Uloga prostanoida u mehanizmima akutnog toksičnog oštećenja jetre

Ćavar, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:065127

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Ćavar

ULOGA PROSTANOIDA U MEHANIZMIMA AKUTNOG TOKSIČNOG OŠTEĆENJA JETRE

DISERTACIJA

ZAGREB, 2010.

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Filip Čulo

ZAHVALA

Iskreno zahvaljujem mom voditelju i mentoru, prof. dr. Filipu Čuli, na uvođenju u znanstveni rad i podršci koju mi je pružao svojim znanjem i iskustvom kroz cijelo vrijeme mog boravka na Zavodu. Iskreno hvala i cijeloj obitelji Čulo na svekolikoj podršci tijekom mog boravka u Zagrebu.

Također, iskreno zahvaljujem kolegi i prijatelju, dr. Tomislavu Kelavi, koji mi je kroz cijeli moj rad na Zavodu nesebično pomagao u pripremanju i izvođenju svih pokusa.

Posebno zahvaljujem doc. dr. Katarini Vukojević, prof. dr. Mirni Saragi-Babić i ostalim ljudima sa Zavoda za anatomiju, embriologiju i histologiju Medicinskog fakulteta u Splitu s kojima sam ostvario izvrsnu suradnju i koji su mi mnogo pomogli oko izvođenja tehnika imunohistokemije i imunofluorescencije.

Veliku zahvalu dugujem doc. dr. Jurici Arapoviću, prof. dr. Bojanu Poliću i prof. dr. Stipanu Jonjiću sa Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, doc. dr. Danijelu Pravdiću sa Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Mostaru te svim kolegama sa Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu koji su u tehničkom smislu pridonijeli izradi ove disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Eikozanoidi……..1

1.1.1. Sinteza i metabolizam prostanoida……...1

1.1.2. Biološki i proupalni učinci prostanoida……6

1.1.3. Sinteza i metabolizam leukotriena i drugih PG-analoga……14

1.1.4. Biološki učinci leukotriena……..15

1.2. Biološki učinci NF-κB i NO……...16

1.3. Paracetamol-opći pregled i učinci……..……18

1.3.1. Toksičnost paracetamola……..21

2. CILJ ISTRAŽIVANJA……28

3. MATERIJALI I METODE…….29

3.1. Pokusne životinje…….29

3.2. Reagencije i tretman životinja…….29

3.3. Uspostava i mjerenje hepatotoksičnosti potaknute APAP-om……....31

3.4. Imunohistokemijska analiza……32

3.5. Imunohistokemijska kvantifikacija…….33

3.6. Imunofluorescencijska analiza……34

3.7. Određivanje stvaranja PGE_2, PGI_2 i TxB_2 *ex vivo*…….....34

3.8. Mjerenje koncentracije NO u plazmi……...35

3.9. Statistička obradba podataka……....35

4. REZULTATI…….36

5. RASPRAVA.....63

6. ZAKLJUČCI.....70

7. SAŽETAK……..72

8. SUMMARY……74

9. LITERATURA……..76

10. ŽIVOTOPIS.....87

POPIS KRATICA

AA – arahidonska kiselina

ALT – alanin aminotransferaza

AST – aspartat aminotransferaza

APAP – N-acetil-para-aminofenol

BZI – benzilimidazol

cAMP – ciklični adenozin monofosfat

ConA – konkanavalin A

COX – ciklooksigenaza

DAB – diaminobenzidin

DAPI – diamidino-2-fenilindol

D-GalN – D-galaktozamin

DMF – N,N-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

GSH – glutation

HSP – proteini toplinskog šoka

IFN – interferon

IL – interleukin

iNOS – inducibilna NO-sintaza

i.p. – intraperitonealno

i.v. – intravenski

LPS – lipopolisaharid

LT – leukotrieni

MEM – minimalni esencijalni medij

MMP – matriks metaloproteinaze

mPGES-1 – mikrosomalna PGE-sintaza 1

NAC – N-acetilcistein

NAPQI – N-acetil-p-benzokinonimin

NF-κB – nuklearni čimbenik transkripcije kappa B

NO – dušični monoksid

NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi

PAF – čimbenik aktivacije trombocita

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

per os – peroralno

PG – prostaglandin

TNF – čimbenik nekroze tumora

TX – tromboksan

1. UVOD

1.1. Eikozanoidi

Eikozanoidi su spojevi koji pripadaju autakoidima, skupini bioloških tvari koje djeluju kao lokalni hormoni, tj. imaju kratak poluvijek života i djeluju blizu mjesta nastanka u organizmu (parakrini učinak). Autakoidi, podrijetlom iz fosfolipida stanične membrane, dijele se na eikozanoide i čimbenik aktivacije trombocita (engl. *platelet-activating factor*, PAF). Eikozanoidi je zajednički naziv za sve višestruko nezasićene masne kiseline s 20 ugljikovih (C) atoma i njihove derivate. Ova skupina spojeva obuhvaća prostaglandine (PG) i tromboksane (TX) koji nastaju djelovanjem enzima ciklooksigenaze (engl. *cyclooxygenase*, COX), zatim leukotriene, lipoksine i različite hidroksi- i hidroperoksi-masne kiseline koji nastaju djelovanjem lipoksigenaze te epokside koji nastaju djelovanjem citokrom P-450 epoksigenaze. Izraz prostanoidi obuhvaća sve lipide s ciklopentanskim prstenom koji nastaju djelovanjem enzima COX. U tu skupinu spadaju svi PG, a često se svrstavaju i TX koji ne sadrže cikopentanski nego oksanski prsten. Eikozanoidi su veoma rašireni spojevi, prisutni u gotovo svim tjelesnim tkivima i tekućinama. Različiti fiziološki ili patofiziološki poticaji povećavaju njihovo stvaranje što rezultira širokim spektrom bioloških učinaka (1, 2). Manji broj vrsta stanica sintetizira PAF; uglavnom su to cirkulirajući leukociti, trombociti i endotelne stanice. PAF djeluje kao vazodilatator i povećava propusnost (permeabilnost) krvnih žila, potiče agregaciju trombocita *in vitro* i općenito ima proupalno djelovanje (posreduje u nastanku astme i erozija sluznice želuca) (3).

1.1.1. Sinteza i metabolizam prostanoida

Naziv prostaglandini (PG) potječe od engleskih riječi "prostate gland" (prostata). Kurzrok i Lieb, dvojica američkih ginekologa, su primjetili 1930. godine da se dijelovi humanog uterusa kontrahiraju i relaksiraju kad su bili izloženi humanom sjemenu. Znanstvenici, U. von Euler (Švedska) i M. W. Goldblatt (Engleska), su otkrili1935. godine, neovisno jedan od drugoga, da u

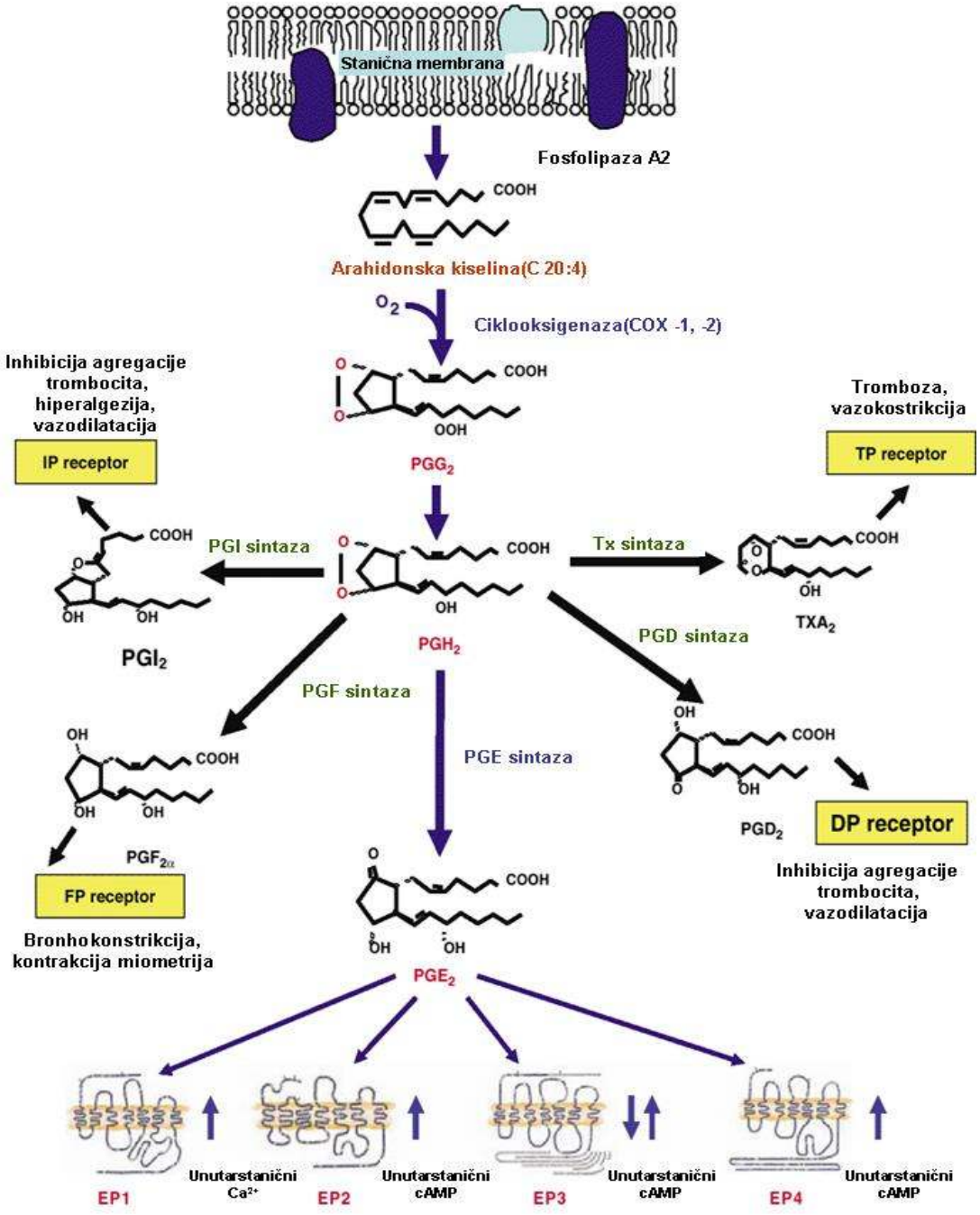
sjemenoj tekućini postoje tvari koje uzrokuju kontrakciju glatkog mišića i djeluju vazodilatacijski. Von Euler je ustanovio kako se radi o kiselim tvarima, topljivim u lipidima, i nazvao ih PG. U početku se smatralo da ih stvara samo prostata (zapravo se stvaraju u sjemenskim mjehurićima), a tek kasnije se utvrdilo da mnoga druga tkiva imaju sposobnost sinteze PG. Zahvaljujući Šveđanima, S. K. Bergstromu i B. I. Samuelssonu, te Englezu, J. R. Vaneu, otkrivene su kemijske strukture i napravljena je klasifikacija PG (3).

