrezima (46, 47).

U životinja intoksiciranih paracetamolom izrazito se povećava sinteza NO-a, najvjerojatnije zbog pojačanog stvaranja TNF- α , koji preko povećanja aktivnosti NF- κ B dovodi do pojačanja izraženosti i aktivnosti iNOS-a, pa se posebna pažnja posvećuje istraživanju uloge NO-a u mehanizmu oštećenja jetre paracetamolom (26). Dobiveni su proturječni rezultati, no većina autora se slaže da male, bazalne količine NO-a (koje stvara cNOS) imaju protektivno djelovanje, dokaz tome je da su miševi tretirani s neselektivnim blokatorima NO-sintaza (koji blokiraju sve tri sintaze) podložniji toksičnom učinku paracetamola (48). Međutim za velike količine NO-a proizvedene djelovanjem enzima iNOS-a, čiju ekspresiju i aktivaciju potiče paracetamol, postoje proturječni dokazi. Prekomjerne količine NO-a prema nekim istraživanjima smanjuju sintezu proteina i DNA u jetri i inhibiraju katalazu. Također, NO reagira sa superoksidnim anionom, stvarajući peroksinitrit, vrlo potentni oksidans, koji dalje reagira sa sulfhidrilnim grupama dovodeći do lipidne

peroksidacije i smrti stanica. U miševa s odstranjenim genom za enzim iNOS (iNOS knock-out miševi) vidjelo se da je toksičnost paracetamola manja nego u normalnih (divljih) miševa (27). Također je pokazano da ONO 1714, specifični inhibitor iNOS-a ima protektivan učinak (49). No, postoje i istraživanja koja pokazuju da VPYRRO/NO, tvar koja otpušta NO (NO-donor) i povećava razinu NO-a u jetri, smanjuje toksični učinak paracetamola, ali i u ovim istraživanjima ekspresija iNOS-a je bila snižena (50). Iako postoje brojne tvari i stanja koja potiču izraženost i aktivnost iNOS-a u tkivima, za vrlo mali broj spojeva je pokazano da smanjuju njegovu aktivnost i izraženost. Od prirodnih spojeva takvo je djelovanje pokazano samo za PGE₂ (za kojeg smo već prije spomenuli da štiti od toksičnog djelovanja paracetamola) i LTB₄ (51), a nedavno je pokazano u pokusima *in vitro* i *in vivo* da takvo djelovanje u jetri imaju i hormon glukagon i njegov sekundarni glasnik – cAMP (52, 53).

1.3. cAMP

cAMP je unutarstanični posrednik mnogih vitalnih fizioloških procesa u organizmu. Otkriven je prije pedesetak godina kad se vidjelo da je posrednik (sekundarni glasnik) u metaboličkom djelovanju adrenalina i glukagona. Sintetizira ga adenilil-ciklaza, enzim koji se nalazi na unutarnjoj strani membrane mnogih stanica, a razgradnju cAMP-a obavlja fosfodiesteraze (PDE), od kojih je najvažnija izoforma PDE-4 (54). Osim kao sekundarni glasnik velikog broja hormona, cAMP sudjeluje i u regulaciji mnogih fizioloških procesa, kao što su lipoliza, steroidogeneza, metabolizam kalcija, metabolizam ugljikohidrata u jetri, neurobiološki procesi, kontraktilnost miokarda i dr. Budući da cAMP sudjeluje u brojnim biološkim procesima, drži se da poremećaj u metabolizmu cAMP-a i njegovih derivata može biti uzrokom do 50% kroničnih, degenerativnih bolesti. Osobito je važno njegovo modulatorno (općenito supresivno) djelovanje na upalne i imunološke reakcije, što se nastoji iskoristiti za sintezu i primjenu novih lijekova za liječenje kroničnih upalnih bolesti (55-57). Općenito se drži da je supresivno djelovanje cAMP-a u kroničnim upalnim reakcijama ostvareno njegovim inhibicijskim djelovanjem na proupalne medijatore, kao što su citokini i prostaglandini. Međutim, djelovanje cAMP-a na pojedine medijatore je selektivno. Poznato je da jedan od najvažnijih proupalnih citokina – TNF- α stimulira sintezu cAMP-a, a ovaj povratno inhibira stvaranje TNF- α (58), a da pritom ne utječe na sintezu IL-1 (22, 59), stimulira proizvodnju IL-6 (59, 60) i stimulira sintezu imunosupresijskog citokina IL-10 (22). Između sinteze PGE₂ i cAMP-a postoji međusobna pozitivna povratna sprega, t.j. jedan potiče

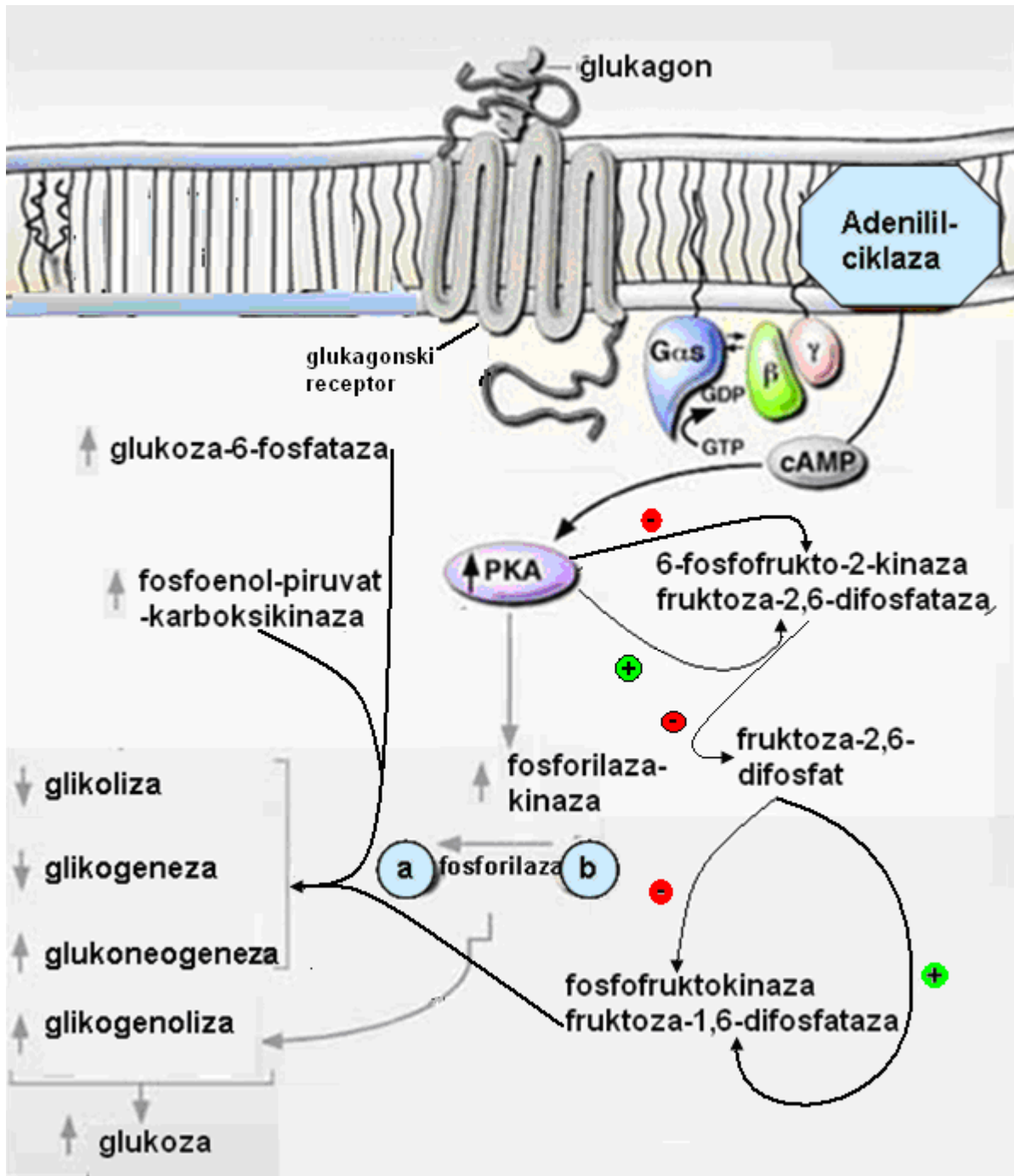
sintezu drugoga (61, 62). Mnogi od ovih medijatora imaju ulogu u oštećenju jetre raznim tvarima, kao i u regeneraciji jetre nakon parcijalne hepatektomije (63). Primjerice, u modelu oštećenja jetre LPS-om i D-galaktozaminom, glavni medijator toksičnosti je TNF- α (64). Arai i suradnici su pokazali da dibutiril cAMP (db-cAMP, stabilni analog cAMP-a) ima protektivan učinak u ovom modelu oštećenja jetre i da je taj učinak vjerojatno posredovan inhibicijskim djelovanjem cAMP-a na sintezu TNF- α (65). Kao što smo ranije spomenuli, PGE2 i interleukin 1 smanjuju oštećenje jetre izazvano paracetamolom, a zajedničko navedenim tvarima je da podižu razinu cAMP-a u jetri. Također je pokazano da N-acetil-L-cistein (lijek izbora pri otrovanju paracetamolom - antidot) podiže razinu cAMP-a u modelu oštećenja jetre ishemijom (66). Čini se da bi jedan dio protekcije koje ostvaruju ove različite tvari mogao biti posredovan povećanjem razine cAMP-a u jetri. Tvari koje izazivaju najjače povećanje razine cAMP-a u jetri su glukagon – aktivator adenilil-ciklaze i rolipram – specifični inhibitor PDE-4, enzima koji razgrađuje cAMP u stanicama (67).

1.4. Glukagon

Glukagon je probavni hormon kojeg proizvode α stanice Langerhansovih otočića u gušterači. Po sastavu je polipeptid, sastavljen od 29 aminokiselina, molekularne težine 3485 daltona. Najvažniji poticaj za lučenje glukagona je niska razina glukoze u krvi, a zatim i povećana razina aminokiselina u krvi, adrenalin i kolekistokinin, dok lučenje glukagona suzbijaju somatostatin, inzulin i povećana količina masnih kiselina i glukoze u krvi. Glavninu svojih učinaka glukagon ostvaruje vezanjem za glukagonski receptor na hepatocitima, iako receptori za glukagon postoje i u bubregu, srcu, slezeni, gušterači, mozgu i gastrointestinalnom traktu. Glukagonski receptor pripada skupini receptora udruženih s G-bjelančevinom (prema engl. G-protein coupled receptors). Vezanjem glukagona za glukagonski receptor dolazi do spajanja receptora s G-bjelančevinom. Čini se da su barem dvije vrste G-bjelančevina uključene u prijenos signala nakon vezanja glukagona: G α i G q . G α aktivira adenilil-ciklazu i povećava unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a. G q aktivira fosfolipazu C, koja povećava stvaranje inozitol-trifosfata koji povećava razinu unutarstaničnog kalcija. Za većinu glukagonovih učinaka važnija je aktivacija G α . Povišena koncentracija cAMP-a aktivira protein kinazu A (PKA), a PKA zatim započinje slijed fosforilacija s pomoću kojih se kovalentnom modifikacijom aktiviraju ili deaktiviraju brojni enzimi. PKA aktivira fosforilaza-kinazu, koja zatim aktivira fosforilazu, što dovodi do

razgradnje glikogena. Povećava se i aktivnost glukoza-6-fosfataze, enzima bitnog za otpuštanje glukoze iz jetre u krv, a smanjuje aktivnost glikogen-sintaze. PKA aktivira fruktoza-2,6-fosfatazu koja smanjuje razinu fruktoza-2,6-difosfata, a snižena razina fruktoza-2,6-difosfata aktivira fruktoza-1,6-difosfatazu, što povećava glukoneogenezu. Aktiviraju se i drugi enzimi važni za glukoneogenezu: piruvat-karboksilaza i fosfoenol-piruvat-karboksikinaza, a smanjuje se aktivnost glikolitičkog enzima piruvat-kinaze (slika 1.3.) (68-70).

Glavni učinci glukagona su poticanje glikogenolize i glukoneogeneze u jetri, što dovodi do povećanja razine glukoze u krvi. Također, glukagon koči sintezu glikogena i glikolizu, povećava β -oksidaciju masnih kiselina, a smanjuje sintezu triglicerida i kolesterola u jetri. Učinci glukagona na metabolizam su suprotni učincima inzulina (kontraregulacija). U velikim koncentracijama glukagon može pojačati kontraktilnost srca i lučenje žuči, te smanjiti želučanu sekreciju i pokretljivost (69, 71, 72). U kliničkoj praksi najčešća indikacija za primjenu glukagona je liječenje teške hipoglikemije, a najčešće se primjenjuje u obliku intramuskularne injekcije. Postoje i podatci da se u visokim dozama može upotrijebiti kao protuotrov pri liječenju otrovanja beta-blokatorima. Kao moguće objašnjenje ovog učinka navodi se da beta-blokatori sprječavaju vezanje adrenalina i noradrenalina za beta-adrenergičke receptore i tako smanjuju razinu cAMP-a u miokardu, a glukagon bi u tom slučaju mogao djelovati kao protuotrov mehanizmom premoštenja (engl. bypassing), jer dovodi do povećanja razine cAMP-a u miokardu neovisno o aktivaciji beta-adrenergičkih receptora (69, 72).



Slika 1.3. Osnovni učinci glukagona. Vežanjem glukagona za glukagonski receptor aktivira se adenilil-ciklaza, koja povećava razinu cAMP-a, što dovodi do aktivacije PKA, koja započinje niz fosforilacija što dovodi do povećanja ili smanjenja aktivnosti brojnih enzima, što u konačnici dovodi do povećanja glukoneogeneze i glikogenolize, a smanjenja glikogeneze i glikolize. cAMP – ciklični adenozin monofosfat, PKA – protein kinaza A. Prema Jiang I sur. (*Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:671-678, 2003.)

Nedavno je pokazano, u dvama odvojenim istraživanjima, da glukagon posjeduje i, potencijalno važan, hepatoprotektivan učinak u dva različita modela oštećenja jetre: 1) u modelu oštećenja jetre LPS-om (52) i 2) u modelu inducirane apoptoze jetre Fas agonistom - JO2 (73). Budući da je u oba istraživanja sličan učinak dobiven i s drugim tvarima koje podižu razinu cAMP-a u jetri (rolipram, db-cAMP, forskolin) pretpostavlja se da je hepatoprotektivan učinak glukagona posredovan povećanjem razine cAMP-a. U modelu oštećenja jetre LPS-om pokazano je da je protektivan učinak glukagona i cAMP-a posredovan blokadom izraženosti i aktivnosti iNOS-a, koji vjerojatno igra ulogu i u oštećenju jetre izazvanom s JO2, kao i u mnogim drugim modelima oštećenja jetre. Osim hepatoprotekcije u ovim modelima, pokazano je i da glukagon i druge tvari koje povećavaju razinu cAMP-a produljuju život presađaka jetre za vrijeme hladne prezervacije organa (74, 75). Učinci db-cAMP-a, glukagona i roliprama na akutno oštećenje jetre paracetamolom nisu do sada istraživani.

2. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj naših istraživanja bio je istražiti učinak glukagona i drugih tvari koje povisuju unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a na akutnu hepatotoksičnost paracetamola.

Da bismo istražili mehanizme kojima glukagon ostvaruje svoje učinke istražili smo njegov učinak na nekoliko metaboličkih putova koji se aktiviraju pri toksičnom djelovanju paracetamola. Specifično, istraživali smo učinak glukagona na:

- 1) izraženost iNOS-a u jetri i razinu nitrita i nitrata u plazmi u različitim vremenima nakon otrovanja paracetamolom,
- 2) koncentraciju GSH u različitim vremenima nakon otrovanja paracetamolom,
- 3) koncentraciju cAMP-a u različitim vremenima nakon otrovanja paracetamolom,
- 4) razinu aktivacije NF- κ B potaknute paracetamolom.

Hipoteza istraživanja je bila da glukagon, preko svojeg sekundarnog glasnika cAMP-a ima protektivan učinak na akutno oštećenje jetre izazvano paracetamolom i da je taj učinak jednim dijelom posljedica inhibicije enzima iNOS-a.

2.2. Svrha istraživanja

Otrovanje paracetamolom je, u posljednja dva desetljeća, najčešći uzrok akutnog zatajenja jetre u zapadnom dijelu svijeta, a pokusni model akutne toksičnosti paracetamola je najčešći model na kojem se istražuju opća načela hepatotoksičnosti i njene prevencije prilikom primjene raznih ksenobiotika. Intenzivna istraživanja u ovom modelu su uvelike pridonijela boljem razumjevanju patogenetskih mehanizama oštećenja jetre paracetamolom i drugim kemijskim tvarima. Ipak, mehanizmi oštećenja su izuzetno složeni i još uvijek nedovoljno razjašnjeni, pa su potrebna nova istraživanja. Čini se da upalni i imunološki procesi igraju važnu ulogu u patogenezi toksičnih oštećenja tkiva pri akutnoj intoksikaciji organizma paracetamolom. S druge strane, cAMP i tvari koji podižu razinu cAMP-a općenito imaju protuupalno i imunosupresivno djelovanje, pa bi povećanje njegove razine u organizmu moglo djelovati povoljno na procese hepatotoksičnosti. Do sada je pokazana

hepatoprotektivna uloga cAMP-a i glukagona u dva modela oštećenja jetre, te da presadci jetre, za vrijeme hladne prezervacije organa, dulje preživljavaju ako se čuvaju u otopini kojoj je dodan glukagon. Učinak cAMP-a i glukagona u modelu oštećenja jetre paracetamolom, kao ni mogući učinak otrovanja paracetamolom na promjenu razine cAMP-a u jetri do sada nisu istraživani. Istraživanje mogućeg hepatoprotektivnog djelovanja je osobito važno, jer cAMP sudjeluje, kao sekundarni glasnik, u regulaciji mnogih fizioloških procesa, kao što su lučenje i djelovanje brojnih hormona, lipoliza, metabolizam ugljikohidrata i kalcija, brojni neurofiziološki procesi, kontrola rasta i proliferacije stanica i dr. Štoviše, drži se da su mnoge učestale kronične bolesti u ljudi konačno povezane s nedostacima u stvaranju ili djelovanju cAMP-a. Usto, ima puno sredstava (a neprekidno se sintetiziraju nova) kojima se može modulirati razina cAMP-a u stanici.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pokusne životinje

U svim pokusima su upotrijebljeni miševi visokosrodnih sojeva CBA/H Zg, mužjaci, stari 12-20 tjedana i uzgojeni na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Pokusne životinje su držane u standardnim laboratorijskim uvjetima; regulirani 12 h ciklus svjetla i tame, temperatura prostorije 22 ± 2 °C, vlažnost zraka $50 \pm 5\%$, te sterilizacija kaveza i stelje dvaput tjedno. Pokusne životinje su držane u makrolonskim kavezima u skupinama 6-8 odnosno 10-20 miševa, ovisno o veličini kaveza. Hranjene su kolačima za miševе (Kat. br. 4RF21, Diet Standard, Milano, Italija) uz povremeni tjedni dodatak domaćih kolača sa sastojcima vitamina. Svi postupci na životinjama su bili odobreni od Etičkog povjerenstva za rad s pokusnim životinjama Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. (rješenje broj 04-76/2008-840).