PG su skupina oksigeniranih i višestruko nezasićenih masnih kiselina s 20 C atoma koji sadrže ciklopentanski prsten između atoma C8 i C12 (4). Nastaju iz fosfolipida stanične membrane kao rezultat različitih fizikalnih, kemijskih i hormonskih poticaja. Prema supstituentu na ciklopentanskom prstenu svrstavaju se u deset serija označenih slovima A-J, a prema broju dvostrukih veza na postraničnom lancu označavaju se sufiksima 1, 2 i 3. Sufiksi α ili β dodaju se PG serije F, a označavaju prostorni smještaj hidroksi (-OH) skupine na atomu C9 ciklopentanskog prstena. PG prve serije, tzv. monoenski PG (npr. PGE_1), nastaju iz 8,11,14-eikozatrienske kiseline. PG druge serije ili bienski PG (npr. PGI_2) su derivati 5,8,11,14-eikozatetraenske ili arahidonske kiseline, a PG treće serije ili trienski PG (npr. PGE_3) su derivati 5,8,11,14,17-eikozapentaenske kiseline. Biološki su najvažniji PG druge serije. Arahidonska kiselina (engl. arachidonic acid, AA) je najobilatiji i najznačajniji izvor PG u ljudskom organizmu. Potječe iz linolne kiseline (9,12-oktadekadienska kiselina) u hrani. Unutarstanična koncentracija slobodne AA je mala. Najvećim dijelom se nalazi esterificirana u staničnim mastima, prije svega u fosfolipidima staničnih membrana te, u manjoj mjeri, u trigliceridima masnog tkiva. Prvi korak u sintezi PG počinje hidrolitičkim otcjepljenjem esterificirane AA iz membranskh fosfolipida. Glavni enzim koji otcjepljuje AA je fosfolipaza A_2 (Slika 1). U bazalnim uvjetima fosfolipaza A_2 je inaktivna. Uglavnom se nalazi vezana uz staničnu membranu, što je važno, jer će svaki događaj koji naruši cjelovitost membrane povećati njenu aktivnost. Aktivnost fosfolipaze A_2 može se dokinuti glukokortikoidima koji potiču sintezu i otpuštanje inhibicijskog proteina, lipokortina, koji se najvjerojatnije veže za sam enzim. Drugi važan enzim u oslobađanju AA je fosfolipaza C. Djelovanjem specifične fosfolipaze C na fosfatidilinozitol nastaje diacilglicerol (DAG), a od njega se posredstvom DAG-lipaze otcjepljuje AA. Aktivnost svih fosfolipaza, izuzevši one u lizosomima, ovisna je o kalciju (Ca^{++}) (1, 3). Slobodna AA se metabolizira posredstvom enzima COX u prostaglandinske endoperokside, prostaglandin G_2 (PGG_2) i prostaglandin H_2 (PGH_2). Prvo dolazi do redukcije i oksidacije na

atomu C13 i nastaje 11-peroksi-5,8,12,14-eikozatetraenska kiselina. Oksidacijom ovog spoja na atomu C15, izomerizacijom δ-13 dvostruke veze i ciklizacijom nove veze između atoma C8 i C12 nastaje PGG_2. Redukcijom 15-peroksi skupine peroksidazom, koja je sastavni dio COX, nastaje PGH_2 (5). PGG_2 i PGH_2 su nestabilni pri fiziološkoj temperaturi i pH. Od PGH_2 nastaje, enzimskim (djelovanjem specifičnih prostaglandin-sintaza) ili neenzimskim putem, većina ostalih produkata metabolizma AA: prostaglandini I_2 (prostaciklin, PGI_2), E_2 (PGE_2), $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) i D_2 (PGD_2) te tromboksan A_2 (TxA_2) (Slika 1) (3, 6, 7). Vrsta nastalih metabolita se razlikuje od stanice do stanice, a ovisi o enzimima koji su u njima sadržani i o njihovom relativnom odnosu. Tako se u trombocitima endoperoksidi prevode putem tromboksan-sintaze isključivo u TxA_2. U endotelnim stanicama, koje sadrže prvenstveno prostaciklin-sintazu, nastaje PGI_2. $PGF_{2\alpha}$ je glavni proizvod stanica endometrija uterusa. Pluća i slezena stvaraju podjednake količine većine PG (1, 3).

Enzim COX je glikoprotein koji se nalazi u membranama većine stanica, osim eritrocita. Prošlo je više od 30 godina otkad je J. Vane utvrdio da se farmakološko djelovanje nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) može objasniti inhibicijom COX. Već 20 godina se zna da postoje dvije izoforme enzima COX, COX-1 i COX-2, a u novije vrijeme je izolirana i treća izoforma, COX-3 (8). COX-1 i COX-2 su podjednake molekularne težine (70 i 72 kDa), podudaraju se 65% u aminokiselinskom sastavu te su i aktivna mjesta, odgovorna za katalitičku aktivnost enzima, podjednakog sastava. Najznačajnija razlika, koja omogućuje selektivnu inhibiciju ovih izoformi, je zamjena izoleucina na položaju 523 u COX-1 s valinom u COX-2 (1, 9). Iako aktivacija i djelovanje nisu sasvim odijeljeni, u načelu je COX-1 fiziološki aktivna (konstitutivna izoforma), prisutna u većini stanica, uključujući sluznicu želuca, bubrege i trombocite, te potiče lučenje većine prostanoida. COX-2 je u različitim stanicama snažno potaknuta različitim proupalnim čimbenicima, mitogenima i citokinima (inducibilna izoforma), aktivna je u brojnim patološkim stanjima (upala, autoimune bolesti, maligni tumori i dr.) i potiče stvaranje tek nekih prostanoida, u prvom redu PGE_2 (8, 10). Novija istraživanja pokazuju da su uloge enzima COX-1 i COX-2 prepojednostavljene i da je COX-2 fiziološki izražena u bubrezima, mozgu i kralježničkoj moždini gdje igra važnu ulogu u održavanju homeostaze. Također, pokazano je da selektivna inhibicija enzima COX-2 u upalnom području samo djelomično smanjuje stvaranje prostanoida u usporedbi s neselektivnom inhibicijom COX-1 i COX-2, koja u potpunosti sprječava njihovu sintezu; to nam govori da i

COX-1 može biti aktivna te da COX-1 i COX-2 djeluju koordinirano u upalnim stanjima (10-12). Istraživanje provedeno na psima pokazalo je kako je COX-3 zapravo varijanta enzima COX-1; COX-3 mRNA za razliku od COX-1 mRNA zadržava intron 1 (13). Nakon toga nije provedeno niti jedno sustavno istraživanje na psima koje bi potvrdilo ciklooksigenaznu aktivnost enzima COX-3, a čini se da u ljudi i glodavaca kinetika i razina ekspresije COX-3 nemaju kliničku važnost. U ljudi i životinja je otkriveno još nekoliko inačica enzima COX čije fiziološko značenje nije poznato, a pretpostavlja se da je COX-3 tek jedna od mnogih (14).



Slika 1. Sinteza prostanoida u stanicama sisavaca. Djelovanjem enzima fosfolipaze A2 najprije se iz fosfolipida stanične membrane otcjepljuje arahidonska kiselina (AA). Slobodna AA se metabolizira posredstvom enzima COX u nestabilne prostaglandinske endoperokside, PGG_2 i PGH_2, iz kojih enzimskim (djelovanjem specifičnih PG-sintaza) ili neenzimskim putem nastaje 5 glavnih vrsta prostanoida: PGE_2, PGI_2, PGD_2, $PGF_{2\alpha}$ i TxA_2. Na slici su također prikazani najvažniji učinci prostanoida na ciljna tkiva i stanice (preinačeno prema Dey I i sur., BMJ, vol. 149, str. 611-23, 2006).

NSAID svoj protuupalni, analgetski i antipiretski učinak ostvaruju tako što inhibiraju enzim COX. Klasični NSAID (aspirin, ibuprofen, diklofenak) su neselektivni, tj. podjednako inhibiraju COX-1 i COX-2, pa zato imaju izraženije nuspojave na sluznicu probanog sustava i bubrege. S druge strane, selektivni inhibitori COX-2 (-coxibi) su pokazali štetne učinke na kardiovaskularni sustav pa su neki od njih (rofecoxib-Vioxx) nedavno povučeni iz prodaje (3).

PG i ostali metaboliti AA se ne mogu pohraniti u stanici, već se oslobađaju neposredno nakon njihove biosinteze. Biološki poluživot ($t_{1/2}$) u krvi je manji od 1 min, a normalna koncentracija cirkulirajućih PG je manja od 100 pg/mL. Razgradnja PG u tijelu se odigrava vrlo brzo. Prvi korak u razgradnji PGE_2 ($t_{1/2}$ oko 30 s) je oksidacija 15-OH skupine pomoću enzima PG-15-OH-dehidrogenaze, a zatim slijedi redukcija 13,14-dvostruke veze koju katalizira PG-δ-13-reduktaza. Tako nastaje 15-keto-13,14-dihidro-PGE_2. Kombinacijom metaboličkih reakcija (β- i ω-oksidacije), na postraničnim lancima iz ovog spoja nastaje nekoliko vrsta metabolita koji se mogu dokazati u mokraći. Nastali metaboliti se nalaze u većim koncentracijama u plazmi, ali su manje biološki aktivni. Navedeni enzimi koji razgrađuju PG postoje u većini stanica, a osobito u stanicama pluća i bubrega. Jednim prolaskom kroz pluća razgradi se približno 90% uštrcanog PGE_2. PGI_2 slabo ulazi u stanice pluća pa se tu i slabo razgrađuje, ali mu je ipak poluživot u krvi malen ($t_{1/2}$ oko 3 min) jer se brzo i spontano (neenzimatski) hidrolizira u biološki inaktivni metabolit, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (3, 15). TxA_2 ($t_{1/2}$ oko 30 s) je izrazito nestabilan. U krvi se najvećim dijelom spontano hidrolizira u tromboksan B_2 (TxB_2), a on se djelovanjem enzima 11-hidroksi-TxB_2 dehidrogenaze ili β-oksidacijom brzo metabolizira u 11-dehidro TxB_2 ili 2,3-dinor TxB_2 koji se izlučuju mokraćom (16).

1.1.2. Biološki i proupalni učinci prostanoida

Prostanoidi, koji uključuju skupinu PG i TX, su metaboliti AA koji se stvaraju i oslobađaju kao odgovor na različite fiziološke i patofiziološke poticaje u svrhu održavanja tjelesne homeostaze (7). To su male lipidne molekule koje reguliraju brojne procese u tijelu, uključujući regulaciju upalnog i imunološkog odgovora, funkciju bubrega, kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sustava, oslobađanje neurotransmitera u CNS-u, agregaciju trombocita i dr.

Nakon što se stvore, prostanoidi se brzo oslobađaju iz stanica i izazivaju svoj biološki učinak blizu mjesta sinteze (autokrini ili parakrini učinak) vežući se za specifične, visoko-afinitetne, rodopsinu slične, površinske receptore na staničnim membranama (17, 18). Zbog toga su koncentracija prostanoida (<100 pg/mL) i vrijeme poluživota (<3 min) u krvi izrazito mali. Postoji najmanje jedna vrsta receptora za svakog od 5 prostanoida. Svaki od tih receptora se veže za "svoj" prostanoid najmanje za 1 log jedinicu lakše nego za druge prostanoide. Oznaka prije slova P (prostanoid) označava za koji se prostanoid receptor najjače veže (npr. EP za PGE_2, FP za $PGF_{2\alpha}$, IP za PGI_2, TP za TxA_2 i dr.). Svi dosad poznati prostanoidni receptori pripadaju superobitelji receptora sličnih rodopsinu sa 7 transmembranskih domena povezanih s trimernim G-proteinom (engl. *G-protein-coupled receptors*, GPCR). Nakon vezanja za receptore, prostanoidi uglavnom potiču (vezanjem za Gs receptore) ili rjeđe inhibiraju (vezanjem za Gi receptore) djelatnost enzima adenilil-ciklaze što dovodi do povećanog ili smanjenog stvaranja cikličnog adenozin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) (Tablica 1). cAMP djeluje u stanici kao "drugi glasnik" koji aktivira određene protein-kinaze koje putem fosforilacije staničnih proteina posreduju specifični biološki učinak. Neki prostanoidi svoj učinak ostvaruju tako što povećavaju aktivnost fosfolipaze C (vezanjem za $Gq_{/11}$ receptore) koja cijepa fosfolipidni spoj, fosfatidilinozitol-difosfat (PIP), na diacilglicerol (DAG) i inozitol-1,4,5-trifosfat (ITP), a djelovanjem DAG-lipaze oslobađa se AA iz DAG-a. Na membrani pomagačkih limfocita T (Th2) pronađena je posebna vrsta GPCR, CRTH2, koji pripada skupini kemokinskih receptora. Osim klasičnih prostanoida koji djeluju preko GPCR, 15d-PGJ_2 (metabolit PGD_2) može aktivirati nuklearne receptore klase PPAR (engl. *peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR). PGE_2 ostvaruje brojne fiziološke učinke zahvaljujući postojanju 4 vrste EP-receptora, EP1, EP2, EP3 i EP4. Za svakog od njih PGE_2 se veže različitim afinitetom, a i različiti su unutarstanični signalni putovi potaknuti vezanjem PGE_2 za navedene receptore (Tablica 1 i Slika 2). Djelovanje prostanoida na različita tkiva može biti stimulacijsko ili inhibicijsko, što ovisi o vrsti i koncentraciji prostanoida te o zastupljenosti specifičnih receptora u pojedinim tkivima (3, 17, 18).

Upala i imunološki odgovor. Prostanoidi se luče u upalnoj reakciji pri ozljedi ili iritaciji tkiva, koje mogu biti posljedica djelovanja mehaničkih, termičkih, kemijskih, bakterijskih ili dr. čimbenika, čime značajno pridonose nastanku simptoma i znakova upale (19). Dokazano je da se

Tablica 1. Vrste i farmakološki učinci prostanoidnih receptora

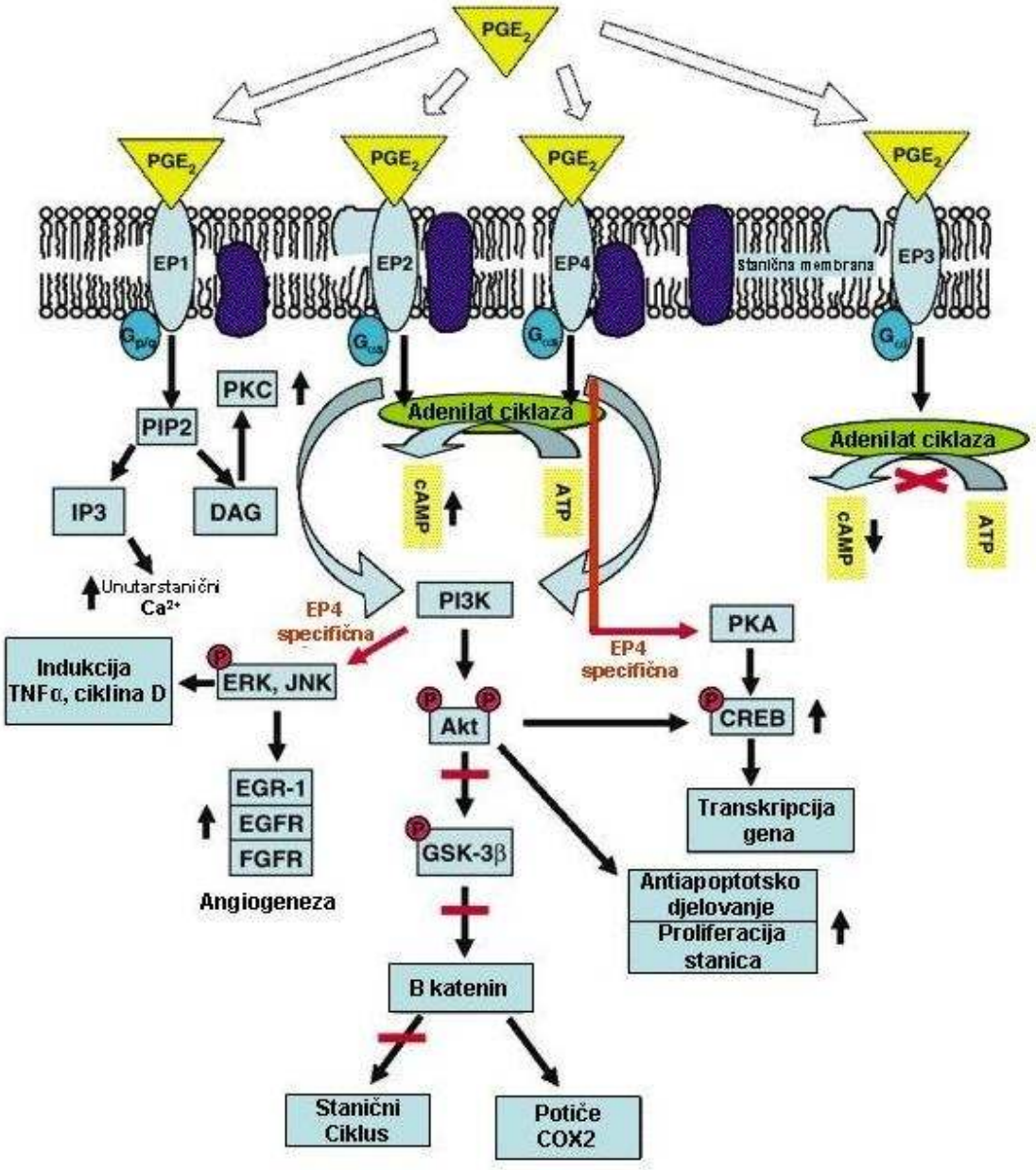
Klasa	**Tip**	**Agonisti**	**Antagonisti**	**G protein**	**Signalni putovi**
TXA_2	TP	U46619, I-BOP, STA_2	SQ29548, S-145, ramatroban	G_q, G_s (α), G_i (β) G_h (α), G_{12}	↑ cAMP, IP3/DAG/Ca^{2+} ↓ cAMP
PGD_2	DP	BW245C, L-644,698, ZK110841	BWA868C, S-5751	G_s	↑ cAMP, Ca^{2+}
	CRTH2	13,15-dihidro-15-keto-PGD_2, indometacin, 15-R-metil-PGD_2, 15d-PGJ_2	ramatroban	G_i	↓ cAMP, ↑ Ca^{2+}; PLC, PI3K, MAPK
PGE_2	EP1	ONO-KI-004, iloprost, 17-fenil-trinor PGE_2, sulproston	SC51322, SC51089, ONO-8713	?	↑ Ca^{2+}
	EP2	Butaprost, 11-deoxy PGE1, AH13205, ONO-AEI-259		G_s	↑ cAMP; transaktivacija EGFR
	EP3	Sulproston, MB28767, misoprostol, SC46275, ONO-AE-249	ONO-AE3-240, L-826266	G_i, G_q, G_s	↓ cAMP, ↑ IP3/DAG, ↑ cAMP
	EP4	PGE1-OH, misoprostol, ONO-AEI-329	AH23848B, ONO-AE3-208	G_s	↑ cAMP; PI3K, ERK1/2, β-katenin
PGI_2	IP	Iloprost, cikaprost, carbaciklin		G_s, G_q, G_i	↑ cAMP, ↑ IP3/DAG, ↓ cAMP
$PGF_{2\alpha}$	FP	Fluprostenol, latanoprost		G_q	↑ IP3/DAG; Rho, EGFR, β-katenin

Prema Hata AN i Breyer RM, Pharmacology and Therapeutics, vol.103, str. 147-166, 2004.