3.2. Tvari i tretman životinja

Na-fenobarbiton i trikloroocetna kiselina su nabavljeni od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska). Čistu supstanciju paracetamola smo dobili kao poklon od farmaceutske tvrtke Belupo (Koprivnica, Hrvatska). GSH, goveđi serumski albumini, 5,5-ditiobis 2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB), Bradfordov reagens, dibutiril-cAMP i rolipram su nabavljeni od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD). Glukagon je nabavljen od tvrtke Novo Nordisk (Kopenhagen, Danska). Primarna (IgG) poliklonska kunićja protutijela na p65 NF- κ B (kat.br. sc-109) i iNOS (kat. br. sc-651) te sekundarna (IgG) kozja protukunićja protutijela (kat. br. sc-2004) su nabavljena od tvrtke Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, SAD).

Rolipram, db-cAMP i glukagon su otopljeni u fiziološkoj otopini i uštrcani intraperitonealno u slijedećim dozama: 0,05, 0,5 i 1,5 mg/kg za glukagon, 25 mg/kg za db-cAMP i 8 mg/kg za rolipram. Doze db-cAMP i roliprama za *in vivo* primjenu su odabrane na temelju dostupnih podataka u literaturi (65, 76-78) ili podataka o toksičnosti dobivenih na temelju naših preliminarnih istraživanja u kojima su praćeni učinci navedenih tvari na razinu ALT-a u plazmi i/ili preživljenje, te na histopatološke promjene u jetri tretiranih životinja. Za db-cAMP su u različitim modelima testirane doze od 2,5 do 125 mg/kg, pri čemu je spoj pri

dozi od 25 mg/kg ili više pokazivao izražen biološki učinak (65, 76-78). Slično tome, rolipram je očitovao biološki učinak u rasponu doza od 0,1 do 30 mg/kg (79-81), pri čemu je ED₅₀, procijenjena na temelju pada razine ALT-a ili TNF- α , iznosila oko 3,5 mg/kg (81).

Sve tvari su uštrcane u volumenu od otprilike 0,2 mL po pokusnoj životinji (10 μ L/g) u različitim vremenima prije odnosno nakon paracetamola. Životinje u kontrolnim skupinama su primile fiziološku otopinu na jednak način i u jednakom volumenu.

3.3. Uspostava i mjerenje hepatotoksičnosti inducirane paracetamolom

S ciljem indukcije jetrenih enzima, citokroma P450 (CYPs), miševi su tijekom 7 dana u vodi za piće dobivali Na-fenobarbiton (0,3 g/L). Noć uoči pokusa (14-16 h prije primjene paracetamola) životinjama je uklonjena hrana. Životinje su izvagane i odgovarajuća doza paracetamola je uštrcana i.p. u volumenu 0,4-0,5 mL (20 μ L/g). Paracetamol je otopljen u toplom PBS-u (40 °C) uz stalno miješanje na magnetskoj mješalici. Životinje su nakon toga još 4 h ostavljene bez hrane (34, 36, 82). U svrhu praćenja preživljenja životinja, paracetamol je uštrcan u dozi od 300 mg/kg, koja je u našim preliminarnim istraživanjima uzrokovala smrtnost u 43-72% tretiranih miševa. Preživljenje miševa je praćeno kroz 48 h nakon uštrcavanja paracetamola, jer gotovo sve životinje uginu ili se u potpunosti oporave unutar tog perioda. Za određivanje koncentracije alanin-aminotransferaze (ALT) nitrita i nitrata u plazmi, za histopatološku, imunohistokemijsku analizu jetrenih rezova te za mjerenje koncentracije GSH i cAMP-a u homogenatima jetre, miševi su tretirani visokom subletalnom dozom paracetamola (150 mg/kg). Uzorci krvi i jetre za analizu su uzimani u različitim vremenima, ovisno o pokusu – 2,5, 6, odnosno 24 h nakon primjene paracetamola. Životinja je najprije uvedena u anesteziju, uzeti su uzorci krvi, a nakon žrtvovanja životinje uzeti su uzorci jetre. Jedan komadić jetre je odmah zamrznut u tekućem dušiku (za određivanje koncentracije cAMP-a), drugi je homogeniziran u hladnom Tris-HCl puferu i pohranjen na -80°C (za određivanje koncentracije GSH), a preostali dio jetre je fiksiran u puferiranom 4% paraformaldehidu (za patohistološku analizu). Krv je centrifugirana 10 minuta na 300 g da bi se odijelila plazma koja je pohranjena na -80 °C, u plazmi je kasnije određena koncentracija ALT-a i nitrita i nitrata. Eksperimentalne i kontrolne skupine životinja su brojile 12-13 miševa (praćenje preživljenja) ili 6-10 miševa (sva ostala mjerenja).

3.4. Uporaba anestetika i analgetika

Kao sredstvo za umjerenu ili duboku anesteziju rabio se Na-fenobarbiton (Kemika, Zagreb) koji se preporučuje u literaturi, a osim toga je jeftin i dostupan. Otopljen je u fiziološkoj otopini, otopina je sterilizirana kroz Milipore filter i uštrcavana i.p. u volumenu 0,2-0,25 mL. Za površnu (blagu) anesteziju se koristio Avertin (3-bromoetanol, Sigma-Aldrich) kao sredstvo koje se brzo i ujednačeno apsorbira nakon i.p. primjene.

3.5. Krvarenje i uzimanje uzoraka krvi

Uzorci krvi su uzeti iz repa: miš je najprije uveden u blagu anesteziju, potom je zagrijavan rep pod lampom da bi se izazvala vazodilatacija i na kraju je odsječen završni dio repa (ne više od dva milimetra) (83).

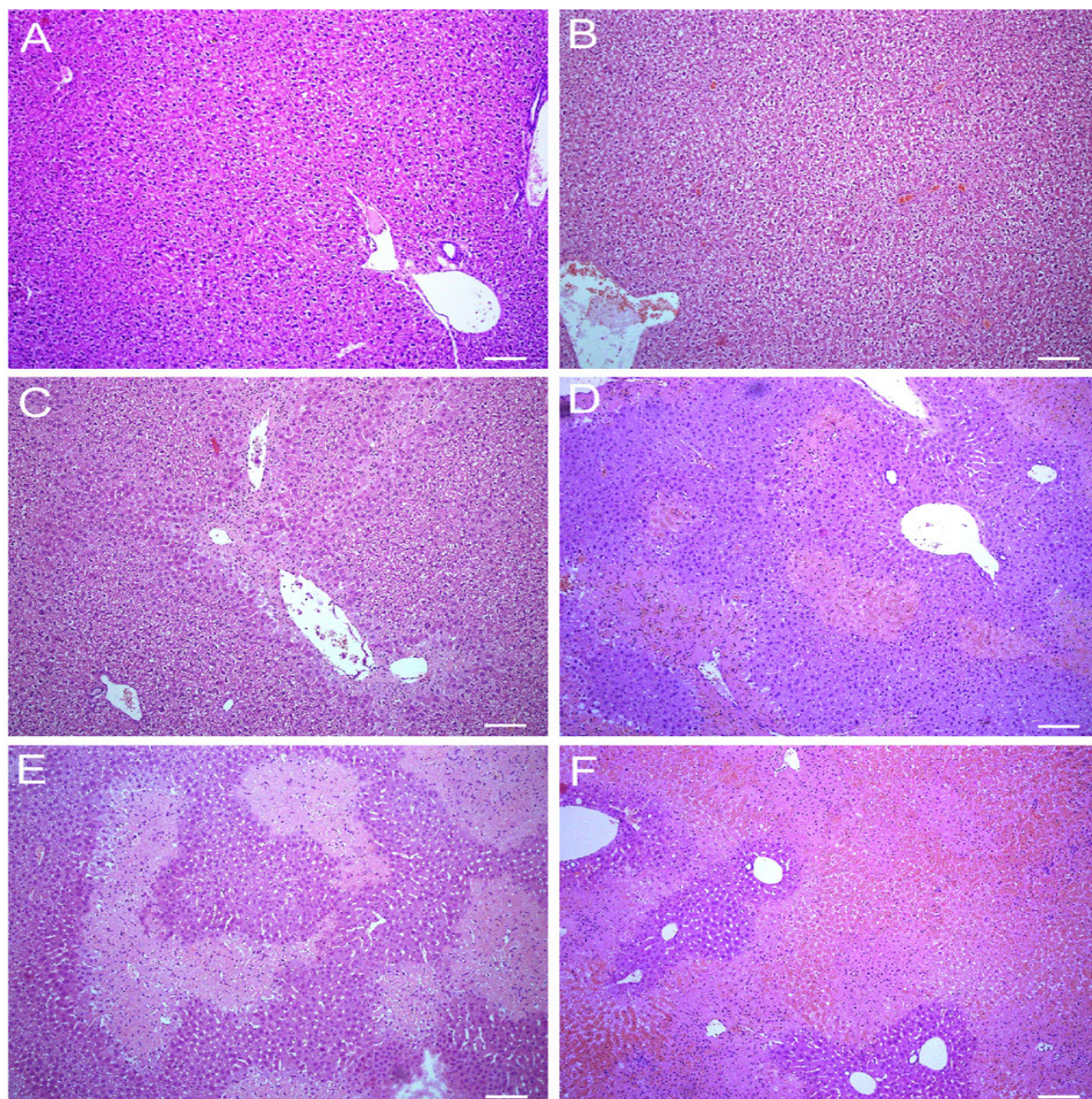
3.6. Mjerenje koncentracije ALT-a u plazmi

Uzorci krvi su uzimani ovisno o pokusu 2,5, 6, odnosno 24 h nakon što su miševi primili paracetamol. Nakon centrifugiranja krvi na 300 g, odijeljena je plazma i pohranjena na -80 °C. Koncentracija ALT-a u plazmi je određena standardnom laboratorijskom metodom u klimečkom laboratoriju (35, 84).

3.7. Patohistološka analiza jetre

Jetreni reznjevi svake životinje su fiksirani u puferiranom 4% paraformaldehidu, dehidrirani u povećavajućim koncentracijama etanola i uklopljeni u parafin. Nakon toga, reznjevi jetrenog tkiva, debljine 5 mm, su narezani pomoću rotirajućeg mikrotoma, postavljeni na čista stakalca i ostavljeni na 37 °C kako bi se osušili preko noći. Rezovi tkiva su očišćeni, hidrirani i obojeni hematoksilinom i eozinom. Mikroskopski, oštećenje jetrenog tkiva je stupnjevano korištenjem arbitrarne skale 0-5 kako slijedi: stupanj 0–nema oštećenja, normalna jetra; stupanj 1–minimalne lezije koje uključuju pojedinačne do nekoliko nekrotičnih stanica; stupanj 2–blaga oštećenja, 10-25% nekrotičnih stanica ili blage difuzne degenerativne promjene; stupanj 3–umjerena oštećenja, 25-40% nekrotičnih ili degenerativno promijenjenih stanica; stupanj 4–značajna oštećenja, 40-50% nekrotičnih ili degenerativno promijenjenih stanica; stupanj 5–teška oštećenja, više od 50% nekrotičnih ili degenerativno

promijenjenih stanica (slika 3.1.). Jetreni režnjevi sa stupnjem oštećenja većim od 2 smatrani su da imaju značajno oštećenje jetre (35, 85).



Slika 3.1. Stupnjevanje histopatoloških promjena u jetri miševa tretiranih paracetamolom. Jetre su uzete 24 h nakon primjene paracetamola (150 mg/kg). Stupnjevanje jetrenog oštećenja je izvršeno prema arbitrarnoj skali kako slijedi: stupanj 0 (A), stupanj 1 (B), stupanj 2 (C), stupanj 3 (D), stupanj 4 (E) i stupanj 5 (F) (originalno povećanje, 100x).

3.8. Imunohistokemijska analiza

Jetreni režnjevi su uzeti od svake životinje (6-10 miševa po skupini), fiksirani u 4% paraformaldehidu i potom dehidrirani u 100% etanolu. Rezovi tkiva su uklopljeni u parafinsko ulje, serijski narezani na 7 mm debele plohe i postavljeni na čista stakalca. Nakon uklanjanja parafina ksilenom, rezovi su rehidrirani u etanolu i vodi. Kako bi se spriječila endogena peroksidazna aktivnost, rezovi su inkubirani kroz 10 min u 0,3% H₂O₂, isprani u PBS-u i skuhani na 95 °C u Na-citratnom puferu tijekom 17 min. Nakon što su ohlađeni na sobnu temperaturu, rezovi su inkubirani s razrijeđenim (1:100) poliklonskim kunićjim anti-NF-κB (p65 podjedinica) ili anti-iNOS protutijelom tijekom 1 h na sobnoj temperaturi u ovlaženoj posudi. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi tkiva su inkubirani sa sekundarnim protutijelom obilježenim biotinom (rabbit UniTect ABC Kit, Oncogene, Boston, Mass., SAD) na sobnoj temperaturi tijekom 30 min. Rezovi su zatim isprani u PBS-u, inkubirani s avidin biotiniziranim kompleksom s peroksidazom hrena (ABC) tijekom 30 min, te ponovno isprani u PBS-u i obojeni diaminobenzidinom (DAB). Konačno, rezovi su isprani u destiliranoj vodi, obojeni hematoksilinom i dehidrirani u etanolu i ksilolu. Stanice pozitivne na NF-κB su imale smeđe obojenu citoplazmu ili jezgru (ovisno o aktivaciji NF-κB), dok su stanice pozitivne na iNOS imale smeđe obojenu citoplazmu. Pozitivnu kontrolu za NF-κB i iNOS su činile glatke mišićne stanice u zidu krvnih žila. Negativne kontrole su napravljene zamjenom sekundarnog protutijela s njegovim razrjeđivačem (Dako ChemMate antibody). Slike su napravljene pomoću digitalne kamere (SPOT Insight, Diagnostic Instruments, SAD) postavljene na mikroskop (Olympus BX51).

3.9. Imunohistokemijska kvantifikacija

Broj stanica je bio kvantitativno evaluiran od dvojice nezavisnih istraživača i svrstan kao negativne (nebojene) stanice, jezgra-pozitivne stanice (za NF-κB) i citoplazma-pozitivne stanice (za iNOS). Brojanja su izvršena uzduž jetrenog režnja samo za DAB-obojene rezove. Da bi se svaki jetreni rez podijelio u kvadratiće dimenzija 100 μm × 100 μm pri povećanju 40x, koristio se softver DP-SOFT verzija 3.1. Stanice ispod lijeve i gornje granice kvadratića nisu uzimane u obzir, nego samo one s desne i donje granice. Kako bi se izbjeglo dvostruko računanje iste stanice, korišten je svaki drugi rez tkiva. Brojanje stanica je učinjeno na

mikroskopu (Olympus BX51) opremljenim s digitalnom kamerom (DP11). Slike su analizirane korištenjem softvera (DP-SOFT verzija 3.1).

3.10. Određivanje koncentracije nitrita i nitrata u plazmi

Uzorci plazme su uzeti 2,5, 6, odnosno 24 h nakon primjene paracetamola i zatim pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do određivanja koncentracije nitrita i nitrata, završnih produkata metabolizma NO-a. Nitrati NO_3^- su najprije reducirani u nitrite (NO_2^-) korištenjem zrnaca kadmija obloženih bakrom (NITRALYZER-II, Nitrate to Nitrite reduction kit, World Precision Instruments, Sarasota, FL, SAD). Koncentracija nitrita je izmjerena s pomoću Griessove reakcije uz strogo pridržavanje uputa proizvođača. Vrijednosti apsorbancije pri 540 nm su izmjerene korištenjem automatskog čitača mikrotitracijskih pločica (Dynatech MR 5000, Dynatech Technology, Inc., Horsham, PA, SAD) i uspoređene sa standardnom krivuljom koja je bila dobivena sa 8 različitih koncentracija nitrata reduciranih u nitrite na isti način kao što su reducirani i nitrati iz uzoraka.

3.11. Određivanje koncentracije GSH u jetri

Uzorci jetre su uzeti 2,5, 6, odnosno 24 h nakon primjene paracetamola. Razina GSH u jetri je određena metodom po Ellmanu (86). Komadić (otprilike 100 mg) jetre je homogeniziran u hladnom Tris-HCl puferu (25 mmol/L, pH 7,4). Od homogenata je izdvojeno 0,1 mL i najprije pomiješano s 0,2 mL 5 postotne trikloroetene kiseline, a zatim centrifugirano na 860 g kroz 10 minuta. Supernatant je pomiješan sa DTNB-om, tvari koja u kontaktu sa disulfidnim vezama poprima intenzivno žuto obojenje. Apsorbancija je mjerena na 412 nm i uspoređena sa standardnom linijom koja je bila dobivena sa šest različitih koncentracija GSH. Iz preostalog dijela homogenata određena je koncentracija proteina, metodom po Bradfordu (87) i konačna koncentracija GSH je izračunata u nmol/mg jetrenih proteina.

3.12. Mjerenje koncentracije cAMP-a u jetri

Uzorci jetre su uzeti 2,5, 6, odnosno 24 h nakon otrovanja miševa paracetamolom. Komadić jetre (otprilike 200 mg) je odmah nakon vađenja zamrznut u tekućem dušiku.