prostanoidi luče u najrazličitijim upalnim stanjima: sunčane opekline, kontaktni ekcem, psorijaza, ulcerozni kolitis, osteoartritis, reumatoidni artritis i dr. Vjeruje se da glavninu prostanoida (posebno PGE_2) u tim stanjima stvara inducibilna COX-2 (3). Za vrijeme trajanja upalnog procesa, prostanoidni profil se mijenja i ovisan je o vrsti poticaja kao i o mjestu upale (20). Iako se čini da PG nemaju izravan učinak na vaskularnu propusnost, PGE_2 i PGI_2 značajno povećavaju stvaranje edema i infiltraciju leukocita u upalnom području. PGE_2 i PGI_2 dilatiraju arteriole i prekapilarne sfinktere čime dovode do nastanka crvenila i povećanja protoka krvi na mjestu upale. Štoviše, oni inhibiraju oslobađanje hidrolaza i lizosomalnih enzima iz humanih neutrofila i mišjih peritonealnih makrofaga. TxA_2 je snažan vazokonstriktor pa bi njegova uloga mogla biti u sprječavanju mogućeg krvarenja (3). U štakorskom modelu otoka repa uzrokovanog karagenanom pokazano je da je PGE_2 glavni medijator upale i boli te da primjena anti-PGE_2 monoklonskih protutijela i selektivnog inhibitora COX-2 (celecoxiba) poništava navedene učinke PGE_2 (21, 22). U miševa kojima je uklonjen gen za IP-receptor (IP-"knock out" miševi) simptomi upale su u potpunosti izostali (23). PGE_2 i PGI_2 pojačavaju hiperalgezijsko djelovanje (povećana osjetljivost na bolni podražaj) bradikinina i histamina tako što senzibiliziraju kemoreceptore (nociceptore) na završetcima osjetnih živčanih vlakana, ali ne izazivaju osjet boli kada se primjene na otvorenu ranu. Primarni senzorni neuroni u dorzalnom korijenu kralježnične moždine izražavaju IP-, EP_1-, EP_3- i EP_4-receptore (24). Bakterijski endotoksini (lipopolisaharid-LPS) i cirkulirajući interleukin (IL)-1 potiču izražaj COX-2 i posljedičnu sintezu PGE_2 u endotelnim stanicama koje čine krvno-moždanu barijeru (25). Stvoreni PGE_2 difundira iz endotelnih stanica i ima izravno pirogeno djelovanje u hipotalamičkom termoregulacijskom centru koje je posredovano EP_3-receptorima (20).

PGE_2 različito regulira aktivnost limfocita T. Većina istraživanja je usmjerena na regulaciju funkcije limfocita T $CD4^+$. PGE_2 inhibira njihovu proliferaciju i opsežno se istražuje mogući mehanizam te inhibicije (17). PGE_2 uzrokuje apoptozu zrelih i neaktiviranih limfocita T te dvostruko pozitivnih stanica u timusu ($CD4^+$ i $CD8^+$) djelujući tako na diferencijaciju limfocita T, dok sprječava apoptozu aktiviranih limfocita T putem smanjene indukcije Fas-liganda u stanici (26). Načelno, drži se da PGE_2 potiče Th2-stanični odgovor (potiče sintezu IL-4, IL-5 i IL-10), a inhibira Th1-stanični odgovor (inhibicija sinteze IFN-γ i IL-2). Smatra se da su navedeni učinci PGE_2 posredovani cAMP-om. Zna se da PGE_2 inhibira funkciju limfocita T $CD8^+$, ima važnu ulogu u regulaciji razvoja i aktivnosti limfocita B, snažno inducira apoptozu nezrelih limfocita B

te stimulira stvaranje IgG1 i IgE-protutijela u zrelim limfocitima B, što ukazuje na to da bi PGE_2 mogao pojačavati alergijske reakcije u organizmu (17).



Slika 2. Vezanje PGE_2 za EP-receptore na staničnoj membrani i posljedično poticanje različitih unutarstaničnih signalnih puteva (preinačeno prema Dey I i sur., BMJ, vol. 149, str. 611-23, 2006).

Daljnja, dobro utvrđena funkcija PGE_2 je regulacija stvaranja citokina u aktiviranim makrofagima. Općenito, PGE_2 u makrofagima suprimira stvaranje citokina (TNF-α, IL-1β, IL-8 i IL-12) koji potiču tip 1 imunološkog odgovora – aktivacija Th1 stanica i stanične imunorekcije, a potiče tip 2 imunološkog odgovora – aktivacija Th2 stanica i humoralne imunorekcije (povećanje stvaranja IL-4 i IL-10). U odgovoru na proupalne čimbenike (LPS i IL-1), aktivirani makrofagi proizvode velike količine PGE_2 koji, preko povećane ekspresije COX-2, povećava vlastitu sintezu u makrofagima (autokrina regulacija) (27, 28).

Također, PGI_2 ima važnu ulogu u regulaciji upalnog i imunološkog odgovora. U animalnim modelima je pokazano da PGI_2 ima protuupalno djelovanje; naime, miševi s izbačenim genom za IP-receptor su bili značajno osjetljiviji na infekciju respiratornim sincicijskim virusom (RSV) – teži tijek bolesti se očitovao u većem gubitku tjelesne mase i većoj proizvodnji IFN-γ u plućima u usporedbi s kontrolnim životinjama. U tih miševa je znatno pojačan humoralni upalni odgovor i alergijska reakcija potaknuta ovalbuminom. Stabilni analozi PGI_2, cikaprost i iloprost, inhibiraju stvaranje citokina u limfocitima T $CD4^+$, podjednako inhibirajući Th1- (smanjena proizvodnja IFN-γ) i Th2- odgovor (smanjena proizvodnja IL-4, IL-5 i IL-13) (29).

PGD_2 djeluje proupalno putem DP2-receptora (alergijske reakcije), dok protuupalni učinak ostvaruje vezanjem na DP1-receptore (regulacija funkcije dendritičkih stanica) ili neizravno, putem svog metabolita – 15-d-PGJ_2. 15-d-PGJ_2 se ubraja među ključne protuupalne medijatore. U brojnim animalnim modelima *in vivo* pokazano je da 15-d-PGJ_2 smanjuje upalni odgovor: ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, kolitis, artritis i dr. (17). 15-d-PGJ_2 u humanim i mišjim makrofagima inhibira stvaranje proupalnih medijatora: iNOS-a (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), TNF-α i IL-1β (30, 31), a također inhibira proliferaciju i potiče apoptozu limfocita T (32).

Novija istraživanja pokazuju kako je moguće da su mnogi rezultati o djelovanju PG artefakti, dobiveni uglavnom u različitim modelima *in vitro* koji zahtijevaju svoju provjeru u modelima *in vivo*. Tako je u miševa s izbačenim genom za EP-receptor pokazano da PGE_2 ne potiskuje, već potiče reakcije stanične imunosti (7, 33).

Probavni sustav. PG se stvaraju u epitelnim i glatkim mišićnim stanicama svih dijelova probavnog sustava. Navodi se da PG imaju opći citoprotektivni učinak u probavnom sustavu što je pokazano u modelima toksičnog oštećenja sluznice želuca u štakora (jake kiseline,

hipertonična otopina etanola) (34). Protektivni učinak PG nije dokraja razjašnjen i posredovan je pomoću nekoliko mehanizama. PGE_2 (putem EP3-receptora) i PGI_2 smanjuju lučenje želučane kiseline (čak i ono potaknuto hranom, histaminom i gastrinom) i pepsina, povećavaju protok krvi u želučanoj sluznici, a intragastrična primjena PGE_2 u ljudi potiče lučenje viskozne sluzi i bikarbonata što pomaže u neutralizaciji želučane kiseline i sprječava oštećenje sluznice želuca. Svi navedeni učinci PG pomažu u održavanju integriteta želučane sluznice i predstavljaju citoprotektivni učinak PG (3, 35, 36). S druge strane, postoje dokazi da TxA_2 ima ulcerogeno djelovanje (37). PGE_2 i $PGF_{2\alpha}$ potiču kontrakciju glatkog mišića (PGI_2 i TxA_2 imaju istovjetan, ali slabiji učinak) kao i sekreciju vode i elektrolita u lumen probavne cijevi; zato peroralna ili parenteralna primjena PGE_2 i $PGF_{2\alpha}$ može uzrokovati vodenaste proljeve (3).

Kardiovaskularni sustav. Vaskularne stanice stvaraju i osjetljive su na djelovanje različitih PG. U ljudi i većine sisavaca PG su moćni vazodilatatori. Djelovanjem PG dilatiraju se arteriole, prekapilarni sfinkteri i postkapilarne venule, dok velike vene nisu zahvaćene. Ipak, PG pokazuju i vazokonstriktorne učinke u određenim dijelovima kardiovaskularnog sustava (3). Glavni PG kojeg stvaraju endotelne stanice je PGI_2 jer je PGI_2-sintaza jako zastupljena u ovim stanicama. PGI_2 se veže za IP-receptore na glatkim mišićnim stanicama vaskularne stjenke povećavajući unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a što uzrokuje relaksaciju glatkog mišića i posljedičnu vazodilataciju (38). Intravenska primjena PGI_2 uzrokuje izraženu hipotenziju; PGI_2 je 5 puta potentniji od PGE_2 u izazivanju ovog učinka. Sistemski krvni tlak se općenito snizuje, a krvni protok u većini organa (srce, bubrezi, crijeva) se povećava. Pad krvnog tlaka dovodi do refleksnog povećanja srčane frekvencije (3). Za razliku od PGI_2, PGE_2 i $PGF_{2\alpha}$ mogu uzrokovati i vazokonstrikciju i vazodilataciju u ovisnosti od organskog sustava koji je zahvaćen. Ovi su učinci posredovani specifičnim PG-receptorima izraženim na glatkim mišićnim stanicama (39). PGE_2 ostvaruje vazodilatacijski učinak putem EP2-receptora, uzrokujući eritem, povećani protok krvi i pojačanu ekstravazaciju tekućine (edem) u upalnom području. Općenito, PG serija E i F izravno povećavaju snagu srčane kontrakcije. Povećana kontrakcijska sila i srčana frekvencija u velikoj su mjeri uzrokovani neizravno, tj. refleksnim padom ukupnog perifernog otpora (3). $PGF_{2\alpha}$ ima različite učinke s obzirom na životinjsku vrstu i žilno područje, a u ljudi izaziva jaku konstrikciju plućnih arterija i vena. PGD_2 u malim koncentracijama ima pretežno vazodilatacijski učinak u sistemskoj cirkulaciji, a u plućnoj cirkulaciji izaziva vazokonstrikciju (40). TxA_2 ima izuzetno snažan vazokonstrikcijski učinak što je pokazano u različitim modelima *in vitro* i *in vivo* (3).