Kasnije je izvagan i homogeniziran u trikloroctenoj kiselini u volumnom omjeru 1:5. Homogenat je zatim centrifugiran 10 minuta na 4°C i 860 g, izdvojen je supernatant, a trikloroctena kiselina iz supernatanta je ekstrahirana s eterom koji je zasićen vodom. Eter je izdvojen iz uzorka evaporacijom na 60 °C. Koncentracija cAMP-a u homogenatima jetre je određena uporabom komercijalnog kita [cAMP Complete Enzyme Immunometric Assay (EIA) kit (No. 900-163, Assay-Designs, USA)], uz pridržavanje uputa proizvođača.

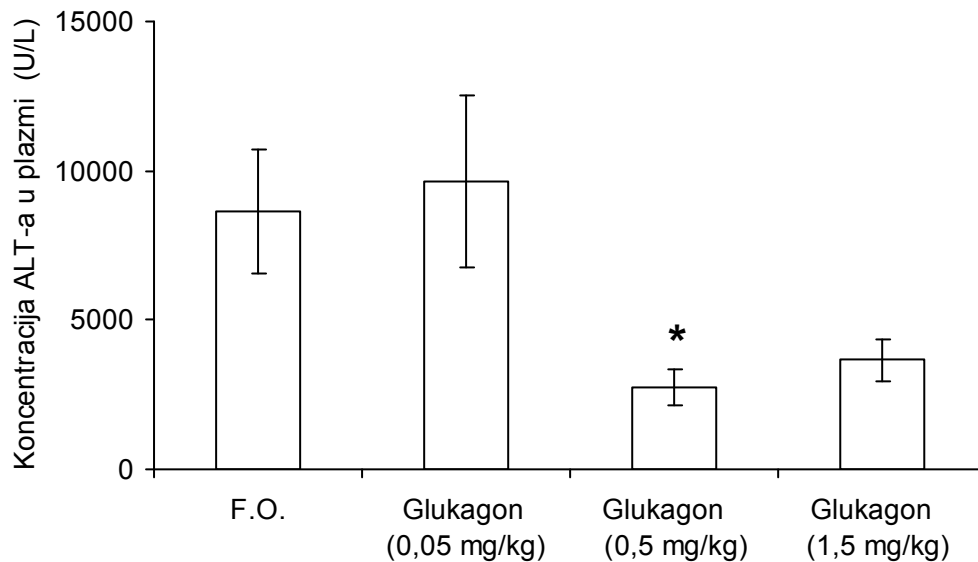
3.13. Statistička obradba podataka

Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike u preživljenju između skupina životinja bile su testirane hi-kvadrat testom, pri čemu se koristila Yatesova korekcija kad je bila indicirana. Statističke usporedbe između dviju skupina su učinjene korištenjem Studentovog t-testa. Usporedbe između više skupina su testirane testom ANOVA (prema engl. one-way analysis of variance, ANOVA) *s post hoc* testiranjem (Bonferronijev ili Dunnettov test) značajnosti između pojedinih skupina. Statistička značajnost je bila prihvaćena pri $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Učinak glukagona na plazmatske koncentracije ALT-a i histopatološke promjene jetre u miševa s oštećenjem jetre koje je uzrokovano paracetamolom

Plazmatske koncentracije ALT-a. Fiziološka otopina ili tri različite doze glukagona (0,05, 0,5 i 1,5 mg/kg) su uštrcani (10 μ L/g, i.p.), 15 minuta prije paracetamola (150 mg/kg, 20 μ L/g, i.p.). Koncentracija ALT-a je određena 24 h nakon davanja paracetamola. Doza glukagona od 0,5 mg/kg je statistički značajno smanjila povećanje ALT-a uzrokovano paracetamolom. Doza glukagona od 1,5 mg/kg je također smanjila povećanje ALT-a, ali razlika prema kontrolnoj skupini nije bila statistički značajna, dok u dozi od 0,05 mg/kg glukagon nije imao utjecaja na povećanje ALT-a (slika 4.1.). Glukagon primijenjen sam u bilo kojoj dozi (to jest bez paracetamola), nije uzrokovao povećanje razine ALT-a – sve vrijednosti ALT-a su bile niže od 100 U/L što odgovara vrijednostima u normalnih, netretiranih životinja (nisu prikazani rezultati).



Slika 4.1. Učinak različitih doza glukagona na koncentraciju ALT-a u plazmi. Miševima je uštrcana fiziološka otopina ili naznačena doza glukagona 15 minuta prije primjene paracetamola (150 mg/kg). Koncentracija ALT-a je određena 24 h nakon davanja paracetamola. Stupići prikazuju srednju vrijednost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=8-10 miševa po skupini). F.O.-fiziološka otopina.

* $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (ANOVA test, *post hoc* test po Dunnetu)

Histopatološke promjene jetre. Sve jetre su bile barem djelomično oštećene što je u većini slučajeva bilo vidljivo i makroskopski - na cijeloj površini jetre mogle su se vidjeti tamnocrvene, hemoragično-nekrotične pjege na žutoj podlozi. Budući da povećanje ALT-a u nekim slučajevima ne predstavlja sa sigurnošću stupanj oštećenja jetre, napravljeni su histopatološki preparati i oštećenje jetrenog tkiva je stupnjevano koristeći arbitrarnu skalu 0-5 kako je opisano u Materijalima i metodama (slika 3.1.). Težina nekroze bila je varijabilna između pojedinih skupina, između životinja unutar iste skupine, kao i između različitih područja jetre uzete od jedne životinje. Ipak, nalaz histopatološkog oštećenja jetre se u velikoj većini slučajeva dobro podudara s povećanjem koncentracije ALT-a - u skupini koja je tretirana s glukagonom u dozi od 0,5 mg/kg je zamijećen manji stupanj oštećenja jetre (usporediti tablicu 4.1. i sliku 4.1.).

Tablica 4.1. Učinak glukagona na histopatološke promjene jetre nakon otrovanja paracetamolom

Tretman miševa ^a	Stupanj histopatološkog oštećenja ^b						% > 2 ^c
	0	1	2	3	4	5	
Fiziološka otopina + paracetamol	0	1	1	5	3	0	80
Glukagon (0,5 mg/kg) + paracetamol	0	4	5	2	0	0	16*

^a glukagon u naznačenoj dozi ili fiziološka otopina su dani 15 minuta prije primjene paracetamola (150 mg/kg). Miševi su žrtvovani i jetre su uzete 24 h nakon primjene paracetamola.

^b stupanj histopatološkog oštećenja (skor) je određen na temelju intenziteta hepatocelularne nekroze kako je opisano u Materijalima i metodama.

^c stupnjevi veći od 2 predstavljaju značajno izraženu nekrozu.

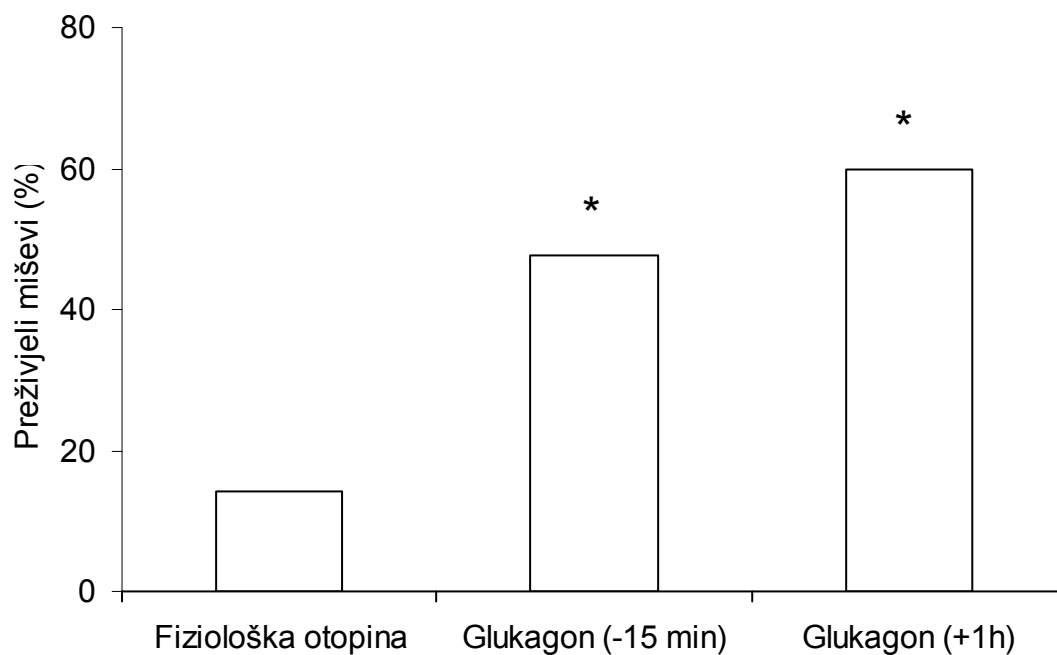
* statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$), hi-kvadrat test.

4.1.1. Učinak glukagona primijenjenog u različitim vremenima prije ili nakon paracetamola na preživljenje miševa i plazmatske koncentracije ALT-a (vremenski odgovor)

Preživljenje miševa. U sljedećem pokusu je ispitivano ima li najučinkovitija doza glukagona (0,5 mg/kg) iz prethodnog pokusa učinka na preživljenje miševa tretiranih paracetamolom, a također je istraženo da li glukagon ima učinka i ako se primjeni terapijski, t.j., 1 h nakon otrovanja paracetamolom. Životinje su tretirane fiziološkom otopinom ili glukagonom (0,5 mg/kg, 10 µL/g, i.p.), 15 minuta prije, odnosno 1 h nakon paracetamola (300 mg/kg, 20 µL/g, i.p). Glukagon je značajno povećao preživljenje miševa i kad je bio primijenjen 15 minuta prije paracetamola i kad je bio primijenjen 1 h nakon paracetamola (slika 4.2.). U drugom pokusu smo istražili ima li glukagon učinka i kada se primjeni u ranijem predtretmanu (1,5 h prije paracetamola), odnosno u kasnijoj terapiji (2 h nakon paracetamola). Niti u jednom vremenskom periodu glukagon nije pokazao značajan učinak (nisu prikazani rezultati).

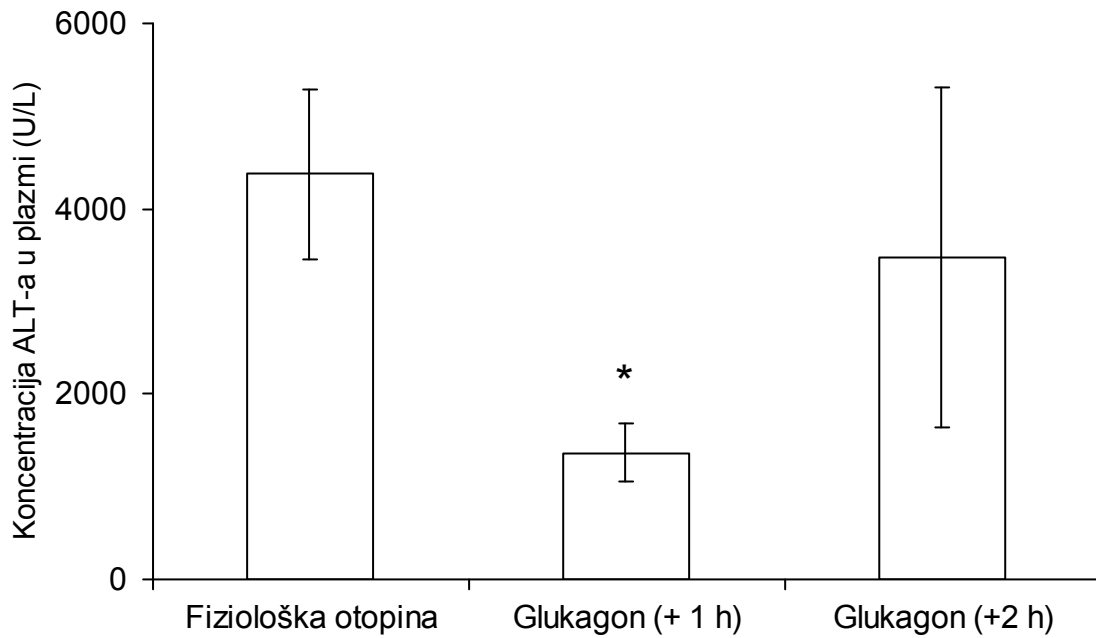
Plazmatske koncentracije ALT-a i histopatološke promjene jetre. Ovisnost učinka glukagona o vremenu primjene dalje je istražena na temelju praćenja plazmatske koncentracije ALT-a i patohistoloških promjena u jetri. U prvom pokusu, životinje su tretirane fiziološkom otopinom ili glukagonom (0,5 mg/kg, 10 µL/g i.p.) 1 h ili 2 h nakon paracetamola (150 mg/kg, 20 µL/g, i.p). Glukagon je spriječio povećanje razine ALT-a kada je bio primijenjen 1 h nakon paracetamola, ali nije bio učinkovit kada je bio primijenjen 2 h nakon paracetamola (slika 4.3.). Koncentracije ALT-a su se dobro podudarale s patohistološkim oštećenjem jetre (tablica 4.2.).

U pokusu u kojem je praćeno preživljenje miševa glukagon nije bio učinkovit kada je bio primijenjen 1,5 h prije paracetamola. Ovaj rezultat je dodatno provjeren u pokusu u kojem smo određivali razinu ALT-a. U pokus su bile uključene dvije skupine miševa, prvoj skupini je 1,5 h prije paracetamola uštrcan glukagon, a drugoj fiziološka otopina. Skupina koja je 1,5 h prije paracetamola primila glukagon imala je slične vrijednosti ALT-a kao i skupina koja je prije paracetamola primila fiziološku otopinu (slika 4.4.).



Slika 4.2. Učinak glukagona na preživljenje miševa s akutnim oštećenjem jetre koje je izazvano paracetamolom. Miševi su primili fiziološku otopinu ili glukagon (0,5 mg/kg) u naznačenim vremenima prije ili nakon paracetamola (300 mg/kg). Preživljenje miševa je praćeno 48 h. Stupići prikazuju postotak preživjelih miševa u pojedinoj skupini (N=20 miševa po skupini).

* $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (hi-kvadrat test)



Slika 4.3. Učinak glukagona, primijenjenog u različitim vremenima nakon paracetamola na koncentraciju ALT-a u plazmi. Miševima je uštrcana fiziološka otopina ili glukagon (0,5 mg/kg) u naznačenim vremenima prije ili nakon primjene paracetamola (150 mg/kg). Koncentracija ALT-a je određena 24 h nakon davanja paracetamola. Stupići prikazuju srednju vrijednost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=8 miševa po skupini). * $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (ANOVA test, *post hoc* test po Dunnetu)

Tablica 4.2. Učinak glukagona, primijenjenog u različitim vremenima nakon paracetamola, na histopatološke promjene jetre nakon otrovanja paracetamolom

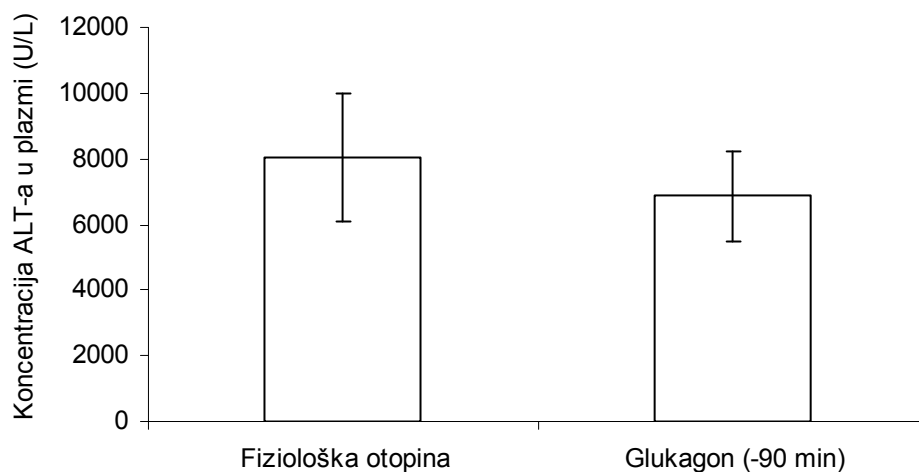
Tretman miševa ^a	Stupanj histopatološkog oštećenja ^b						% > 2 ^c
	0	1	2	3	4	5	
Fiziološka otopina + paracetamol	0	0	3	0	1	3	57
Glukagon (+ 1h) + paracetamol	0	4	4	0	0	0	0*
Glukagon (+ 2h) + paracetamol	0	2	2	3	0	1	50

^a miševima je uštrcana fiziološka otopina ili glukagon (0,5 mg/kg) u naznačenim vremenima prije ili poslije primjene paracetamola (150 mg/kg). Miševi su žrtvovani i jetre su uzete 24 h nakon primjene paracetamola.

^b stupanj histopatološkog oštećenja (skor) je određen na temelju intenziteta hepatocelularne nekroze kako je opisano u Materijalima i metodama.

^c stupnjevi veći od 2 predstavljaju značajno izraženu nekrozu.

* statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$), hi-kvadrat test.



Slika 4.4. Učinak glukagona, primijenjenog 90 minuta prije paracetamola na koncentraciju ALT-a u plazmi. Miševima je uštrcana fiziološka otopina ili glukagon (0,5 mg/kg) 90 minuta prije primjene paracetamola (150 mg/kg). Koncentracija ALT-a je određena 24 h nakon davanja paracetamola. Stupići prikazuju srednju vrijednost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=8 miševa po skupini).

4.2. Učinak db-cAMP-a i roliprama na plazmatske koncentracije ALT-a, histopatološke promjene i preživljenje miševa s oštećenjem jetre koje je uzrokovano paracetamolom

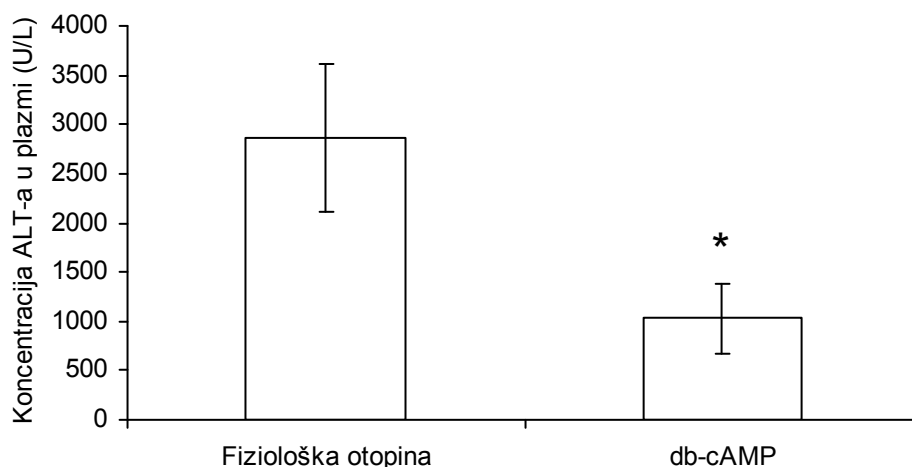
Većinu svojih učinaka u jetri glukagon ostvaruje putem povećanja razine cAMP-a u hepatocitima. U sljedećim pokusima smo istražili da li i druge tvari koje dovode do povećanja koncentracije cAMP-a u jetri: rolipram (inhibitor (PDE-4) i db-cAMP (stabilni analog cAMP-a) imaju protektivan učinak na oštećenje jetre uzrokovano paracetamolom.

Najprije je napravljeno preliminarno istraživanje u kojem smo testirali učinak tri različite doze db-cAMP-a i roliprama na malom broju životinja. Na temelju dobivenih rezultata odabrali smo doze od 25 mg/kg za db-cAMP i 8 mg/kg za rolipram za daljnje istraživanje.

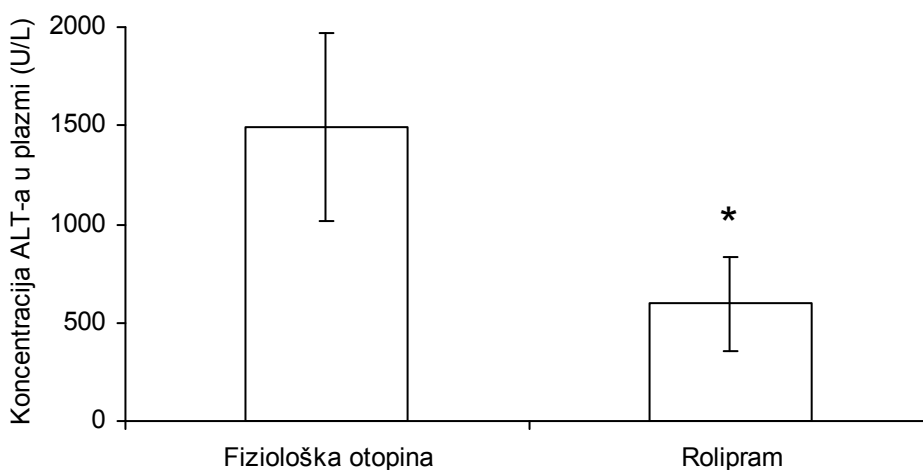
db-cAMP (25 mg/kg, i.p.) ili rolipram (8 mg/kg, i.p.) su uštrcani 15 minuta prije paracetamola (150 mg/kg), a kontrolna skupina je primila fiziološku otopinu prije paracetamola. Koncentracija ALT-a je određena 24 h nakon primjene paracetamola. U usporedbi s kontrolnom skupinom miševi koji su prije paracetamola primili rolipram ili db-cAMP imali su manje koncentracije ALT-a (slika 4.5.), i manje vidljivo oštećenje jetre na patohistološkom nalazu.

U pokusu u kojem je praćeno preživljenje miševa, vidjelo se da db-cAMP i rolipram značajno poboljšavaju preživljenje miševa tretiranih paracetamolom (slika 4.6.).

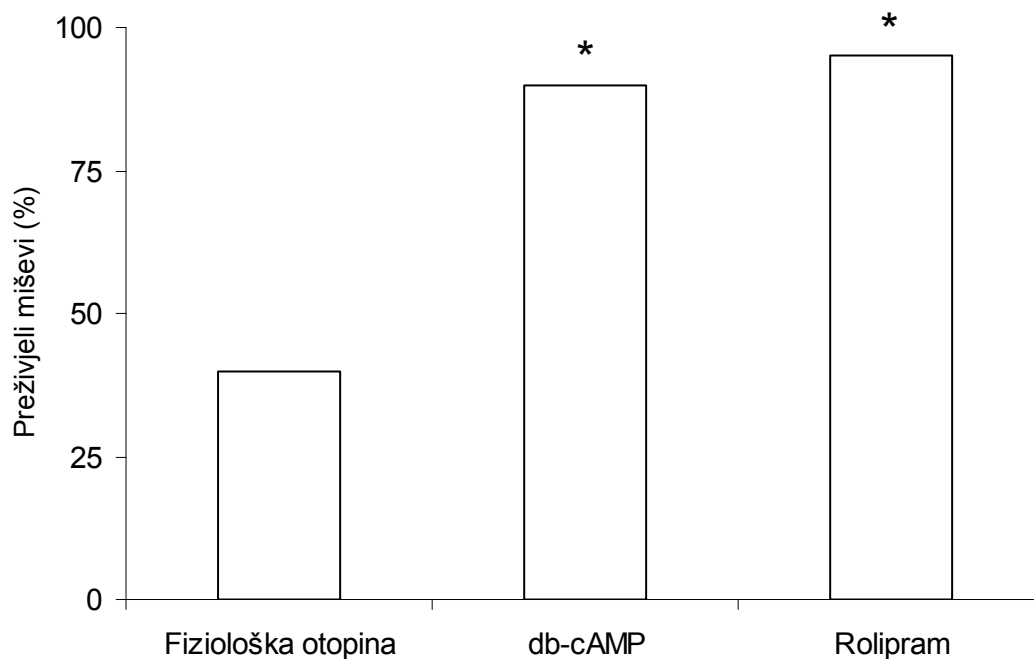
A



B



Slika 4.5. Učinak db-cAMP-a i roliprama na koncentraciju ALT-a u plazmi. **A** db-cAMP (25 mg/kg) ili **B** rolipram (8 mg/kg) su uštrcani 15 minuta prije paracetamola (150 mg/kg), dok je kontrolna skupina prije paracetamola primila fiziološku otopinu. Koncentracija ALT-a je određena 24 h nakon primjene paracetamola. Stupići prikazuju srednju vrijednost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=7-12 miševa po skupini). * $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (Studentov t-test).



Slika 4.6. Učinak db-cAMP-a i roliprama na preživljenje miševa otrovanih paracetamolom. db-cAMP (25 mg/kg, i.p.) ili rolipram (8 mg/kg) su uštrcani 15 minuta prije paracetamola (300 mg/kg), a kontrolna skupina je prije paracetamola primila fiziološku otopinu. Preživljenje miševa je praćeno 48 h. Stupići prikazuju postotak preživjelih miševa u pojedinoj skupini (N=20 miševa po skupini).

* $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (hi-kvadrat test)

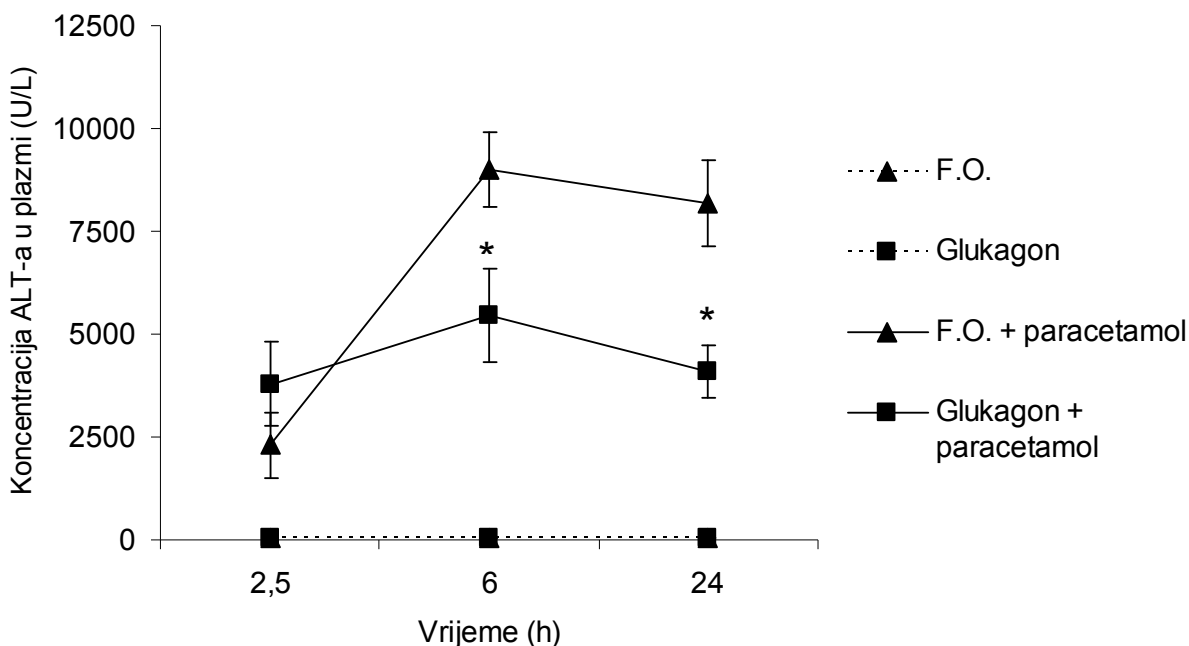
4.3. Učinak glukagona na koncentraciju ALT-a, koncentraciju nitrita i nitrata u plazmi, na izraženost iNOS-a i NF- κ B i na koncentraciju GSH i cAMP-a u jetri u različitim vremenima nakon otrovanja miševa paracetamolom

Da bi detaljnije istražili mehanizme kojima glukagon smanjuje toksičnost paracetamola životinje smo žrtvovali u 3 različita vremena nakon otrovanja paracetamolom, a zatim su određeni: koncentracija ALT-a, koncentracija nitrita i nitrata u plazmi, izraženost iNOS-a i NF- κ B i koncentracija GSH i cAMP-a u jetri.

Životinje su tretirane glukagonom (0,5 mg/kg) ili fiziološkom otopinom 15 minuta prije paracetamola (150 mg/kg). Za procjenu učinka samog glukagona na navedene parametre životinje su injicirane samo glukagonom (0,5 mg/kg) ili samo fiziološkom otopinom (bez paracetamola). Životinje su žrtvovane u 3 različite vremenske točke: nakon 2,5, nakon 6, odnosno nakon 24 h od vremena zadnje injekcije. Uzeta je krv za analizu koncentracije ALT-a, nitrita i nitrata, i jetra za određivanje koncentracije GSH i cAMP-a, te za imunohistokemijsko određivanje izraženosti iNOS-a i NF- κ B, na način koji je opisan u Materijalima i metodama.

4.3.1. Koncentracija ALT-a

Paracetamol je višestruko povećao koncentraciju ALT-a u plazmi. Povećanje je bilo vidljivo već nakon 2,5 h, a nakon 6 h je došlo do daljnjeg povećanja. Koncentracije ALT-a su ostale visoke i nakon 24 h. Skupina miševa koja je prije paracetamola primila glukagon imala je niže koncentracije ALT-a od skupine koja je prije paracetamola primila fiziološku otopinu u vremenima 6 h i 24 h nakon paracetamola, dok u vremenu 2,5 h nakon paracetamola nije bilo značajne razlike. Glukagon, primijenjen sam, nije imao utjecaja na koncentraciju ALT-a ni u jednoj vremenskoj točki – koncentracije ALT-a u skupinama tretiranih samo fiziološkom otopinom ili samo glukagonom su u svim vremenskim točkama bile između 70 i 100 IU/L (slika 4.7.).



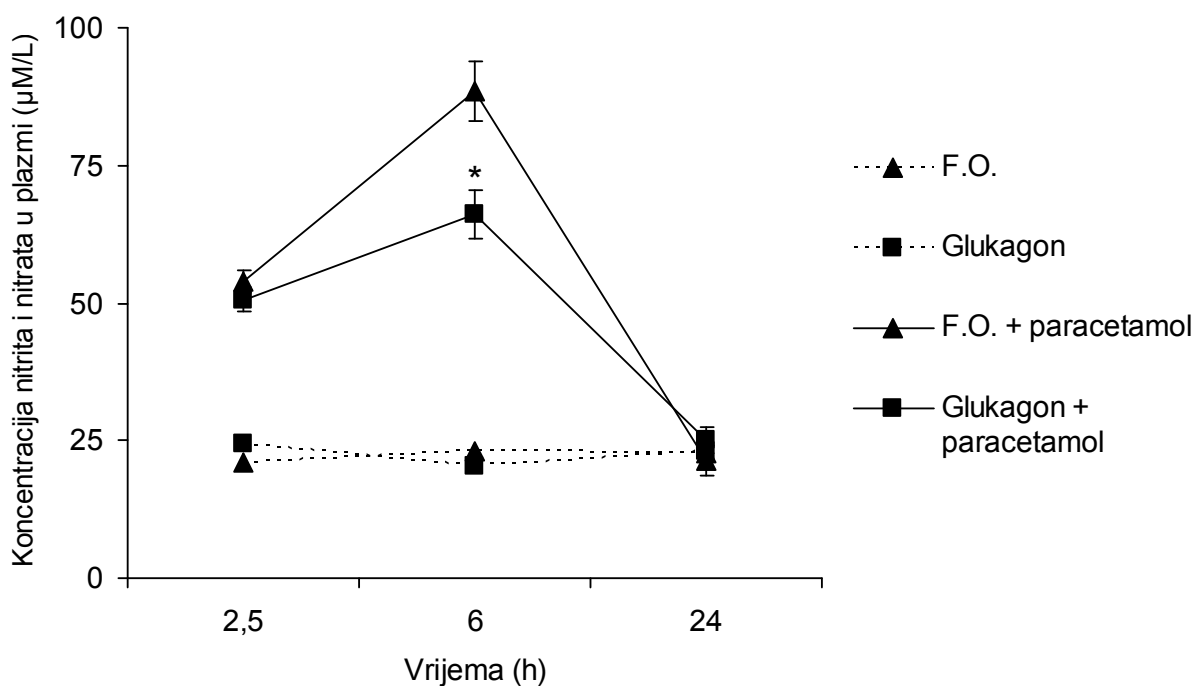
Slika 4.7. Utjecaj glukagona na koncentracije ALT-a u plazmi, određene u tri različite vremenske točke. Miševima je injicirana fiziološka otopina ili glukagon (0,05 mg/kg) 15 minuta prije primjene paracetamola (150 mg/kg) ili samo fiziološka otopina ili samo glukagon. Koncentracije ALT-a su određene u naznačenim vremenima nakon primjene paracetamola. Točke prikazuju srednju vrijenost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=4-8 za skupine koje nisu primile paracetamol, odnosno 8-16 za skupine tretirane paracetamolom). Prikazani su objedinjeni rezultati dvaju pokusa. F.O.-fiziološka otopina.

* $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (Studentov t-test)

4.3.2. Koncentracija nitrita i nitrata

Paracetamol je povećao koncentraciju nitrita i nitrata, završnih produkata metabolizma NO-a u plazmi. Povećanje je bilo vidljivo već nakon 2,5 h, a nakon 6 h je došlo do daljnjeg povećanja, međutim nakon 24 h, koncentracije nitrita i nitrata su se vratile na bazalne vrijednosti. Skupina miševa koja je prije paracetamola primila glukagon imala je niže koncentracije nitrita i nitrata od skupine koja je prije paracetamola primila fiziološku otopinu u vremenu 6 h nakon paracetamola, a u preostale dvije vremenske točke nije bilo značajne razlike. Glukagon, primijenjen sam, nije imao utjecaja na koncentraciju nitrita i nitrata ni u

jednoj vremenskoj točki – koncentracije nitrita i nitrata u skupinama tretiranih samo fiziološkom otopinom ili samo glukagonom su u svim vremenskim točkama bile između 15 i 25 $\mu\text{M/L}$ (slika 4.8.).



Slika 4.8. Utjecaj glukagona na koncentracije nitrita i nitrata u plazmi, određene u tri različite vremenske točke. Miševima je injicirana fiziološka otopina ili glukagon (0,05 mg/kg) 15 minuta prije primjene paracetamola (150 mg/kg) ili samo fiziološka otopina ili samo glukagon. Koncentracije nitrita i nitrata su određene u naznačenim vremenima nakon primjene paracetamola. Točke prikazuju srednju vrijenost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=4-8 za skupine koje nisu primile paracetamol, odnosno 8-16 za skupine tretirane paracetamolom). Prikazani su objedinjeni rezultati dvaju pokusa. F.O.- fiziološka otopina.

* $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (Studentov t-test)

4.3.3. Imunohistokemijska analiza izraženosti iNOS-a u citoplazmi jetrenih stanica

Imunohistokemijska izraženost iNOS-a je određena u vremenu 6 h nakon primjene paracetamola jer se prema podacima iz literature (48) i vrijednosti plazmatskih koncentracija nitrita i nitrata dobivenih u našim pokusima (slika 4.8.) tada očekuje najviša izraženost.

Miševi tretirani fiziološkom otopinom. Zrnate nakupine iNOS-a, organizirane u male skupine, su bile prisutne u citoplazmi rijetkih hepatocita, dok citoplazma većine drugih stanica nije bila pozitivna na iNOS (slika 4.9.A). Stanice na unutarnjoj površini sinusoidnih kapilara (endotelne ili Kupfferove stanice) su također bile pozitivne na iNOS. Bilo je samo 2,9% stanica s citoplazmatskom pozitivnošću na iNOS (tablica 4.3.).

Miševi tretirani fiziološkom otopinom i paracetamolom. iNOS je bio izražen u citoplazmi hepatocita u obliku malih, gusto zbijenih zrnaca ili velikih pojedinačnih vakuola. Neke endotelne ili Kupfferove stanice su također bile pozitivne na iNOS (slika 4.9.B). Broj jetrenih stanica pozitivnih na iNOS (44,5% pozitivnih stanica) je bio statistički značajno veći u usporedbi s normalnim miševima (tablica 4.3.).