Krvne stanice. U fiziološkim uvjetima PG moduliraju funkciju trombocita. TxA_2 je glavni produkt metabolizma AA u trombocitima. Snažan je induktor agregacije trombocita i fiziološki medijator u reakcijama oslobađanja iz trombocita. Endotelne stanice žila pretežno stvaraju PGI_2 koji snažno inhibira agregaciju trombocita *in vivo* i tako pridonosi antitrombogenoj aktivnosti normalnog žilnog endotela. Zato je omjer PGI_2/ TxA_2 ključan u regulaciji vaskularnog tonusa i agregacije trombocita. Aspirin u malim dozama (do 100 mg dnevno), inhibicijom COX-1, brzo inhibira sintezu TxA_2 u trombocitima i PGI_2 u endotelu krvnih žila, međutim, krvne žile brzo obnavljaju sposobnost sinteze PGI_2 (nakon približno 6 sati), dok je stvaranje TxA_2 u trombocitima trajno inhibirano jer trombociti nemaju jezgru i samim tim nemaju sposobnost resinteze COX. Zato se aspirin najviše koristi u terapiji i prevenciji trombotskih i okluzivnih bolesti krvnih žila (ishemijska bolest srca, cerebrovaskularni inzult, periferna ishemijska bolest i dr.) (41, 42).

Bubrezi i stvaranje mokraće. Korteks normalnih bubrega uglavnom stvara PGI_2, PGE_2 te vrlo male količine TxA_2. Bubrežna srž uglavnom sintetizira PGE_2. PG djeluju na bubrežno izlučivanje soli i vode mijenjajući bubrežni protok krvi ili izravnim učinkom na bubrežne tubule. PGI_2 i PGE_2 imaju vazodilatacijski učinak u bubrezima pa intrarenalna infuzija ovih PG povećava bubrežni protok krvi; kad se izravno infundiraju u renalnu arteriju djeluju diuretski, natrijuretski i kalijuretski bez znatnijeg učinka na veličinu glomerularne filtracije. TxA_2 smanjuje bubrežni protok krvi i veličinu glomerularne filtracije. PGE_2 inhibira reapsorpciju vode potaknutu antidiuretskim hormonom (ADH). PGE_2 također inhibira reapsorpciju klorida u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje. PGI_2, PGE_2 i PGD_2 potiču sekreciju renina u bubrežnom korteksu putem izravnog učinka na granularne jukstaglomerularne stanice.

Pluća. Osim krvih žila, PG kontrahiraju ili relaksiraju mnoge glatke mišiće u tijelu. Načelno, $PGF_{2\alpha}$ i PGD_2 kontrahiraju, a PGE_2 relaksira bronhalni i trahealni glatki mišić. Prostaglandinski endoperoksidi i TxA_2 kontrahiraju bronhalnu glatku muskulaturu. PGI_2 u čovjeka uzrokuje dilataciju glatke muskulature dišnog sustava i djeluje kao snažan antagonist autakoidima koji uzrokuju bronhokonstrikciju. PGD_2 i $PGF_{2\alpha}$ uzrokuju jaku bronhokonstrikciju u bolesnika koji imaju astmu i pojačavaju kontrakciju glatke muskulature potaknute drugim spazmogenima. Koncentracija PGD_2, $PGF_{2\alpha}$ i stabilnih metabolita TxA_2 u ispirku bronhoalveolarne tekućine asmatskih bolesnika je oko 10 puta veća nego u kontrolnih zdravih ispitanika, što bi moglo

uzrokovati alergijski bronhospazam. $PGF_{2\alpha}$ i TxA_2 dovode do jake konstrikcije plućnih krvnih žila, dok PGI_2 i PGE_2 imaju suprotan učinak.

Središnji živčani sustav (CNS). Iako je mnogo istraživanja posvećeno otkrivanju uloge PG u CNS-u, dokazi za jednoznačno tumačenje njihove funkcije su još uvijek oskudni. Pokazano je kako PG u CNS-u djeluju i stimulacijski i inhibicijski nakon što se uštrcaju u moždane komore eksperimentalnih životinja ili iontoforetski apliciraju u same moždane stanice. Najvažniji PG u mozgu su PGE_2 i PGD_2. Oslobađanje PGE_2 u mozgu objašnjava nastanak vrućice potaknute pirogenima (LPS, IL-1 i TNF-α). Uštrcavanje PGE_2 u hipotalamus izaziva porast tjelesne temperature zbog čega se drži da je on važan endogeni pirogen. PGE_2 i PGI_2 senzibiliziraju završetke osjetnih živčanih vlakana na različite mehaničke ili kemijske podražaje putem snižavanja osjetnog praga receptora za bol (nociceptora), što zapravo pridonosi pojačanom osjetu boli za vrijeme upalnog procesa. PGD_2 nije tako rasprostranjen u CNS-u kao PGE_2 i pokazuje suprotne učinke od njega u regulaciji tjelesne temperature. PGD_2 uzrokuje hipotermiju i smatra se važnim za proces spavanja (3, 42).

Tumori. Prostanoidi su posrednici nastanka i progresije tumora. Inducibilna izoforma COX, COX-2, izražena je u brojnim zloćudnim tumorima: karcinomu pluća, kolona, želuca, jednjaka, dojke, prostate, melanomu i dr. (43). PGE_2 i 15-d-PGJ_2 imaju suprotna djelovanja na razvoj malignih stanica. PGE_2 potiče razvoj i metastaziranje nekih vrsta karcinoma poticanjem stvaranja matriks-metaloproteinaza (MMP). Također, PGE_2 potiče proliferaciju i inhibira apoptozu tumorskih stanica. 15-d-PGJ_2 je moćan antitumorski agens, naime, on snažno inhibira proliferaciju i potiče apoptozu tumorskih stanica što je pokazano u studijama *in vivo* i *in vitro*. Osim toga, 15-d-PGJ_2 inhibira sintezu MMP (17). Općenito se drži da TxA_2 potiče tumorsku angiogenezu, a da PGI_2 ima suprotan učinak (43).

1.1.3. Sinteza i metabolizam leukotriena i drugih PG-analoga

Naziv leukotrieni (LT), kojeg je prvi put uporabio švedski biokemičar B. Samuelsson, dolazi od engleskih riječi "leukocyte" i "triene" (tvari koje sadrže 3 konjugirane dvostruke veze). LT nastaju oksidacijom AA djelovanjem citosolnih enzima lipoksigenaza (44, 45). Različita tkiva i stanice u organizmu sadrže različite vrste lipoksigenaza, ali je biološki najvažnija 5-lipoksigenaza

za čiju je aktivaciju potreban utok Ca^{++} u stanicu (3, 46). AA je prekursor za 4 serije LT, a sufiks, kao i kod PG, označava broj dvostrukih veza u masnoj kiselini. 5-lipoksigenaza katalizira stvaranje nestabilnog hidroperoksida, 5-HPETE (5-hidroperoksi-eikozatetraenska kiselina), koji dehidracijom prelazi u nestabilni 5,6-epoksid poznat kao leukotrien A_4 (LTA_4). LTA_4 je ishodišni spoj u sintezi ostalih leukotriena. Njegovom hidrolizom nastaje LTB_4 koji se brzo i potpuno razgrađuje omega-oksidacijom u jetri i neutrofilima te izlučuje urinom. Alternativno, LTB_4 može biti konjugiran s reduciranim glutationom (GSH) i pomoću LTC_4-sintaze pretvoren u LTC_4, a ovaj, otcjepljenjem glutaminske kiseline i glicina, prelazi u LTD_4 odnosno u LTE_4. LTC_4, LTD_4 i LTE_4 se često nazivaju i cisteinil-LT (3, 47). Također, AA se može metabolizirati pomoću enzima koji sadrže citokrom P450 u različite metabolite, uključujući 19- ili 20-hidroksiarahidonat, epoksi-eikozatetraenske kiseline (hepoksiline) i lipoksine (u leukocitima). Izoprostani (izo-prostaglandini) su tvari koje nastaju neenzimatskim preustrojem stereo- i strukturnih izomera derivata PGH_2 koji nastaju kao posljedica, slobodnim radikalima potaknute, ciklooksigenacije AA. Budući da su izoprostani izomerni s $PGF_{2\alpha}$, nazvani su F2-izoprostani (F2-IsoP) i za razliku od klasičnih PG (produkti COX) oni nastaju *in situ*, esterificirani u fosfolipidima stanične membrane. Oslobađaju se prvenstveno djelovanjem fosfolipaza i njihovu sintezu ne sprječava uporaba aspirina i drugih NSAID (3).

1.1.4. Biološki učinci leukotriena

LT su važni posrednici upalnih reakcija i reakcija preosjetljivosti. Djeluju preko svojih receptora koji su prisutni u različitim stanicama i tkivima. Postoje najmanje dvije vrste LT-receptora ($cysLT_1$ i $cysLT_2$) spregnutih s G-proteinima; njihovom aktivacijom dolazi do povećanja unutarstanične koncentracije Ca^{++}(3). LTC_4, LTD_4 i, u manjoj mjeri, LTE_4 kontrahiraju glatku muskulaturu respiracijskog, krvožilnog i probavnog sustava. Izazivaju bronhokonstrikciju prvenstveno malih dišnih puteva pa su zato LT važni u patogenezi astme. Dokazano je da u respiracijskom sustavu potiču lučenje sluzi, a njihova sinteza je povećana u bolesnika s cističnom fibrozom. Djelovanjem na endotel postkapilarnih venula, LT uzrokuju vazodilataciju i eksudaciju plazme. U većim dozama izazivaju vazokonstrikciju, posebno terminalnih arteriola. Pokazano je da uzrokuju vazokonstrikciju koronarnih krvnih žila, što,

zajedno s nalazom da ih stvaraju koronarne žile, ukazuje na to da su važni u nastanku angine pektoris (47). LTB_4, kojeg stvaraju pretežno neutrofili, važan je medijator u upalnim procesima. Slično cisteinil-LT, samo manje snažno, on povećava propusnost krvnih žila i eksudaciju plazme. LTB_4 potiče kemotaksiju, adheziju i agregaciju neutrofila, eozinofila i monocita, stvaranje superoksidnih iona (O^{2-}) i otpuštanje lizosomskih enzima iz polimorfonuklearnih leukocita. On također povećava prirodnu citotoksičnu aktivnost imunoloških stanica i utječe na proliferaciju limfocita T. LT i PG djeluju neovisno jedni o drugima. Tako, u različitim sustavima imaju sinergistički ili antagonistički učinak (3, 47).

1.2. Biološki učinci NF-κB i NO

NF-κB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) obitelj transkripcijskih faktora dijeli strukturnu podudarnost s retrovirusnim onkoproteinom v-Rel čineći skupinu proteina, NF-κB/Rel, koja se sastoji od nekoliko strukturno povezanih proteinskih molekula koje tvore homodimere ili heterodimere. U sisavaca NF-κB obitelj čini 5 proteina, i to NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA (p65), RelB i c-Rel, a njihovom kombinacijom nastaju spomenuti homdimeri ili heterodimeri. U stanicama sisavaca najučestaliji i najvažniji heterodimer je p50/p65 za kojeg je NF-κB zapravo sinonim (48). NF-κB je prisutan u gotovo svim vrstama stanica (ubikvitarnost) i uključen je u odgovor organizma na različite poticaje poput stresa, citokina, ultraljubičastog zračenja, slobodnih radikla, bakterijskih i virusnih antigena. NF-κB ima ključnu ulogu u regulaciji imunog odgovora domaćina na infekciju. Nasuprot tomu, nepravilna regulacija NF-κB je povezana s brojnim bolestima kao što su karcinom, autoimmune i upalne bolesti, septički šok, virusne infekcije i dr (49, 50). NF-κB pripada skupini "brzo djelujućih", primarnih transkripcijskih faktora (tu još pripadaju 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-κB se nalazi vezan u citoplazmi za skupinu proteina nazvanih IκB (engl. *inhibitor of κB*) koji sadrže multiple kopije sekvenci nazvanih "ankirinski ponavljajući slijedovi", a pomoću kojih se maskiraju aktivacijski signali sadržani u NF-κB (48). Stimulacijom različitih receptora na staničnoj membrani dolazi do brze aktivacije NF-κB tako što se najprije degradira IκB, primarno putem aktivacije IκB-kinaze (IKK). Djelovanjem IKK dolazi

do fosforilacije, ubikvitinacije i degradacije IκB u proteasomima. Time NF-κB biva oslobođen iz spoja s IκB, ulazi u jezgru gdje potiče izražaj specifičnih gena, uzrokujući zadani fiziološki odgovor, npr. upalni i imunološki odgovor, staničnu proliferaciju i dr. NF-κB potiče izražaj gena koji kodiraju različite proupalne medijatore, uključujući iNOS, TNFα i IL-1 (51). NF-κB potiče i izražaj gena koji kodiraju IκB koji se onda ponovno veže za NF-κB i inhibira ga, ostvarujući mehanizam autoregulacije (52, 53).

NO-sintaze (engl. *nitric oxide synthases*, NOS) čine obitelj enzima koji kataliziraju stvaranje NO iz L-arginina. Poznate su tri izoforme NOS-a, i to dvije konstitutivne, nNOS (NOS1) i eNOS (NOS3), i jedna inducibilna, iNOS (NOS2). Sve tri izoforme su kodirane različitim genima. nNOS je prisutna u CNS-u i perifernom živčanom sustavu (PNS-u) gdje posreduje u međustaničnoj komunikaciji. eNOS se nalazi u endotelnim stanicama krvnih žila i odgovorna je za bazalno stvaranje NO i regulaciju vaskularnog tonusa (54). Nasuprot nNOS-u i eNOS-u, iNOS sintetizira NO u upalnim stanicama u velikim količinama kroz dulji vremenski period (satima i danima) i nije funkcionalno ovisna o razini unutarstanične koncentracije Ca^{2+}. iNOS se stvara nakon aktivacije stanica mikrobnim endotoksinima (npr. LPS) ili određenim proupalnim citokinima. Međutim, novija istraživanja su pokazala da iNOS može biti konstitutivno (fiziološki) izražena i da izražaj nNOS i eNOS može biti potaknut u različitim patofiziološkim stanjima (55). Dokazano je da je izražaj iNOS-a pojačan u različitim infektivnim (HIV, tuberkuloza, malarija) i autoimunim bolestima (multipla skleroza, reumatoidni artritis), akutnim ishemijskim stanjima (infarkt miokarda, CVI) i tumorima (karcinom pluća, dojke, kolona i dr.) (54).

Dušični monoksid (engl. *nitric oxide*, NO) je važna stanična signalna molekula koja je uključena u brojne fiziološke i patofiziološke procese u organizmu. NO inhibira kontrakciju glatkog mišića krvnih žila (vazodilatacija i povećani protok krvi), agregaciju trombocita i adheziju leukocita za endotel krvnih žila. Zato je nitroglicerin (tvar koja reagira sa sulfhidrilnim skupinama u organizmu oslobađajući pritom NO) lijek izbora za prevenciju i liječenje angine pektoris. Nekoliko je mehanizama pomoću kojih NO ostvaruje svoje biološke učinke: oksidacija proteina koji sadrže željezo, aktivacija topljive gvanilat-ciklaze s posljedičnom sintezom cGMP-a (relaksacija vaskularnog glatkog mišića), ADP ribozilacija proteina te nitrozilacija sulfhidrilnih skupina proteina (56). Fagociti (monociti, makrofagi i neutrofili) proizvode NO u velikim količinama što je važan dio imunološkog odgovora domaćina na infekciju. Fagociti su bogati

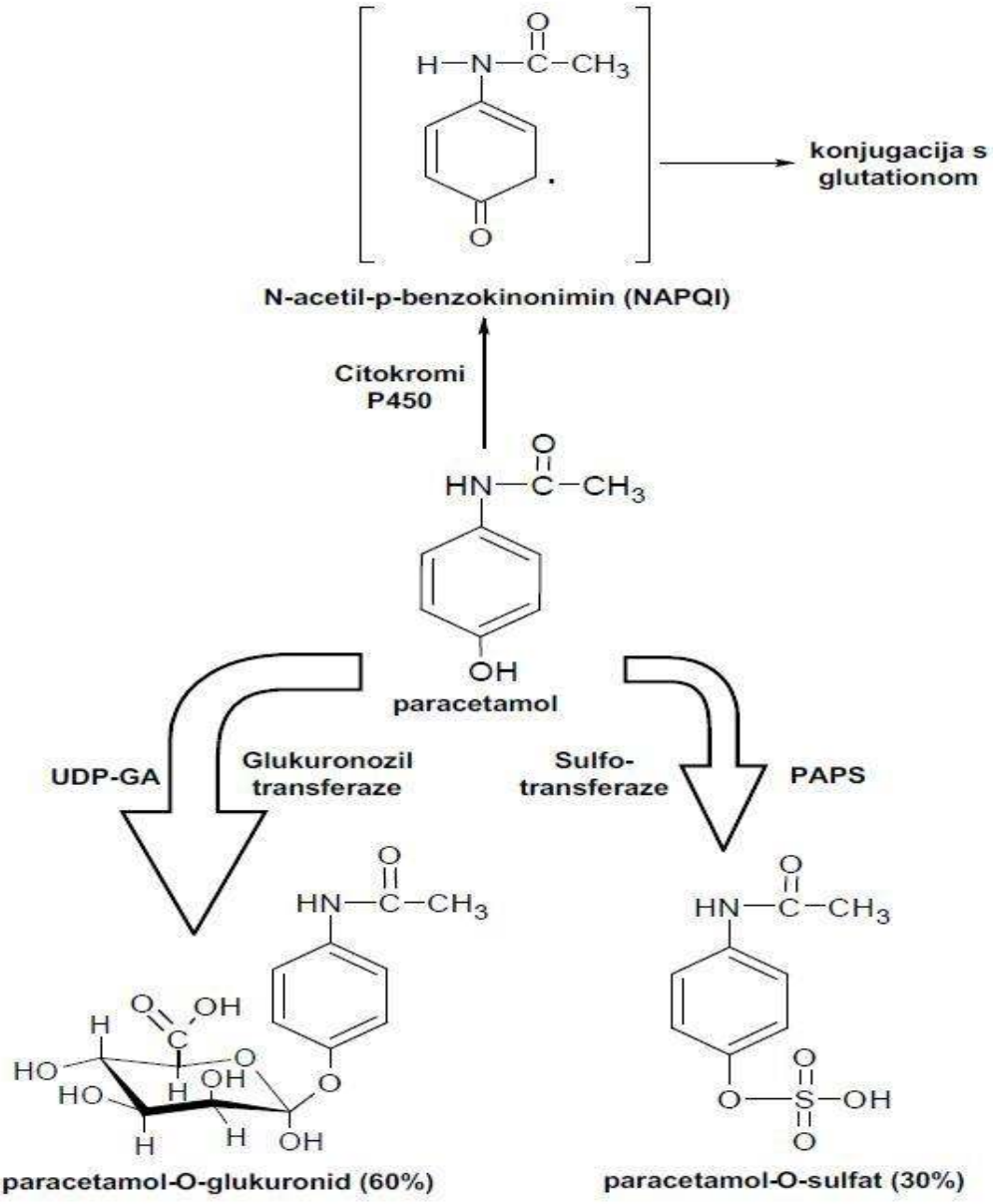
iNOS-om koju aktiviraju različiti proupalni medijatori (IFN-γ, TNF-α i IL-1) (57). S funkcijskog gledišta važno je znati da se pojačani izražaj iNOS-a obično javlja u stanjima koja uzrokuju oksidacijski stres i da NO, koji se tad stvara u velikim količinama, uvelike reagira sa superoksidnim (O^{2-}) ionima, stvarajući peroksinitritne ione ($ONOO^-$) koji dovode do toksičnosti stanica. Na tom mehanizmu se temelji antimikrobni i antitumorski učinak NO (54).