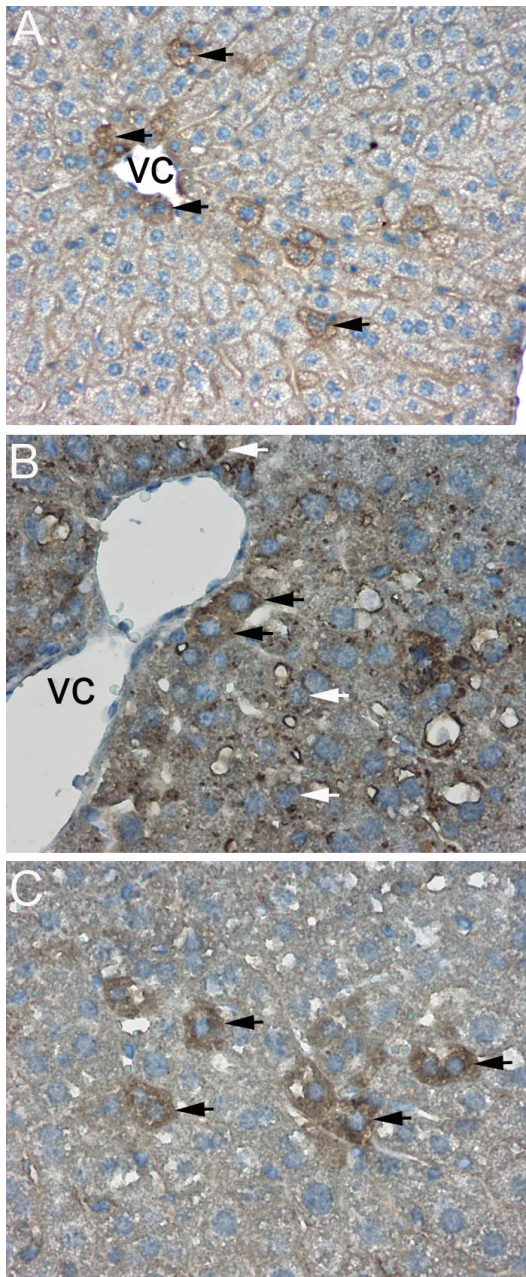
Miševi tretirani glukagonom i paracetamolom. Citoplazmatska izraženost iNOS-a je pokazivala zrnati uzorak, naročito u stanicama smještenim oko centralne vene (slika 4.9.C). Broj jetrenih stanica pozitivnih na iNOS (23,5% stanica) je bio značajno manji u usporedbi sa skupinom miševa tretiranih fiziološkom otopinom i paracetamolom (tablica 4.3.).

4.3.4. Imunohistokemijska analiza aktivacije NF- κ B

Miševi tretirani fiziološkom otopinom. NF- κ B je bio izražen u jetrenim stanicama oko krvnih žila u Kiernanovim prostorima (aferentne arteriole) u vidu brojnih malih zrnaca, difuzno raspoređenih u citoplazmi. Imunopozitivnost na NF- κ B je također bila izražena u pojedinačnim stanicama u jetrenim lobulima i oko centralne vene (eferentne arteriole) (slika 4.10.A). Gotovo sva imunoreaktivnost na NF- κ B je bila prisutna u citoplazmi i samo je u 3,7% pozitivnih stanica ona bila prisutna i u jezgri (tablica 4.3.).

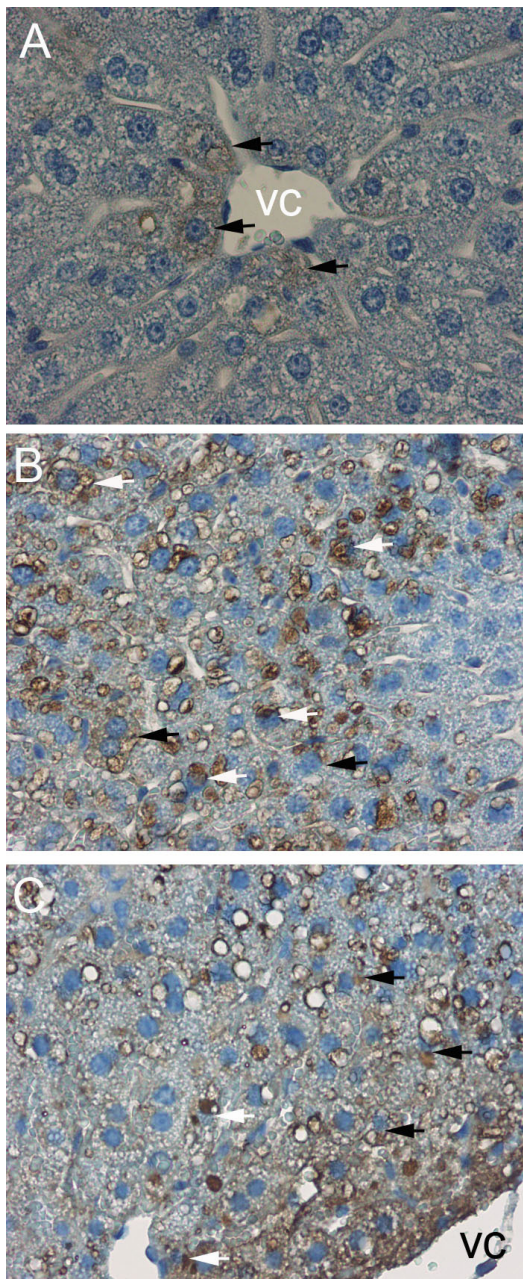
Miševi tretirani fiziološkom otopinom i paracetamolom. Cijelo jetreno tkivo je bilo infiltrirano s upalnim stanicama, dok su normalne stanice bile rijetko prisutne. Oko krvnih žila su bili nizovi stanica s brojnim vakuolama u citoplazmi i jezgri (slika 4.10.B). U središnjem dijelu lobula je bio prisutan perimembranozni uzorak bojanja, a u jezgrama hepatocita su bile prisutne tamno obojene vakuole. Izuzevši citoplazmatsku imunopozitivnost na NF- κ B, imunoreaktivnost je također bila prisutna i u jezgri hepatocita (22,2% pozitivnih stanica) što ukazuje na veću aktivnost NF- κ B u usporedbi s normalnim miševima (tablica 4.3.).

Miševi tretirani glukagonom i paracetamolom. Cijelo jetreno tkivo je bilo infiltrirano upalnim stanicama. Mnogo stanica je bilo u različitim mitotskim razdobljima što ukazuje na regeneraciju jetrenog tkiva. Imunohistokemijska izraženost NF- κ B je u jetrenim stanicama pokazivala uglavnom perimembranozni uzorak. U središnjem dijelu lobula pozitivnost na NF- κ B je bila izražena i u citoplazmi i u jezgri (23%), s prisutnim vakuolama u oba stanična odjeljka (slika 4.10.C). U usporedbi s miševima tretiranih s fiziološkom otopinom prije paracetamola razlika u imunohistokemijskoj izraženosti NF- κ B u jezgri nije bila značajna (tablica 4.3., $p > 0,05$).



Slika 4.9. Imunohistokemijska izraženost iNOS-a u jetri. **A** *Normalni miševi.*

Imunopozitivnost na iNOS je bila uglavnom prisutna u obliku difuznog uzorka u citoplazmi malog broja hepatocita (crne strjelice) $\times 20$. **B** *Miševi tretirani fiziološkom otopinom i paracetamolom.* Imunopozitivnost na iNOS se očitovala u vidu difuznih granularnih (crne strjelice) ili vakuolarnih (bijele strjelice) nakupina u citoplazmi jetrenih stanica, $\times 40$. **C** *Miševi tretirani glukagonom i paracetamolom.* Imunohistokemijska izraženost iNOS-a je pokazala difuzni uzorak (crne strjelice) u citoplazmi pojedinih hepatocita ili u malim grupama hepatocita $\times 40$. VC-centralna vena.



Slika 4.10. Imunohistokemijska izraženost NF- κ B u jetri. **A** *Normalni miševi.* Pozitivnost na NF- κ B je bila uglavnom prisutna u obliku difuznog uzorka u citoplazmi stanica (crne strjelice), napose u područjima oko centralne vene, $\times 40$. **B** *Miševi tretirani fiziološkom otopinom i paracetamolom.* Imunopozitivnost na NF- κ B se očitovala u vidu perimembranoznih vakuolarnih nakupina u jezgri (bijeke strjelice) i citoplazmi (crne strjelice), $\times 40$. **C.** *Miševi tretirani glukagonom i paracetamolom* Imunohistokemijska izraženost NF- κ B je bila slična onoj u skupini miševa tretiranih fiziološkom otopinom i paracetamolom (vidi pod B), $\times 40$, VC-centralna vena.

Tablica 4.3. Kvantifikacija imunopozitivnosti na NF- κ B i iNOS u jetrenim stanicama

Tretman	% hepatocita ^a pozitivnih na:	
	NF- κ B	iNOS
Fiziološka otopina	2,9 \pm 1,4	3,9 \pm 0,5
Fiziološka otopina + paracetamol	22,2 \pm 2,1 ^b	44,5 \pm 2,1 ^b
Glukagon + paracetamol	23 \pm 1,6 ^b	23,5 \pm 3,2 ^{b,c}

^a broj stanica je određen od dvojice nezavisnih istraživača i svrstan kao negativne (nebojane) stanice, jezgra-pozitivne stanice (za NF- κ B) i citoplazma-pozitivne stanice (za iNOS). U svakom jetrenom polju (100 μ m \times 100 μ m) je izračunat postotak pozitivnih stanica na NF- κ B i iNOS te izražen kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti.

^b statistički značajna razlika u odnosu na miševе tretirane samo fiziološkom otopinom.

^c statistički značajna razlika u odnosu na miševе tretirane fiziološkom otopinom i paracetamolom. Razlike između skupina životinja (N=6 po skupini) su bile statistički značajne pri vrijednosti $p < 0,01$. ANOVA test, *post hoc* test po Bonferroniju.

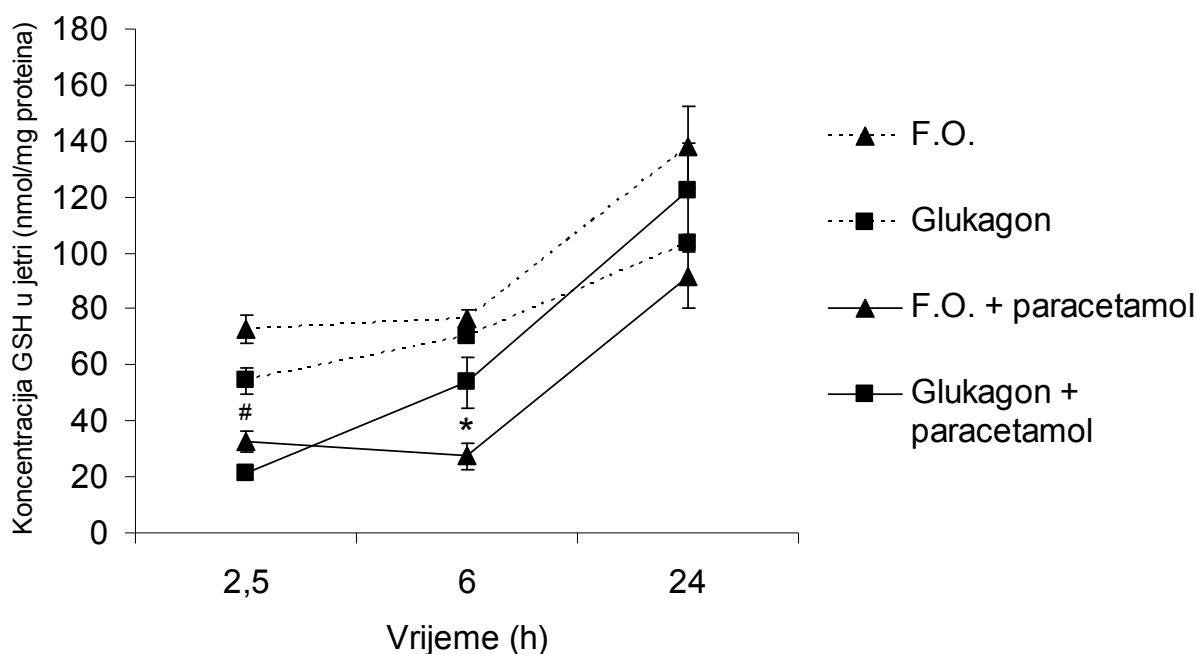
4.3.5. Koncentracija GSH

Paracetamol je smanjio koncentraciju GSH u jetri. Smanjenje koncentracije GSH je bilo vidljivo već nakon 2,5 h, nakon 6 h koncentracija GSH je i dalje bila snižena, a nakon 24 sata je bio vidljiv oporavak prema normalnim vrijednostima.

Glukagon dan prije paracetamola nije spriječio gubitak GSH uzrokovan paracetamolom, ali je ubrzao oporavak GSH - skupina miševa koja je prije paracetamola primila glukagon imala je nešto niže koncentracije GSH od skupine koja je prije paracetamola primila fiziološku otopinu nakon 2,5 h, ali je nakon 6 h koncentracija GSH bila veća (statistički značajno) u skupini tretiranoj s glukagonom prije paracetamola. Nakon 24 h nije bilo značajne razlike između ove dvije skupine (slika 4.11.).

Glukagon primijenjen sam (bez paracetamola) je smanjio koncentraciju GSH - skupina miševa tretiranih glukagonom je imala statistički značajno manju koncentraciju GSH od skupine tretirane samo fiziološkom otopinom nakon 2,5 h, dok u preostale dvije vremenske

točke nije bilo značajne razlike. Može se vidjeti i da su skupine kojima je uštrcana samo fiziološka otopina ili samo glukagon nakon 24 h imale veće koncentracije GSH nego nakon 2,5, odnosno 6 h. (slika 4.11.). Ovo povećanje koncentracije GSH tijekom pokusa se može objasniti učinkom gladovanja na koncentraciju GSH. Naime, prilikom gladovanja koncentracija GSH se smanjuje (88). Kako je svim miševima 16 h prije početka pokusa bila uklonjena hrana, a vraćena je 4 h nakon paracetamola, tako su miševi žrtvovani nakon 24 h bili siti, a oni žrtvovani nakon 2,5, odnosno nakon 6 h gladni.



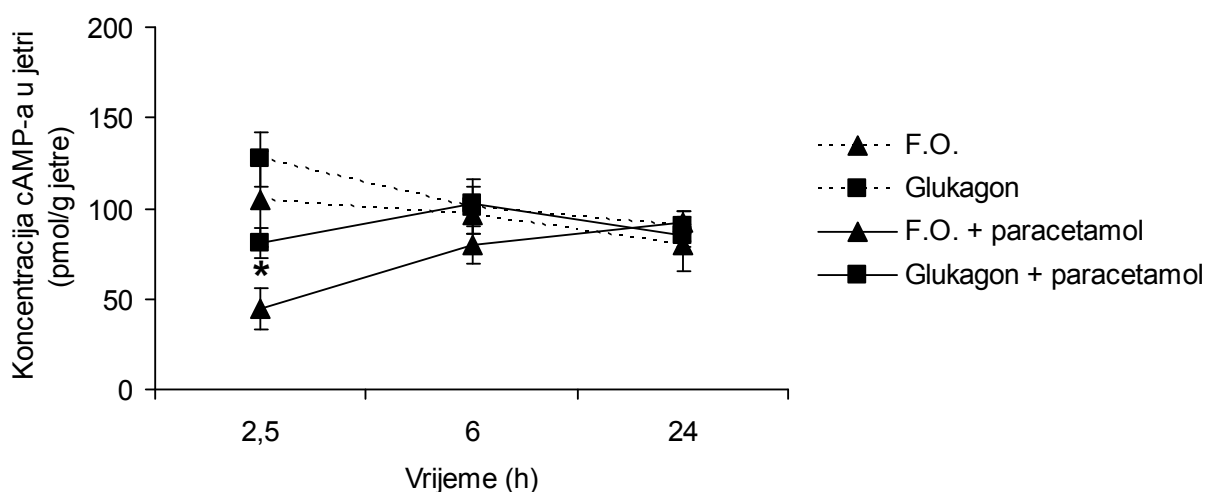
Slika 4.11. Utjecaj glukagona na koncentraciju GSH u jetri. Miševima je uštrcana fiziološka otopina ili glukagon (0,05 mg/kg) 15 minuta prije primjene paracetamola (150 mg/kg) ili samo fiziološka otopina ili samo glukagon. Jetrene koncentracije GSH su određene u naznačenim vremenima nakon primjene paracetamola. Točke prikazuju srednju vrijenost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=4-8 za skupine koje nisu primile paracetamol, odnosno 8-16 za skupine tretirane paracetamolom). Prikazani su objedinjeni rezultati dvaju pokusa. F.O.- fiziološka otopina.

* $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (Studentov t test)

$p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu, bez paracetamola (Studentov t-test)

4.3.6. Koncentracija cAMP-a

Dva i pol sata nakon otrovanja paracetamolom došlo je do značajnog pada razine cAMP-a u jetri, ali već nakon 6 h koncentracija se vratila na normalne vrijednosti. Tretman glukagonom prije paracetamola je smanjio pad razine cAMP-a u razdoblju 2,5 h nakon paracetamola, a u preostale dvije vremenske točke nije bilo značajne razlike (slika 4.12.).



Slika 4.12. Utjecaj glukagona na koncentraciju cAMP-a u jetri. Miševima je uštrcana fiziološka otopina ili glukagon (0,05 mg/kg) 15 minuta prije primjene paracetamola (150 mg/kg) ili samo fiziološka otopina ili samo glukagon. Jetrene koncentracije cAMP-a su određene u naznačenim vremenima nakon primjene paracetamola. Točke prikazuju srednju vrijednost, a okomite crte standardnu pogrešku srednje vrijednosti (N=4-8 za skupine koje nisu primile paracetamol, odnosno 8-16 za skupine tretirane paracetamolom). Prikazani su objedinjeni rezultati dvaju pokusa. F.O.-fiziološka otopina.