1.3. Paracetamol-opći pregled i učinci

Paracetamol (acetaminofen) je najšire uporabljavani lijek za snižavanje povišene tjelesne temperature (antipiretik) i smanjenje boli (analgetik), a posjeduje i blago protuupalno djelovanje (58, 59). To je kemijski spoj koji pripada skupini para-aminofenolskih spojeva, fenacetina i acetanilida (60, 61). Aktivni je metabolit fenacetina, ali za razliku od njega u terapijskim dozama nije kancerogen i nefrotoksičan (62). Istoznačnice, acetaminofen i paracetamol vuku korijen iz zajedničkog naziva, N-acetil-para-aminofenol (engl. *N-acetyl-para-aminophenol*, APAP) (63). APAP se brzo i gotovo u potpunosti apsorbira iz probavnog trakta. Maksimalnu koncentraciju u krvi doseže za 30-60 min, a poluživot u krvi iznosi 1-3 sata nakon terapijske doze. Jednoliko se raspoređuje u gotovo svim tjelesnim tekućinama. Vezanje za proteine plazme je varijabilno, ali ne prelazi 50% od ukupne koncentracije u krvi. APAP se primarno metabolizira u jetri konjugacijom s glukuronskom kiselinom (40-60%), sulfonskom kiselinom (20-40%) i cisteinom (3%) u netoksične metabolite koji se izlučuju putem bubrega. Glukuronidaciju kataliziraju enzimi glukuronozil-transferaze, a sulfataciju sulfo-transferaze. Samo mali dio APAP-a se metabolizira hidroksilacijom i deacetilacijom putem citokroma-P450 u visoko reaktivni metabolit, N-acetil-p-benzokinonimin (engl. *N-acetil-p-benzoquinone imine*, NAPQI), koji se zatim detoksificira vezanjem za sulfhidrilne skupine glutationa (GSH) u jetri (Slika 3) (60, 64).

Iako se općenito APAP ubraja u skupinu NSAID, za razliku od njih on pokazuje slabiji protuupalni učinak. Glavni mehanizam djelovanja NSAID je inhibicija COX, enzima odgovornog za stvaranje prostanoida koji su važni medijatori u upali, boli i vrućici. Za APAP je također pokazano da inhibira COX, ali glavni razlog njegovog slabijeg protuupalnog djelovanja još je uvijek nerazjašnjen. Razlog tomu bi mogao biti u visokoj razini peroksida te kiselom okolišu u

upalnom području što bi moglo sprječavati djelovanje APAP-a (14, 65). U odsutnosti upalnog okoliša, u intaktnim stanicama i pri normalnim količinama AA opaženo je da APAP znatno jače



Slika 3. Metabolizam APAP-a u jetri u terapijskim dozama. Glavni metaboliti su glukuronidni (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 (GSH).

inhibira enzim COX-2 nego COX-1, po čemu je APAP sličan specifičnim inhibitorima COX-2; time se može tumačiti i niska toksičnost APAP-a za sluznicu probavnog sustava kao i njegov slabi učinak na inhibiciju agregacije trombocita (65, 66). Međutim, ti učinci APAP-a nisu nedvojbeno dokazani. Također, mjesto i mehanizam antipiretskog i analgetskog djelovanja APAP-a nisu u potpunosti razjašnjeni. Pretpostavlja se da APAP ostvaruje antipiretski učinak tako što izravno smanjuje stvaranje PGE_2 u preoptičkom području hipotalamusa, gdje je smješten termoregulacijski centar (67-69), te neizravno smanjuje sintezu PG u mozgu putem smanjene osjetljivosti senzornih niti n. vagusa na endogene (IL-1 i TNF-α) ili egzogene pirogene (LPS) (70). Dugo se smatralo kako APAP smanjuje bol inhibicijom sinteze PG na periferiji (71), no u novije vrijeme se pokazalo da APAP djeluje i centralno (na razini kralježnične moždine) tako što smanjuje osjetljivost receptora za bol – tzv. antinociceptivni učinak (72, 73).

U studijama provedenim na životinjama pokazano je da je osjetljivost enzima COX u homogenatima različitih tkiva različito osjetljiva na inhibicijsko djelovanje APAP-a. Ovo bi mogao biti dokaz da postoji više inačica enzima COX. Chandrasekharan i sur. su iz mozga pasa izolirali novu izoformu COX, COX-3, koja je *in vitro*, u transficiranim stanicama kukaca (Sf9), bila jako osjetljiva na inhibiciju APAP-om (13, 74). Međutim, niti jedno kasnije istraživanje na životinjama nije potvrdilo taj rezultat. Budući da COX-3 nije izolirana izvan središnjeg živčanog sustava (CNS), pretpostavlja se da bi njenom inhibicijom APAP mogao izražavati antipiretski i analgetski učinak. Kasnije se pokazalo da COX-3 i nije prava izoforma enzima COX; kodirana je istim genom kao i COX-1, ali ima drugačiji slijed aminokiselina (tzv. „splice variant“ molekula). Istraživanja su pokazala da u ljudi i glodavaca, zbog zadržavanja introna-1 i posljedičnog okvirnog pomaka u mRNA, COX-3 nije osjetljiva na inhibiciju APAP-om i nije aktivna u upalnim procesima (8, 14, 75, 76). Općenito je prihvaćeno da APAP djeluje centralno (na razini CNS-a) i da je slabi inhibitor COX-1 i COX-2, iako to nije potkrijepljeno podatcima u literaturi. Posljednja istraživanja su pokazala kako primjena APAP-a *in vitro*, u humanim endotelnim stanicama mozga i monocitima, i *ex vivo*, u humanoj krvi, značajno smanjuje bazalno i LPS-potaknuto stvaranje PGE_2 posredstvom inhibicije COX-2, a ne COX-1 i COX-3. APAP je u navedenim modelima pokazao četverostruku selektvnost u korist inhibicije COX-2 u odnosu na COX-1 te je jednako učinkovito smanjio stvaranje PGE_2 kao i selektivni inhibitor COX-2, NS398 (14, 27, 66). Budući da su ta istraživanja provedena uglavnom u modelima *in vitro* i *ex vivo*, upitna je njihova relevantnost na zbivanja *in vivo*. Da bi stvar bila još kompleksnija, u

istraživanjima *in vitro*, u pročišćenim frakcijama enzima COX, APAP nije pokazao selektivnost niti za COX-1 niti za COX-2 (77) ili je, suprotno očekivanom, jače inhibirao enzim COX-1 (78). Iz toga se može zaključiti da APAP različitim intenzitetom inhibira stvaranje prostanoida u različitim tkivima i stanicama (79). Unatoč brojnim istraživanjima i velikim naporima, točan molekularni mehanizam djelovanja APAP-a još uvijek nije u potpunosti poznat. Ipak, čini se da COX-3, zbog niske razine ekspresije i kinetike, u ljudi i miševa nema kliničku važnost, a da je inhibicija COX-2 nešto važnija u odnosu na inhibiciju COX-1 (14).

1.3.1. Toksičnost paracetamola

Kronična uporaba ili predoziranje jednokratnim uzimanjem APAP-a (doza veća od 15 g u ljudi) je najčešći uzrok akutnog zatajenja jetre u zapadnom dijelu svijeta. Razlog tomu je proširena uporaba i laka dostupnost lijeka što uzrokuje predoziranje zbog zabune (djeca), nekritične primjene (starije i psihički oboljele osobe), interakcije s uzimanjem drugih sredstava koja induciraju jetrene enzime (npr. istodobno uzimanje narkotika, antiepileptika ili alkohola), stanja gladovanja i pokušaja suicida (80, 81). U terapijskim dozama APAP je rijetko toksičan, a i reakcije preosjetljivosti su vrlo rijetke. Za razliku od acetilsalicilne kiseline (aspirina), APAP ne uzrokuje erozije ili krvarenje u sluznici želuca te ne utječe na funkciju trombocita. Valja istaknuti da do akutnog oštećenja jetre dolazi tek u slučaju predoziranja ovim lijekom, pa zato maksimalna pojedinačna terapijska doza u odraslih ne bi smjela biti veća od 1 g odnosno ukupna dnevna doza veća od 4 g (82).

Zbog reproducibilnosti hepatotoksičnog učinka u laboratorijskih životinja (osobito u miševa), model akutnog toksičnog hepatitisa uzrokovanog APAP-om postao je 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 različitih lijekova u kliničku primjenu (83, 84). O mehanizmu toksičnog djelovanja APAP-a, unatoč brojnim istraživanjima, postoje mnoga, često i proturječna, mišljenja. Svi se slažu u činjenici da je APAP neutralan spoj koji sam po sebi nije toksičan te da to postaje tek nakon njegove pretvorbe u jetri pod utjecajem miješanih oksidaza (P-450 ili CYP), osobito izoformi CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 i CYP2A6, u elektrofilni produkt, NAPQI. CYP pripadaju superobitelji monooksigenaza, enzima koji sadrže