* $p < 0,05$ u odnosu na skupinu koja je primila fiziološku otopinu prije paracetamola (Studentov t-test)

5. RASPRAVA

Glukagon je gušteračin polipeptidni hormon, otkriven je 1923. godine, a glavne njegove funkcije (poticanje glikogenolize i glukoneogeneze u jetri, kočenje sinteze glikogena i povećanje koncentracije glukoze u plazmi...) su detaljno istražene 70-tih i 80-tih godina prošlog stoljeća (68). Međutim, prema istraživanjima objavljenim u posljednjih desetak godina čini se da glukagon ima i, potencijalno važnu, hepatoprotektivnu ulogu u nekim modelima oštećenja jetre (52, 69, 73). Tako je na primjer u jednom istraživanju pokazano da glukagon štiti jetru od oštećenja LPS-om (52), a u drugom istraživanju je pokazano da miševi s odstranjenim genom za glukagonski receptor (*Gcgr*^{-/-}) razvijaju veći stupanj apoptoze jetre od divljih miševa u apoptotičkom modelu oštećenja jetre. Također je pokazano da divlji miševi koji prije induciranja apoptoze jetre prime injekciju glukagona imaju manji stupanj oštećenja jetre i manju aktivnost kaspaze 8 od divljih miševa koji prije induciranja apoptoze prime injekciju fiziološke otopine (73). Pokazano je i da jetreni presadci dulje preživljavaju, ako se čuvaju u otopini u kojoj je dodan glukagon (74, 75). U našem smo istraživanju istražili, da li primjena glukagona i drugih tvari koje dovode do povećanja razine cAMP-a u jetri imaju utjecaj na stupanj oštećenja jetre u modelu akutnog oštećenja jetre izazvanog paracetamolom.

Naši rezultati pokazuju da glukagon, kada se primjeni 15 minuta prije paracetamola ima protektivan učinak: 1) razine ALT-a i histopatološki vidljivog oštećenja jetre bile su znatno niže u skupini miševa koji su primili glukagon prije paracetamola nego u kontrolnoj skupini koja je prije paracetamola primila fiziološku otopinu (slika 4.1. i tablica 4.1.) i 2) u pokusu u kojem je praćeno preživljenje životinja zamijećeno je da glukagon smanjuje smrtnost miševa otrovanih paracetamolom (slika 4.2.). Slične rezultate smo dobili i s rolipramom (inhibitorom PDE-4), lijekom koji povisuje razinu cAMP-a u jetri neovisno o aktivaciji glukagonskih receptora i sa stabilnim analogom cAMP-a - db-cAMP-om (slike 4.5. i 4.6.). Ovi rezultati upućuju na zaključak da je hepatoprotektivan učinak glukagona, poput većine drugih njegovih učinaka, najvjerojatnije posredovan povećanjem razine cAMP-a u jetri. Slično je pokazano i za druga dva modela oštećenja jetre u kojima je do sada pokazan hepatoprotektivan učinak glukagona: u modelu oštećenja jetre LPS-om je pokazano da db-cAMP i rolipram također štite od oštećenja jetre LPS-om, a u apoptotičkom modelu oštećenja jetre sličan učinak je dobiven s forskolinom, lijekom koji aktivira-adenilil ciklazu neovisno o aktivaciji glukagonskih receptora (65, 73, 77). Primijetili smo i da 2,5 h nakon otrovanja

paracetamolom dolazi do sniženja razine cAMP-a u jetri što do sada nije bilo opisano (slika 4.12.). Ovaj naš nalaz također posredno upućuje na zaključak da je protektivan učinak glukagona vjerojatno bio posredovan povećanjem razine cAMP-a.

U pokusima u kojima smo istraživali ovisnost učinka glukagona o vremenu primjene vidjelo se da glukagon ima značajan protektivan učinak kada se primjeni 15 minuta prije ili 1 sat nakon otrovanja paracetamolom – skupine miševa tretirane glukagonom u tim razdobljima su imale statistički značajno bolje preživljenje, manju razinu ALT-a i manje histopatološki vidljivo oštećenje jetre u odnosu na kontrolnu skupinu (slike 4.2. i 4.3. i tablica 4.2.). Međutim, učinak glukagona je bio slabiji kada je bio primijenjen 90 minuta prije ili 2 sata nakon paracetamola (slike 4.3. i 4.4. i tablica 4.2.). U već spomenutim istraživanjima o učinku glukagona na apoptotičko oštećenje jetre i na oštećenje jetre LPS-om vremenska ovisnost učinkovitosti glukagona nije istraživana – u istraživanju koje je pokazalo hepatoprotektivnu ulogu glukagona u apoptotičkom modelu oštećenja jetre glukagon je bio primjenjivan 30 minuta prije JO2 protutijela (73), a u modelu oštećenja jetre LPS-om glukagon je primjenjivan istovremeno s LPS-om (52), naši rezultati upućuju da je vremenski raspon učinkovitosti glukagona kratkotrajan.

Paracetamol je smanjio razinu GSH u jetri. Glukagon, primijenjen prije paracetamola, nije spriječio gubitak GSH uzrokovan paracetamolom, ali je ubrzao oporavak razine GSH prema normalnim vrijednostima (slika 4.11.). Brži oporavak razine GSH u jetri bi mogao biti posredovan ili povećanjem sinteze novog GSH ili smanjenjem gubitka novostvorenog GSH; s obzirom da prema jednom istraživanju glukagon smanjuje sintezu GSH, vjerojatnijim se čini drugi mehanizam (89). Ovi nalazi upućuju na zaključak da protektivan učinak glukagona nije posredovan smanjenjem metabolizma paracetamola u NAPQI. Naime tvari koje svoj protektivan učinak ostvaruju inhibicijom te pretvorbe (npr. dimetilsulfoksid) u potpunosti blokiraju gubitak GSH uzrokovan paracetamolom pa razina GSH ostaje cijelo vrijeme na normalnoj razini (50, 90).

Važan nalaz je i da glukagon kada se primijeni sam (bez paracetamola) kratkotrajno smanjuje razinu jetrenog GSH (slika 4.11). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima Lu i sur. (89). Smanjenje razine GSH bi moglo imati negativne posljedice na ishod oštećenja jetre paracetamolom i drugim hepatotoksičnim tvarima. Naša pretpostavka je da je ovaj

nepovoljan učinak glukagona bio nadjačan drugim, pozitivnim učincima, kao što je na primjer smanjenje izraženosti i aktivnosti iNOS-a. Pad razine GSH ima patogenetsku ulogu i u modelima oštećenja jetre LPS-om (91), odnosno apoptozom (92). U istraživanjima koja su pokazala protektivnu ulogu glukagona u tim modelima razina GSH, na žalost, nije praćena (52, 73). U svakom slučaju, bilo bi zanimljivo istražiti da li bi se eventualnim suzbijanjem ove neželjene posljedice davanja glukagona, ili nadoknadom GSH uz terapiji glukagonom, mogli postići bolji rezultati protekcije glukagonom.

Prije nekoliko godina je pokazano da glukagon i cAMP smanjuju aktivnost i izraženost iNOS-a u jetri (52). Rezultati pokusa u kojima smo mjerili aktivnost i izraženost iNOS-a upućuju na zaključak da bi hepatoprotektivan učinak glukagona protiv oštećenja jetre paracetamolom jednim dijelom mogao biti posredovan blokadom aktivnosti i izraženosti iNOS-a. Skupina miševa koja je bila tretirana glukagonom i paracetamolom je imala značajno manju koncentraciju nitrita i nitrata u plazmi i izraženost iNOS-a u jetri u odnosu na skupinu koja je prije paracetamola primila fiziološku otopinu (slike 4.8. i 4.9. i tablica 4.3.). Slično kao i u drugim istraživanjima (49, 93) povećanje koncentracije nitrita i nitrata je bilo najvidljivije 6 h nakon otrovanja paracetamolom, a 24 h nakon otrovanja vrijednosti su pale na bazalnu razinu (slika 4.8.).

Dosadašnja istraživanja o ulozi iNOS-a u ovom modelu su vrlo proturječna. Povećanu aktivnost iNOS-a pri akutnom oštećenju jetre paracetamolom prvi su opisali Gardner i sur. u pokusima na štakorima. Također su pokazali da aminogvidin, specifični inhibitor iNOS-a smanjuje toksičnost paracetamola i zaključili da aktivacija iNOS-a doprinosi oštećenju jetre paracetamolom (26). Daljnja istraživanja su isprva poduprla ovo mišljenje jer se pokazalo da su miševi s odstranjenim genom za iNOS manje otporni na oštećenje jetre paracetamolom od divljih miševa (27). Međutim Hinson i sur. ubrzo zatim objavljuju istraživanje u kojem sa specifičnim inhibitorima iNOS-a dobivaju upravo suprotne rezultate tj. da povećavaju toksičnost paracetamola, a za miševe s odstranjenim genom za iNOS da su jednako podložni oštećenju paracetamolom (94). Rezultati Ita i sur. i Kamanake i sur., objavljeni kasnije, su u skladu sa prvotnim rezultatima Gardnara i sur. i pokazuju protektivnu ulogu specifičnih inhibitora iNOS-a (48, 49). U istraživanju Ita i sur. je ispitan i učinak nespecifičnog inhibitora NOS-a (koji ne inhibira samo iNOS već i druge NO-sintaze), za koji je pokazano da pogoršava oštećenje jetre, pa je predložena hipoteza da male, bazalne količine NO-a (koje

stvara cNOS) imaju protektivno djelovanje, a prevelike količine proizvedene aktivacijom iNOS-a štetno (48). Ova hipoteza nije u skladu s rezultatima Salhanicka i sur. prema kojima nisu samo miševi s odstranjenim genom za iNOS otporniji na paracetamol nego su to i miševi s odstranjenim genom za eNOS (95).

Dodatnu poteškoću u razumijevanje uloge NO-a u ovom modelu oštećenja jetre donose pokusi s donorima NO-a, tvarima koji otpuštaju NO i tako povisuju koncentraciju NO-a u jetri. U dvama odvojenim istraživanjima je pokazano da NO donori NCX-1000 odnosno VPYRRO/NO štite jetru od oštećenja paracetamolom (50, 96). No, premda su te stvari povećavale razinu NO-a u jetri, proizvodnja endogenog NO-a i izraženost iNOS-a je bila manja. Također je pokazano da nitroparacetamol (derivat paracetamola koji otpušta NO) ima manji toksični učinak od paracetamola, uz bolje analgetičko i antipiretičko djelovanje (97). No, članci o protektivnom učinku NCX-1000 i manjoj toksičnosti nitroparacetamola su povučeni prošle godine. Obrnuto od ovih rezultata, Ito i sur. su u pokusima s NO-donorom SNAP-om pokazali da on povećava toksičnost paracetamola. Također su naveli da su u prvotnom planu željeli koristiti VPYRRO/NO, kao i Liu i sur. u svom istraživanju, ali da su odustali od njegove uporabe nakon preliminarnih pokusa, jer se pokazalo da je VPYRRO/NO slabo topljiv u vodi, a topljiv je u etanolu. Stoga su kontrolnoj skupini miševa, prije paracetamola, uštrcali istu količinu etanola koju su dobili i miševi tretirani s VPYRRO/NO i u obje skupine miševa nisu našli nikakvo oštećenje jetre (48). Za etanol je otprije poznato da njegova akutna primjena prije paracetamola smanjuje oštećenje jetre paracetamolom zbog interferencije s metabolizmom CYP enzima (smanjuje pretvorbu paracetamola u NAPQI) (98, 99). Iako su mogli ponoviti pokus s većom dozom paracetamola, odlučili su izbjeći uporabu organskih otapala (paracetamol je umjereno topljiv u vodi pa bi davanje veće doze paracetamola zahtijevalo i dodavanje nove količine organskog otapala) i upotrijebiti drugi NO-donor – SNAP koji je topljiv u vodi (48). U istraživanju Liu-a i sur. u kojem je pokazan protektivan učinak VPYRRO/NO-a ne navodi se u kojem otapalu je VPYRRO/NO bio otopljen, a navodi se da je kontrolna skupina prije paracetamola dobila fiziološku otopinu. Također je navedeno da je paracetamol dat otopljen u fiziološkoj otopini u dozi od 600 mg/kg u volumenu od 25 mL/kg (50) što prema podacima o topljivosti paracetamola i našem iskustvu nije moguće. Dakle, moguće je da je u ovom istraživanju protektivan učinak VPYRRO/NO posljedica pogreške u eksperimentalnom dizajnu, tj. da kontrolna skupina prije

paracetamola nije primila odgovarajući vehikulum (vehikulum u kojem je bio otopljen VPYRRO/NO).

Neadekvatna uporaba organskih otapala je glavni uzrok pogreške u istraživanjima oštećenja jetre paracetamolom. Tako su na primjer El-Hassan i sur. objavili da inhibitor kaspaze Z-VAD-fmk ima jak protektivan učinak protiv otrovanja paracetamolom (100), a kasnije je pokazano da je protektivan učinak zapravo bio posredovan dimetilsulfoksidom (DMSO), otapalom u kojem je Z-VAD-fmk bio otopljen, a ne sa Z-VAD-fmk-om (101). Kontrolna skupina u tom istraživanju je prije paracetamola primila fiziološku otopinu, ali bez dodatka DMSO-a koji je bio dodan u vehikulum za Z-VAD-fmk. Međutim, i bez ovako vidljive pogreške u eksperimentalnom dizajnu uporaba otapala ponekad može dovesti do pogreške. Liu i sur. su nedavno objavili da prirodnoćelne stanice (NK stanice, prema engl. natural killer cells) imaju patogenetsku ulogu u otrovanju paracetamolom (102), a kasnije je pokazano da je to istina samo kada se paracetamol primjeni otopljen uz pomoć DMSO-a, a ne i kad se otopi u fiziološkoj otopini (103). Najvjerojatnije objašnjenje ove razlike je činjenica da DMSO djeluje na imunološki sustav kao adjuvans (103, 104).

Otapala se u paracetamolskim istraživanjima upotrebljavaju zbog dva razloga: 1) za otapanje neke tvari čiji se utjecaj na otrovanje paracetamola ispituje i 2) za otapanje samog paracetamola. Zbog velike metodološke važnosti i mogućih eksperimentalnih artefakata, mi smo, paralelno s našim sadašnjim istraživanjem, dodatno istraživali problem uporabe najčešćih organskih otapala (105). Usporedili smo učinak etanola, DMSO-a, propilen glikola (PG), otapala čiji je protektivan učinak otprije poznat, te dimetilformamida (DMF) i detergenta TWEEN 20 čiji učinak ranije nije bio istražen. Dobiveni rezultati su pokazali da čak i minimalne doze DMF-a i DMSO-a jako interferiraju s toksičnošću paracetamola, da je učinak PG-a i etanola umjereno jak i da TWEEN 20 ne interferira s toksičnošću paracetamola (105). Upozorili smo i na činjenicu da se organska otapala često bespotrebno dodaju u vehikulum za paracetamol te da se paracetamol u toksičnim koncentracijama može otopiti u zagrijanoj fiziološkoj otopini uz blago magnetsko miješanje (v. Materijal i metode u ovom radu). Liu i sur. su izvijestili da u C57BL miševa doza od 300 mg/kg nije dovoljna za izazivanje oštećenja jetre i da je taj soj miševa rezistentniji od ostalih sojeva, ali se kasnije ispostavilo da su dodavali DMSO u vehikulum za paracetamol (102, 103). Prema našem iskustvu doza paracetamola od 300 mg/kg izaziva znatno oštećenje jetre i kod CBA, C57BL/6

i kod BALB/c miševa, a nedavno je objavljeno istraživanje koje to isto pokazuje za desetak drugih sojeva (106). Kada se DMSO ili PG dodaju u vehikulum za paracetamol, doza paracetamola se mora povećati na 600 ili čak 750 mg/kg (107) za dobivanje jednakog stupnja oštećenja jetre, što nepotrebno povećava količinu dodanog biološki aktivnog organskog otapala. Ukoliko u nekih miševa doza od 300 mg/kg ipak nije dovoljna za izazivanje oštećenja jetre, za poboljšanje topljivosti paracetamola vjerojatno je najbolje koristiti TWEEN 20 jer najmanje interferira s pretvorbom paracetamola u NAPQI, a nema podataka o njegovom djelovanju na aktivnost imunološkog sustava, koagulacijski sustav ili o antioksidansom djelovanju, što bi sve moglo utjecati na mehanizme oštećenja paracetamolom (108, 109). Za većinu drugih otapala je pokazano da pored ometanja pretvorbe paracetamola u NAPQI imaju učinak i na neki od navedenih mehanizama (104, 110-113).

Dakle, jedan dio objašnjenja ovako proturječnih podataka o ulozi iNOS-a vjerojatno je korištenje različitih organskih otapala u istraživanjima, ali postoji i niz drugih mogućih uzroka: korišteni su različiti sojevi miševa, u većini istraživanja miševima je odstranjivana hrana prije pokusa, ali u nekima su miševi bili siti, oštećenje jetre je procjenjivano u različitim vremenskim razdobljima (od 4 do 30 h nakon otrovanja), a korišteni su i različiti parametri za procjenu stupnja oštećenja jetre (uglavnom ALT u kombinaciji s histopatološkim nalazom kao u našem istraživanju, ali negdje i AST, laktat dehidrogenaza, bilirubin...) (26, 27, 48, 49, 94, 103).

Kao što je vidljivo u rezultatima, otrovanje paracetamolom je dovelo do pojačane aktivnosti NF- κ B u jetri, što je u skladu s brojnim drugim istraživanjima (slika 4.10 i tablica 4.3.). Glukagon primijenjen prije paracetamola nije doveo do promjene u aktivnosti NF- κ B u jetrama miševa otrovanih paracetamolom, što znači da protektivan učinak glukagona u ovom modelu najvjerojatnije nije posredovan modulacijom aktivnosti NF- κ B. Ovo se razlikuje od rezultata Herbrechta i sur. o protektivnom učinku glukagona u modelu oštećenja jetre LPS-om, gdje je LPS doveo do povećanja aktivnosti NF- κ B, a glukagon je smanjio njegovu aktivnost (52). Ova dva modela oštećenja jetre unatoč nekim sličnostima imaju i brojne razlike, pa je moguće da je razlika u rezultatima posljedica razlike u modelima.

Pojačana aktivnost NF- κ B u jetrama miševa nakon otrovanja paracetamolom je prvi put zapažena 1995. godine (39) i od tada je potvrđena u mnogim istraživanjima. Za neke tvari

koje štite od otrovanja paracetamolom (PGE2, gadolinij klorid...) je pokazano da smanjuju povećanje aktivnosti NF- κ B, pa je pretpostavljeno da dio svojih učinaka ostvaruju putem smanjenja te aktivnosti (35, 114). Ipak, s druge strane je pokazano da postoje tvari koje smanjuju aktivnost NF- κ B, ali ne smanjuju oštećenje paracetamolom, a neke ga čak i povećavaju (115). Također, neke tvari su povećavale aktivnost NF- κ B i štitile od oštećenja paracetamolom (116). U pokusima na transgeničnim miševima, vidjelo se da inaktivacija gena za NF- κ B ne mijenja stupanj osjetljivosti mišenja na otrovanje paracetamolom (43).

Moguće objašnjenje ovako divergentnih rezultata je velik broj gena koje regulira NF- κ B. Pojačana aktivnost NF- κ B dovodi do pojačane izraženosti gena za TNF- α i iNOS, koji vjerojatno igraju patogenetsku ulogu u ovom modelu oštećenja jetre, međutim NF- κ B također pojačava i izraženost nekih gena koji bi mogli igrati protektivnu ulogu, kao što su na primjer gen za ciklooksigenazu 2 (enzim koji bi povećanom produkcijom citoprotektivnog PGE2 mogao imati protektivan učinak), interleukin 6 (čimbenik rasta hepatocita čija je protektivna uloga u mnogim modelima oštećenja jetre već pokazana), glutathion-S-transferazu i hem-oksigenazu 1 (117-119). Za povećanje aktivnosti enzima hem-oksigenaze 1 je pokazano da može smanjiti oštećenje jetre u brojnim modelima oštećenja jetre, uključujući i paracetamolski model što se nastoji iskoristiti za sintezu novih lijekova, hem-oksigenaza 1 razgrađuje hem na biliverdin, ugljikov monoksid (CO) i željezo (Fe^{2+}). Za svaki od ovih razgradnih proizvoda je pokazano da može doprinijeti hepatoprotekciji: biliverdin se pretvara u bilirubin i djeluje kao antioksidans, Fe^{2+} ima citoprotektivan učinak, a CO izaziva vazodilataciju, smanjuje agregaciju trombocita i ima protuupalno i antiapoptotičko djelovanje (44, 120, 121). Zanimljivo je da je u jednom istraživanju pokazano da glukagon, djelujući preko PKA, povećava aktivnost hem-oksigenaze 1 (122), pa bi protektivan učinak glukagona jednim dijelom mogao biti posredovan i ovim mehanizmom. U svakom slučaju čini se da su učinci pojačanja ili smanjenja aktivnosti NF- κ B suviše raznoliki, a da bi se na temelju učinka koju neka tvar ima na aktivnost NF- κ B mogao dati jednoznačan odgovor o učinku te tvari na ishod otrovanja paracetamolom.

Da je cAMP važan za regeneraciju jetre indirektno pokazuju pokusi u kojim smo mjerili unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a u jetrenim stanicama miševa intoksiciranih paracetamolom. Nakon primjene paracetamola koncentracija cAMP-a u jetrenim stanicama se signifikantno smanjuje za oko 3 puta. Taj pad koncentracije cAMP-a je manji i brže se vraća

na normalnu razinu u miševa koji su prethodno dobili glukagon (slika 4.12.). Iz tih razloga se db-cAMP ili tvari koji sprečavaju njegovu razgradnju (PDE-inhibitori) dodaju životinjama ili izvađenoj jetri da bi se očuvala njena vitalnost nakon transplantacije (123-126). Pokazalo se da viabilnost jetre, njena otpornost na reperfuzijsku ozljedu nakon transplantacije te preživljenje transplantata korelira sa unutarstaničnom razinom cAMP-a. Vrlo slično je pokazano kad je prezervacijskoj tekućini dodan glukagon (74, 75).

Zanimljivo je spomenuti i da je u jednom istraživanju pokazano da su miševi s eksperimentalno izazvanim dijabetesom mellitusom tipa 2 otporniji na oštećenje jetre izazvano paracetamolom od normalnih, zdravih miševa. Ovaj fenomen do sada nije u potpunosti razjašnjen (127). Kako miševi oboljeli od dijabetesa tipa 2 imaju veće plazmatske koncentracije glukagona od zdravih miševa (128) čini se mogućim da bi to mogao biti uzrok njihove veće otpornosti na paracetamol. Ipak za potvrdu ove hipoteze potrebno je napraviti novo istraživanje na miševima sa eksperimentalno induciranim dijabetesom tipa 2.

Zaključno, naša su istraživanja pokazala da glukagon i njegov sekundarni glasnik cAMP imaju umjereno jak i vremenski ograničen, protektivan učinak u modelu oštećenja jetre paracetamolom. Moguće je da je jedan dio protektivnog učinka posredovan smanjenjem izraženosti i aktivnosti iNOS-a u jetri, ali u obzir dolaze i brojni drugi mehanizmi. Čini se da glukagon svoje učinke u ovom modelu ne ostvaruje modulacijom aktivnosti NF- κ B. Pokazali smo i da osim protektivnih učinaka glukagon posjeduje i učinke koji mogu imati negativne posljedice na jetreno oštećenje paracetamolom, ali i drugim tvarima – smanjuje razinu GSH u jetri. Moguće je da je jedan dio protektivnog učinka glukagona bio umanjen ovim učinkom. Iz svega navedenog je vidljivo da su molekularni mehanizmi protekcije/toksičnosti glukagona izuzetno složeni i nisu do kraja razjašnjeni pa su potrebni dodatni napori u njihovom rasvjetljavanju. U eventualnim daljnjim istraživanjima o terapijskom učinku glukagona u ovom ili drugim modelima oštećenja jetre trebalo bi voditi računa o negativnom učinku na razinu GSH i ispitati mogu li se bolji rezultati postići eventualnim suzbijanjem tog učinka ili pojačanom nadoknadom GSH. Također prilikom razvoja lijekova koji blokiraju djelovanje glukagona ili mišjih modela u kojima je smanjeno djelovanje glukagona trebalo bi voditi računa o mogućoj povećanoj osjetljivosti jetre na oštećenje paracetamolom ili drugim hepatotoksičnim tvarima.

6. ZAKLJUČCI

1. Glukagon (0,5 mg/kg, i.p.), uštrcan miševima 15 min prije ili 1 h nakon primjene paracetamola, ima hepatoprotektivni učinak; primjena glukagona značajno je povećala preživljenje životinja te smanjila povećanje plazmatske koncentracije ALT-a i stupanj patohistoloških promjena u jetri.

2. Jedan od mogućih mehanizama hepatoprotektivnog djelovanja glukagona je inhibicija izraženosti i aktivnosti iNOS-a, jer paracetamol u znatnoj mjeri povećava izraženost iNOS-a u citoplazmi jetrenih stanica i koncentraciju nitrita i nitrata u plazmi, a glukagon značajno smanjuje ovaj učinak paracetamola na iNOS u jetrenim stanicama i koncentraciju nitrita i nitrata u plazmi.

3. Protektivan učinak glukagona nije posredovan blokadom pretvorbe paracetamola u visokoreaktivni NAPQI, jer primjena glukagona nije smanjila gubitak GSH uzrokovan primjenom paracetamola.

4. Hepatoprotektivni učinak glukagona u ovom modelu nije posredovan modulacijom aktivnosti NF- κ B; primjena paracetamola je u znatnoj mjeri povećala aktivaciju i translokaciju NF- κ B iz citoplazme u jezgru jetrenih stanica. Primjena glukagona nije dovela do promjene u aktivaciji i translokaciji NF- κ B .

5. Povećanje razine jetrenog cAMP-a je vjerojatni mehanizam kojim glukagon ostvaruje svoje protektivne učinke; primjena paracetamola je u znatnoj mjeri smanjila razinu cAMP-a u jetri, a primjena glukagona je smanjila pad razine cAMP-a. Nadalje, tvari koje povećavaju razinu cAMP-a u jetri neovisno o aktivaciji glukagonskih receptora, poput roliprama (inhibitor fosfodiesteraze) i db-cAMP-a (stabilni analog cAMP-a) imaju sličan, hepatoprotektivni učinak.

6. Povećanje razine jetrenog cAMP-a bi mogao biti zajednički mehanizam kojim različite hepatoprotektivne tvari (glukagon, rolipram, PGE₂) ostvaruju svoj učinak.

7. SAŽETAK

U posljednjih desetak godina su objavljena istraživanja koja pokazuju da bi glukagon, osim dobro poznatih fizioloških učinaka, mogao imati i, potencijalno važnu, hepatoprotektivnu ulogu. Dosad je pokazano da glukagon štiti jetru od apoptotičkog oštećenja i od oštećenja lipopolisaharidom. Također, pokazano je da presađci jetre, za vrijeme hladne prezervacije organa, dulje preživljavaju ako se čuvaju u otopini kojoj je dodan glukagon. Pokazano je i da je protektivan učinak glukagona, poput većine njegovih drugih učinaka, posredovan povećanjem razine cikličnog adenzin-monofosfata (cAMP-a). U našem istraživanju smo ispitali ima li glukagon učinka u modelu oštećenja jetre paracetamolom i neke od mogućih mehanizama kojima te učinke ostvaruje. Pokusi su obavljeni na visokosrodnim mišjim sojevima CBA (mužjaci) kojima je uštrcana letalna (300 mg/kg) ili visoka subletalna (150 mg/kg) doza paracetamola, i.p. Stupanj oštećenja jetre je procijenjen praćenjem preživljenja životinja, mjerenjem koncentracije alanin aminotransferaze (ALT) u plazmi i određivanjem histološkog stupnja oštećenja jetre. Imunohistokemijskim metodama je određena aktivnost čimbenika NF- κ B i izraženost inducibilne NO-sintaze (iNOS), a mjerena je i razina reduciranog glutationa (GSH) i cAMP-a u jetri. Naši rezultati pokazuju da glukagon ima protektivan učinak u ovom modelu i da je učinak ovisan o dozi (najjači učinak smo dobili s dozom 0.5 mg/kg, i.p.) i vremenu primjene - glukagon je smanjio oštećenje jetre kada je uštrcan 15 min prije ili 1 h nakon paracetamola, dok u ranijem ili kasnijem razdoblju nije imao učinka. Rolipram, inhibitor fosfodiesteraze i db-cAMP, stabilni analog cAMP-a su imali učinak sličan glukagonovom. Nakon otrovanja paracetamolom došlo je do povećanja razine nitrita i nitrata u plazmi, povećane izraženosti iNOS-a i NF- κ B, i pada razine GSH i cAMP-a u jetri kontrolnih životinja (koje su uz paracetamol primili fiziološku otopinu). Životinje koje su uz paracetamol primile glukagon imale su u usporedbi s kontrolnom skupinom veću razinu cAMP-a u jetri, manju razinu nitrita i nitrata u plazmi i manju izraženost iNOS-a u jetri. Glukagon nije spriječio pad razine GSH u jetri, ali je oporavak prema normalnim vrijednostima bio brži, dok u aktivnosti NF- κ B nije bilo razlike. Zaključno, naša su istraživanja pokazala da glukagon i njegov sekundarni glasnik cAMP imaju, umjereno jak i vremenski ograničen, protektivan učinak u modelu oštećenja jetre paracetamolom. Moguće je da je jedan dio protektivnog učinka posredovan smanjenjem izraženosti i aktivnosti iNOS-a u jetri, ali u obzir dolaze i drugi mehanizmi. Čini se da glukagon svoje učinke u ovom modelu ne ostvaruje modulacijom aktivnosti NF- κ B.

Ključne riječi: paracetamol, glukagon, ciklični adenzin monofosfat, inducibilna-dušikov-2-
oksid-sintaza, nuklearni čimbenik kappa B, oštećenje jetre

8. SUMMARY

Title: Effect of glucagon and cyclic adenosine monophosphate on paracetamol-induced liver injury

Recent investigations suggest that glucagon, beside its well known physiological effects, might have a potentially important hepatoprotective activity. Until now, it was shown that glucagon protects against apoptotic and lipopolysaccharide-induced liver injury. Also, it was shown that liver transplants, during the cold preservation, survived longer, when in preservation-solution glucagon was added. Like most of its effects, the hepatoprotective activity of glucagon was shown to be mediated by elevation of cAMP level in liver. In our investigation, we investigated the effect of glucagon in a model of paracetamol-induced liver injury and some of the possible mechanisms of its action. CBA male mice were injected with lethal (300 mg/kg) or sublethal (150 mg/kg) dose of paracetamol, i.p. The liver injury was assessed by observing the survival of mice, by liver histology and by measuring concentration of alanine-aminotransferase (ALT) in plasma. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NF- κ B (p65) protein expressions were determined immunohistochemically. GSH and cAMP levels in liver were also measured. Our results show that glucagon has a protective effect in this model of liver injury and that the effect depends on a dose (the strongest protection was achieved with a dose of 0.5 mg/kg) and on a time of application - glucagon alleviated liver injury when given 15 min before or 1 h after paracetamol, whereas in earlier or later treatment it had no effect. Rolipram, an inhibitor of phosphodiesterase and db-cAMP, stable analog of cAMP, had protective effects similar to that of glucagon. In comparison with normal, untreated animals, animals treated with saline and paracetamol (control group) had elevated nitrite plus nitrate concentration in plasma, enhanced iNOS and NF- κ B expression in liver and reduced GSH and cAMP concentration in liver. Animals treated with glucagon and paracetamol had higher hepatic cAMP level, lower nitrite plus nitrate concentration in plasma and lower expression of iNOS in liver cells than animals in control group, whereas there was no difference in NF- κ B expression. Glucagon did not prevent a loss of GSH content caused by paracetamol, but it did accelerate its recovery toward the normal levels. To conclude, our investigation indicates that glucagon and its secondary messenger cAMP have a moderately strong protective effect against paracetamol-induced liver injury. The protection is partially mediated through the downregulation of iNOS, but other mechanisms of protection are also

probably present. The protective effect of glucagon in this model appears not to be mediated by a modulation of NF- κ B activity.

Key words: paracetamol, glucagon, cyclic adenosine monophosphate, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappa B, liver injury

9. LITERATURA

1. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev* 2006;12(3-4):250-75.
2. Koch-Weser J. Drug therapy. Acetaminophen. *N Engl J Med* 1976;295(23):1297-300.
3. Bernal W. Intensive care support therapy. *Liver Transpl* 2003;9(9):S15-7.
4. Lee WM. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 2004;40(1):6-9.
5. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187(1):185-94.
6. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol* 2001;31(1):55-138.
7. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(5):1327-31.
8. Dahlin DC, Nelson SD. Synthesis, decomposition kinetics, and preliminary toxicological studies of pure N-acetyl-p-benzoquinone imine, a proposed toxic metabolite of acetaminophen. *J Med Chem* 1982;25(8):885-6.
9. Eder H. Chronic Toxicity Studies On Phenacetin, N-Acetyl-P-Aminophenol (Napa) And Acetylsalicylic Acid On Cats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1964;21:197-204.
10. Davidson DG, Eastham WN. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J* 1966;2(5512):497-9.
11. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(6):489-99.

12. Nourjah P, Ahmad SR, Karwoski C, Willy M. Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006;15(6):398-405.
13. Daly FF, Fountain JS, Murray L, Graudins A, Buckley NA. Guidelines for the management of paracetamol poisoning in Australia and New Zealand--explanation and elaboration. A consensus statement from clinical toxicologists consulting to the Australasian poisons information centres. *Med J Aust* 2008;188(5):296-301.
14. Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24(3):287-97.
15. Black M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Annu Rev Med* 1984;35:577-93.
16. Bromer MQ, Black M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2003;7(2):351-67.
17. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl* 2000;6(1):21-31.
18. Gunawan BK, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis* 2007;11(3):459-75, v.
19. Terneus MV, Brown JM, Carpenter AB, Valentovic MA. Comparison of S-adenosyl-L-methionine (SAME) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. *Toxicology* 2008;244(1):25-34.
20. Hinson JA, Pumford NR, Nelson SD. The role of metabolic activation in drug toxicity. *Drug Metab Rev* 1994;26(1-2):395-412.
21. Nelson SD. Metabolic activation and drug toxicity. *J Med Chem* 1982;25(7):753-65.
22. Zaher H, Buters JT, Ward JM, Bruno MK, Lucas AM, Stern ST, et al. Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;152(1):193-9.
23. Laine JE, Auriola S, Pasanen M, Juvonen RO. Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes. *Xenobiotica* 2009;39(1):11-21.
24. Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312(2):509-16.
25. Thibault N, Peytavin G, Claude JR. Calcium channel blocking agents protect against acetaminophen-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biochem Toxicol* 1991;6(3):237-8.

26. Gardner CR, Heck DE, Yang CS, Thomas PE, Zhang XJ, DeGeorge GL, i sur. Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 1998;27(3):748-54.
27. Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Sacco M, Durham SK, Bruno MK, i sur. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;184(1):27-36.
28. Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 2002;67(2):322-8.
29. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, i sur. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest* 2009;119(2):305-14.
30. Maher JJ. DAMPs ramp up drug toxicity. *J Clin Invest* 2009;119(2):246-9.
31. Decker K. Mechanisms and mediators in hepatic necrosis. *Gastroenterol Jpn* 1993;28 Suppl 4:20-5; discussion 33-5.
32. Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 1995;21(4):1045-50.
33. Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW, i sur. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem Res Toxicol* 2002;15(12):1504-13.
34. Guarner F, Boughton-Smith NK, Blackwell GJ, Moncada S. Reduction by prostacyclin of acetaminophen-induced liver toxicity in the mouse. *Hepatology* 1988;8(2):248-53.
35. Cavar I, Kelava T, Vukojevic K, Saraga-Babic M, Culo F. The role of prostaglandin E2 in acute acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Histol Histopathol* 2010;25(7):819-30.
36. Renic M, Culo F, Sabolovic D, Zupanovic Z. The effect of interleukin 1 alpha on acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Cytokine* 1993;5(3):192-7.
37. Renic M, Culo F, Sabolovic D. Protection of acute hepatotoxicity in mice by interleukin-1 α – the role of interleukin-6 and prostaglandin E2. *Periodic Biologor* 1995;97(1):55-60.

38. Bronstad GO, Christoffersen T, Johansen EJ, Oye I. Effect of prostaglandins and hormones on cyclic AMP formation in rat hepatomas and liver tissue. *Br J Cancer* 1978;38(6):737-44.
39. Blazka ME, Germolec DR, Simeonova P, Bruccoleri A, Pennypacker KR, Luster MI. Acetaminophen-induced hepatotoxicity is associated with early changes in NF-kB and NF-IL6 DNA binding activity. *J Inflamm* 1995;47(3):138-50.
40. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25(51):6680-4.
41. Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 2006;6(2):111-30.
42. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(1):49-62.
43. Dambach DM, Durham SK, Laskin JD, Laskin DL. Distinct roles of NF-kappaB p50 in the regulation of acetaminophen-induced inflammatory mediator production and hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;211(2):157-65.
44. Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 2006;39(5):479-91.
45. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004;18(18):2195-224.
46. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ J* 2009;73(6):986-93.
47. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998;113(2):147-56.
48. Ito Y, Abril ER, Bethea NW, McCuskey RS. Role of nitric oxide in hepatic microvascular injury elicited by acetaminophen in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286(1):G60-7.
49. Kamanaka Y, Kawabata A, Matsuya H, Taga C, Sekiguchi F, Kawao N. Effect of a potent iNOS inhibitor (ONO-1714) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Life Sci* 2003;74(6):793-802.
50. Liu J, Li C, Waalkes MP, Clark J, Myers P, Saavedra JE, et al. The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* 2003;37(2):324-33.

51. Harbrecht BG, Kim YM, Wirant EM, Shapiro RA, Billiar TR. PGE₂ and LTB₄ inhibit cytokine-stimulated nitric oxide synthase type 2 expression in isolated rat hepatocytes. *Prostaglandins* 1996;52(2):103-16.
52. Harbrecht BG, Perpetua M, Fulmer M, Zhang B. Glucagon regulates hepatic inducible nitric oxide synthesis in vivo. *Shock* 2004;22(2):157-62.
53. Smith FS, Ceppi ED, Titheradge MA. Inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression by glucagon and cAMP in cultured hepatocytes. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):187-92.
54. Hardman JG, Robison GA, Sutherland EW. Cyclic nucleotides. *Annu Rev Physiol* 1971;33:311-36.
55. Bourne HR, Lichtenstein LM, Melmon KL, Henney CS, Weinstein Y, Shearer GM. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* 1974;184(132):19-28.
56. Moore AR, Willoughby DA. The role of cAMP regulation in controlling inflammation. *Clin Exp Immunol* 1995;101(3):387-9.
57. Dastidar SG, Rajagopal D, Ray A. Therapeutic benefit of PDE4 inhibitors in inflammatory diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 2007;8(5):364-72.
58. Woo MS, Jang PG, Park JS, Kim WK, Joh TH, Kim HS. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyryl-cAMP in BV2 microglial cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;113(1-2):86-96.
59. Bailly S, Ferrua B, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA. Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine* 1990;2(3):205-10.
60. Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J Immunol* 2006;177(3):1956-66.
61. Pino MS, Nawrocki ST, Cognetti F, Abruzzese JL, Xiong HQ, McConkey DJ. Prostaglandin E₂ drives cyclooxygenase-2 expression via cyclic AMP response element activation in human pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005;4(11):1263-9.
62. Rudnick DA, Perlmutter DH, Muglia LJ. Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(15):8885-90.

63. Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592(3):345-58.
64. Freudenberg MA, Galanos C. Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infect Immun* 1991;59(6):2110-5.
65. Arai T, Hiromatsu K, Kobayashi N, Takano M, Ishida H, Nimura Y, i sur. IL-10 is involved in the protective effect of dibutylryl cyclic adenosine monophosphate on endotoxin-induced inflammatory liver injury. *J Immunol* 1995;155(12):5743-9.
66. Smyrniotis V, Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoropoulos T, Theodoraki K, Farantos C, i sur. Attenuation of ischemic injury by N-acetylcysteine preconditioning of the liver. *J Surg Res* 2005;129(1):31-7.
67. Abdollahi M, Chan TS, Subrahmanyam V, O'Brien PJ. Effects of phosphodiesterase 3,4,5 inhibitors on hepatocyte cAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and susceptibility to a mitochondrial toxin. *Mol Cell Biochem* 2003;252(1-2):205-11.
68. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284(4):E671-8.
69. Ali S, Drucker DJ. Benefits and limitations of reducing glucagon action for the treatment of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296(3):E415-21.
70. Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, i sur. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 1993;259(5101):1614-6.
71. Patel GK, Whalen GE, Soergel KH, Wu WC, Meade RC. Glucagon effects on the human small intestine. *Dig Dis Sci* 1979;24(7):501-8.
72. White CM. A review of potential cardiovascular uses of intravenous glucagon administration. *J Clin Pharmacol* 1999;39(5):442-7.
73. Sinclair EM, Yusta B, Streutker C, Baggio LL, Koehler J, Charron MJ, i sur. Glucagon receptor signaling is essential for control of murine hepatocyte survival. *Gastroenterology* 2008;135(6):2096-106.
74. Li XL, Man K, Ng KT, Sun CK, Lo CM, Fan ST. The influence of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on the ischemic injury during rat liver graft preservation. *Am J Transplant* 2005;5(6):1264-75.

75. Minor T, Akbar S. Enhancement of endogenous cyclic AMP signal: a new approach to allow for cold preservation of rat livers from non-heart-beating donors? *Transplantation* 1998;66(8):990-4.
76. Erceg D, Kelava T, Cavar I, Pasalic M, Culo F. The effect of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on acute liver toxicity in mice induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Coll Antropol* 2010;34 Suppl 1:273-7.
77. Taguchi I, Oka K, Kitamura K, Sugiura M, Oku A, Matsumoto M. Protection by a cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor, rolipram, and dibutyryl cyclic AMP against *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide-induced mouse hepatitis. *Inflamm Res* 1999;48(7):380-5.
78. Takano M, Arai T, Mokuno Y, Nishimura H, Nimura Y, Yoshikai Y. Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate protects mice against tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte apoptosis accompanied by increased heat shock protein 70 expression. *Cell Stress Chaperones* 1998;3(2):109-17.
79. Aoki M, Fukunaga M, Sugimoto T, Hirano Y, Kobayashi M, Honda K, i sur. Studies on mechanisms of low emetogenicity of YM976, a novel phosphodiesterase type 4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298(3):1142-9.
80. Fischer W, Schudt C, Wendel A. Protection by phosphodiesterase inhibitors against endotoxin-induced liver injury in galactosamine-sensitized mice. *Biochem Pharmacol* 1993;45(12):2399-404.
81. Gantner F, Kusters S, Wendel A, Hatzelmann A, Schudt C, Tiegs G. Protection from T cell-mediated murine liver failure by phosphodiesterase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280(1):53-60.
82. Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente Tavares AM, Kieling CO, da Silveira TR, i sur. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology* 2008;247(1):1-5.
83. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, i sur. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001;21(1):15-23.
84. Cavar I, Kelava T, Heinzl R, Culo F. The role of prostacyclin in modifying acute hepatotoxicity of acetaminophen in mice. *Coll Antropol* 2009;33 Suppl 2:25-9.

85. Silva VM, Chen C, Hennig GE, Whiteley HE, Manautou JE. Changes in susceptibility to acetaminophen-induced liver injury by the organic anion indocyanine green. *Food Chem Toxicol* 2001;39(3):271-8.
86. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82(1):70-7.
87. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
88. Almar MM, Diaz-Mayans J, Romero FJ. Glutathione content and GSH S-transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity. *Comp Biochem Physiol C* 1987;87(2):433-5.
89. Lu SC, Kuhlenkamp J, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N. Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin Invest* 1991;88(1):260-9.
90. Yoon MY, Kim SJ, Lee BH, Chung JH, Kim YC. Effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of acetaminophen in mice. *Biol Pharm Bull* 2006;29(8):1618-24.
91. Sun S, Zhang H, Xue B, Wu Y, Wang J, Yin Z, i sur. Protective effect of glutathione against lipopolysaccharide-induced inflammation and mortality in rats. *Inflamm Res* 2006;55(11):504-10.
92. Cazanave S, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A, i sur. High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice. *J Hepatol* 2007;46(5):858-68.
93. James LP, McCullough SS, Lamps LW, Hinson JA. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol Sci* 2003;75(2):458-67.
94. Hinson JA, Bucci TJ, Irwin LK, Michael SL, Mayeux PR. Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nitric Oxide* 2002;6(2):160-7.
95. Salhanick SD, Orlow D, Holt DE, Pavlides S, Reenstra W, Buras JA. Endothelially derived nitric oxide affects the severity of early acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Acad Emerg Med* 2006;13(5):479-85.
96. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Mencarelli A, Farneti S, Del Soldato P, i sur. Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. *Br J Pharmacol* 2004;143(1):33-42. Povučeni članak. obavijest o povlačenju u: *Br J Pharmacol*. 2009 Mar;156(5):868

97. Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Palazzetti B, Alvarez-Miller L, Muscara M, i sur. A NO-releasing derivative of acetaminophen spares the liver by acting at several checkpoints in the Fas pathway. *Br J Pharmacol* 2002;135(3):589-99. Povučeni članak. obavijest o povlačenju u: *Br J Pharmacol*. 2009 Mar;156(5):868
98. Lee SM, Cho TS, Kim DJ, Cha YN. Protective effect of ethanol against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice: role of NADH:quinone reductase. *Biochem Pharmacol* 1999;58(10):1547-55.
99. Prescott LF. Paracetamol, alcohol and the liver. *Br J Clin Pharmacol* 2000;49(4):291-301.
100. El-Hassan H, Anwar K, Macanas-Pirard P, Crabtree M, Chow SC, Johnson VL, i sur. Involvement of mitochondria in acetaminophen-induced apoptosis and hepatic injury: roles of cytochrome c, Bax, Bid, and caspases. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;191(2):118-29.
101. Jaeschke H, Cover C, Bajt ML. Role of caspases in acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci* 2006;78(15):1670-6.
102. Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004;127(6):1760-74.
103. Masson MJ, Carpenter LD, Graf ML, Pohl LR. Pathogenic role of natural killer T and natural killer cells in acetaminophen-induced liver injury in mice is dependent on the presence of dimethyl sulfoxide. *Hepatology* 2008;48(3):889-97.
104. Kunze M. Production of interferon in the white mouse by dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci* 1975;243:308-10.
105. Kelava T, Cavar I, Culo F. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88(10):960-7.
106. Harrill AH, Ross PK, Gatti DM, Threadgill DW, Rusyn I. Population-based discovery of toxicogenomics biomarkers for hepatotoxicity using a laboratory strain diversity panel. *Toxicol Sci* 2009;110(1):235-43.
107. Oz HS, Chen TS. Green-tea polyphenols downregulate cyclooxygenase and Bcl-2 activity in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Dig Dis Sci* 2008;53(11):2980-8.
108. Ganey PE, Luyendyk JP, Newport SW, Eagle TM, Maddox JF, Mackman N, i sur. Role of the coagulation system in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* 2007;46(4):1177-86.

109. Reisman SA, Aleksunes LM, Klaassen CD. Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes. *Biochem Pharmacol* 2009;77(7):1273-82.
110. Dunphy GB, Chen G, Webster JM. The antioxidants dimethylsulfoxide and dimethylthiourea affect the immediate adhesion responses of larval haemocytes from 3 lepidopteran insect species. *Can J Microbiol* 2007;53(12):1330-47.
111. Imbriani M, Ghittori S, Prestinoni A, Longoni P, Cascone G, Gamba G. Effects of dimethylformamide (DMF) on coagulation and platelet activity. *Arch Environ Health* 1986;41(2):90-3.
112. Chen CP, Boyadjieva NI, Advis JP, Sarkar DK. Ethanol suppression of the hypothalamic proopiomelanocortin level and the splenic NK cell cytolytic activity is associated with a reduction in the expression of proinflammatory cytokines but not anti-inflammatory cytokines in neuroendocrine and immune cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30(11):1925-32.
113. Denning DW, Webster AD. Detrimental effect of propylene glycol on natural killer cell and neutrophil function. *J Pharm Pharmacol* 1987;39(3):236-8.
114. Ding H, Peng R, Reed E, Li QQ. Effects of Kupffer cell inhibition on liver function and hepatocellular activity in mice. *Int J Mol Med* 2003;12(4):549-57.
115. Chiu H, Gardner CR, Dambach DM, Brittingham JA, Durham SK, Laskin JD, et al. Role of p55 tumor necrosis factor receptor 1 in acetaminophen-induced antioxidant defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(5):G959-66.
116. Ghosh A, Sil PC. Protection of acetaminophen induced mitochondrial dysfunctions and hepatic necrosis via Akt-NF-kappaB pathway: role of a novel plant protein. *Chem Biol Interact* 2009;177(2):96-106.
117. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3(3):221-7.
118. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 2001;7(12):1291-7.
119. Jimi E, Ghosh S. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev* 2005;208:80-7.
120. Aleksunes LM, Slitt AM, Cherrington NJ, Thibodeau MS, Klaassen CD, Manautou JE. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. *Toxicol Sci* 2005;83(1):44-52.

121. Ishida Y, Kondo T, Kimura A, Tsuneyama K, Takayasu T, Mukaida N. Opposite roles of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *Eur J Immunol* 2006;36(4):1028-38.
122. Immenschuh S, Kietzmann T, Hinke V, Wiederhold M, Katz N, Muller-Eberhard U. The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures. *Mol Pharmacol* 1998;53(3):483-91.
123. Akbar S, Minor T. Significance and molecular targets of protein kinase A during cAMP-mediated protection of cold stored liver grafts. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(11):1708-14.
124. Ikegami T, Nishizaki T, Hiroshige S, Ohta R, Yanaga K, Sugimachi K. Experimental study of a type 3 phosphodiesterase inhibitor on liver graft function. *Br J Surg* 2001;88(1):59-64.
125. Ishikawa H, Jin MB, Ogata T, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, i sur. Role of cyclic nucleotides in ischemia and reperfusion injury of canine livers. *Transplantation* 2002;73(7):1041-8.
126. Maeda T, Murase N, Subbotin V, Sakamoto T, Yamada T, Terakura M, i sur. Analogs of cyclic nucleotides in rat liver preservation. *Transplantation* 1998;66(7):844-51.
127. Sawant SP, Dnyanmote AV, Mitra MS, Chilakapati J, Warbritton A, Latendresse JR, i sur. Protective effect of type 2 diabetes on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Swiss-Webster mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(2):507-19.
128. Moritoh Y, Takeuchi K, Asakawa T, Kataoka O, Odaka H. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in combination with pioglitazone improves glycemic control, lipid profiles, and increases pancreatic insulin content in ob/ob mice. *Eur J Pharmacol* 2009;602(2-3):448-54.

10. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja: 11.8.1981., Zagreb, Hrvatska

Akademski stupanj: 2005.: doktor medicine

Obrazovanje:

1987.-1995. Osnovna škola Luka, Zagreb

1995.-1999. V gimnazija u Zagrebu

1999.-2005.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2007.- 2010.: Doktorski poslijediplomski studij u području biomedicine i zdravstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Zaposlenja i stručno usavršavanje:

2005.-2006.: liječnički staž u psihijatrijskoj bolnici Vrapče

2006. g položen državni ispit za doktora medicine

Od 2006. g. znanstveni novak-asistent pri Katedri za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, na projektu prof.dr.sc. Filipa Čule „Uloga proupalnih citokina i prostaglandina u akutnom oštećenju jetre“

Članstvo:

Od 2007.g.: Hrvatsko društvo fiziologa

Od 2007.g.: Hrvatsko imunološko društvo

Tečajevi, kongresi i kongresna priopćenja:

1. Čulo F, Kelava T, Čavar I, Poljak LJ, Renić M. Protective effect of cAMP on liver damage by xenobiotics. 5th Croatian Congress of Pharmacology and 2nd Congress of Croatian Physiological Society, Osijek, Croatia. Period biol, Vol 109, Suppl 2, 2007.
2. Čavar I, Renić M, Kelava T, Aleksić J, Čulo F. The role of prostaglandins in acute hepatotoxicity. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Rovinj (Red Island), Croatia. Abstract Book, str. 30.

3. Galic M, Cavar I, Rados T, Kelava T, Ticinovic N, Zelic J. The connection between smoking and stress level in students of Mostar's University. 4 th INTERNATIONAL CROSS 2008, Zagreb, Croatia. Abstract Book, str. 49.
4. Čavar I, Kelava T, Tabak T, Čulo F. The role of prostaglandin I2 in modifying acute hepatotoxicity of acetaminophen in mice. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Šibenik, Croatia. Abstract Book, str. 43.
5. Kelava T, Čavar I, Pašalić M, Čulo F. The role of glucagon in acute acetaminophen-induced hepatotoxicity. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Šibenik, Croatia. Abstract Book, str. 56.
6. Čavar I, Kelava T, Renic M and Čulo F. Influence of interleukin 1 and interleukin 6 on acute liver injury induced by acetaminophen in mice. 15th International Summer School on Immunology (Immune System: Genes, Receptors and Regulation), Hvar, Croatia. Abstract Book, str. 46.

Znanstveni članci citirani u CC-u:

1. Kelava T, Cavar I, Culo F. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88(10):960-7.
2. Blagaic V, Houra K, Turcic P, Stambuk N, Konjevoda P, Boban-Blagaic A, Kelava T, Kos M, Aralica G, Culo F. The influence of alpha-, beta-, and gamma-melanocyte stimulating hormone on acetaminophen induced liver lesions in male CBA mice. *Molecules*;15(3):1232-41.
3. Cavar I, Kelava T, Heinzl R, Culo F. The role of prostacyclin in modifying acute hepatotoxicity of acetaminophen in mice. *Coll Antropol* 2009;33 Suppl 2:25-9.
4. Cavar I, Kelava T, Vukojevic K, Saraga-Babic M, Culo F. The role of prostaglandin E2 in acute acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Histol Histopathol*;25(7):819-30.
5. Cavka M, Kelava T, Cavka V, Busic Z, Olujic B, Brkljacic B. Homocystinuria, a possible solution of the Akhenaten's mystery. *Coll Antropol*;34 Suppl 1:255-8.
6. Erceg D, Kelava T, Cavar I, Pasalic M, Culo F. The effect of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on acute liver toxicity in mice induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Coll Antropol*;34 Suppl 1:273-7.
7. Turcic P, Bradamante M, Houra K, Stambuk N, Kelava T, Konjevoda P, Kazazic S, Vikić-Topic D, Pokric B. Effects of alpha-melanocortin enantiomers on acetaminophen-induced hepatotoxicity in CBA mice. *Molecules* 2009;14(12):5017-26.