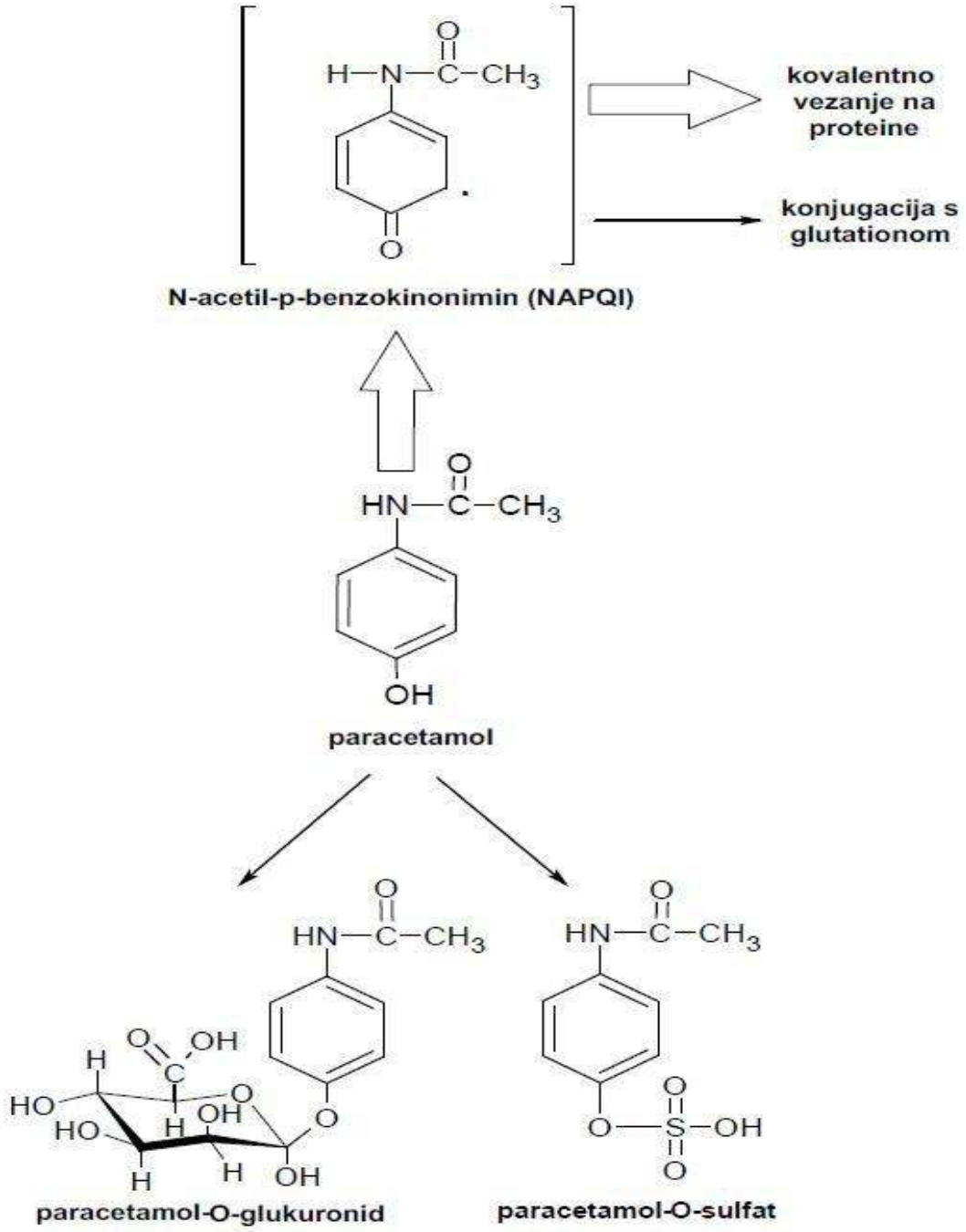
hem i koji su odgovorni za metabolizam većine ksenobiotika. NAPQI se, kao vrlo reaktivni metabolit, konjugira s GSH, a tek nakon njegovog iscrpljenja dolazi do toksičnog djelovanja NAPQI-a. Iako točan biokemijski mehanizam staničnog oštećenja i smrti još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, općenito je prihvaćeno da NAPQI uzrokuje hepatotoksičnost putem oštećenja mitohondrija, apoptoze i nekroze jetrenih stanica (osobito u centrilobularnim prostorima). Ovi učinci NAPQI-a su posredovani njegovim kovalentnim vezanjem s nukleofilnim staničnim makromolekulama poput DNA ili proteina, deplecijom GSH, lipidnom peroksidacijom i oksidativnim stresom (57, 85, 86). Smatra se da su ulazak Ca^{++} u stanicu i poremećaj funkcije mitohondrija glavni uzroci stanične smrti jer dolazi do narušavanja energetske ravnoteže stanica. Neka su istraživanja pokazala da NAPQI uzrokuje i aktivaciju endogenih nukleaza što bi moglo dovesti do cijepanja molekule DNA i apoptoze stanica (Slika 4) (57, 87).

Pretpostavlja se da upalni mehanizmi imaju ulogu u kasnijim fazama oštećenja jetre APAP-om (88). Doista, u ovom modelu je dokazana aktivacija NF-κB u jetrenim stanicama (51, 89). Oksidativni stres je uzrok aktivacije različitih signalnih puteva uključujući i pojedine transkripcijske faktore poput NF-κB i AP-1 (engl. *activator protein-1*) (85, 90). NF-κB potiče izražaj gena koji kodiraju različite proupalne medijatore, uključujući iNOS, TNFα i IL-1 (51). iNOS je odgovoran za stvaranje NO, visoko reaktivnog radikala, koji nastaje u jetri kao odgovor na različite upalne poticaje (57, 91, 92). Stvoreni NO reagira sa O^{2-} stvarajući peroksinitritne ione ($ONOO^-$). Peroksinitrit je potentan oksidans koji dovodi do nitracije tirozinskih molekula u stanicama jetre stvarajući nitrotirozin, tako da je količina nitrotirozina izvrsno mjerilo stvaranja peroksinitrita (93). Peroksinitrit, osim nitracije tirozina, reagira sa čitavim spektrom bioloških molekula (lipidi, proteini, DNA). Detoksificira se uz pomoć enzima GSH-peroksidaze pa je naročito toksičan u uvjetima niske redukcijske sposobnosti stanica, kao što je slučaj kod trovanja APAP-om (snižena razina GSH u jetri) (94). Istraživanja su pokazala da je izražaj iNOS-a, s posljedičnom proizvodnjom NO, povišen u jetri miševa tretiranih visokom dozom APAP-a. Također, u istih miševa nađena je visoka koncentracija nitrotirozina u centrilobularnim stanicama jetre (93).

Početni simptomi intoksikacije APAP-om su mučnina, povraćanje, proljev i abdominalna bol. Jetreno oštećenje postaje vidljivo 24-48 sati nakon ingestije APAP-a, a praćeno je povišenom razinom serumskih aminotransferaza (ALT i AST), laktat-dehidrogenaze (LDH), bilirubina i produljenim protrombinskim vremenom. Kod teških oštećenja može nastupiti encefalopatija,

koma i smrt unutar nekoliko dana. Terapijski postupak se sastoji u ispiranju želuca tijekom prvih nekoliko sati, davanju aktivnog ugljena i prekursora glutationa, N-acetilcisteina (engl. *N-acetyl cysteine*, NAC) (95, 96).

U posljednja dva desetljeća napravljen je veliki pomak u razumijevanju odnosa između jetre i glavnih metabolita AA, PG i LT, u fiziološkim i patološkim uvjetima. Funkcionalna kompleksnost jetre znatno otežava razlučivanje tog međudjelovanja. U jetri se pomoću enzima COX-1 i COX-2 stvaraju svi glavni metaboliti AA, ali je jetra i mjesto gdje oni ostvaruju svoje biološke učinke. Isto tako, jetra je glavni organ gdje se obavlja razgradnja eikozanoida i izlučivanje njihovih završnih metabolita putem bilijarnog trakta. Nadalje, normalna jetra se sastoji od nekoliko različitih tipova stanica (hepatociti uz nekoliko tipova neparenhimskih stanica, uključujući Kupfferove, endotelne i Itove stanice, tkivne makrofage, fibroblaste i dr.) od kojih sve, u manjoj ili većoj mjeri, imaju sposobnost sinteze eikozanoida (97). Općenito se drži da su Kupfferove stanice (specijalizirani jetreni makrofagi) glavno mjesto sinteze eikozanoida, i to: PGE_2, PGD_2, TxA_2, LTB_4 i LTC_4 (93, 97). Osim toga, aktivirane Kupfferove stanice (LPS, zimosan, ksenobiotici) vrše fagocitozu i pokreću upalni odgovor. Oslobađaju se brojne signalne molekule, uključujući hidrolitičke enzime, NO, O^{2-}, proupalne citokine (IL-1, IL-6 i TNF-α) i IFN-γ, koji posreduju u fagocitozi i upalnom odgovoru (98). Nekoliko studija na miševima i štakorima je potvrdilo ključnu ulogu Kupfferovih stanica u hepatotoksičnosti uzrokovanoj APAP-om budući da je blokada njihovog djelovanja gadolinij-kloridom ili dekstran-sulfatom u značajnoj mjeri smanjila toksične učinke APAP-a (99, 100).



Slika 4. Metabolizam APAP-a u jetri u slučaju predoziranja. Glukuronidacijski i sulfatacijski sustav nisu dostatni za detoksifikaciju APAP-a, pa se značajno povećava stvaranje NAPQI-a. GSH ne uspijeva detoksificirati velike količine NAPQI-a koji kovalentnim vezanjem za bitne stanične proteine uzrokuje nekrozu i apoptozu jetrenih stanica.

Iako je općenito prihvaćeno da su prostanoidi glavni medijatori upalnog procesa u različitim upalnim bolestima, sve više prevladava mišljenje da prostanoidi mogu imati dvojaki, ovisno o okolnostima, proupalni i protuupalni učinak (7, 17). Iako bi bilo logično očekivati da primjena visokih doza APAP-a uzrokuje inhibiciju enzima COX u jetri, zbiva se sasvim suprotno, tj. dolazi do pojačanog izražaja COX, napose enzima COX-2, i povećanog stvaranja endogenih PG, osobito PGE_2 i PGD_2, koji imaju protektivnu ulogu: dovode do povećanog stvaranja proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP) koji imaju važnu ulogu u staničnom signaliziranju te djeluju hepatoprotektivno i antiapoptotski (101, 102). Pokazano je da nedostatno stvaranje PGE_2 i PGD_2 u miševa s izbačenim genom za COX-2 ($COX2^{-/+}$ i $COX2^{-/-}$ "knock out") i miševa u kojih je COX-2 inhibirana lijekom celecoxibom (selektivni inhibitor COX-2) povećavaju hepatotoksični učinak APAP-a (101). Mnogi prikazi slučajeva su potvrdili vezu između primjene specifičnih inhibitora COX-2 i oštećenja jetre, sugerirajući da supresija COX-2 može izravno ili neizravno uzrokovati hepatotoksičnost (103, 104). Pokazano je da egzogeno primijenjeni PGE_2 i PGI_2 imaju protektivno djelovanje u različitim eksperimentalnim modelima akutnog oštećenja jetre: etanol, ugljik-tetraklorid (CCl4), D-galaktozamin (D-GalN), lipopolisaharid (LPS) sam ili u kombinaciji s D-GalN, aflatoksin, konkanavalin A (ConA), virusni hepatitis i ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje jetre (97, 103). PGE_2 je neizravno pokazao protektivni učinak i u modelu akutnog oštećenja jetre potaknutog APAP-om (101, 105). Smatra se da endogeno stvoreni PGE_2 ima izravni ili neizravni citoprotektivni učinak; svaki podražaj koji aktivira Kupfferove stanice dovodi do povećanog stvaranja PGE_2. Različiti mehanizmi su pretpostavljeni za citoprotektivno djelovanje PGE_2 (97). Istraživanja *in vitro* su pokazala mnoštvo signalnih puteva preko kojih se može odvijati navedena citoprotekcija. Među najviše istraživanima je i učinak PGE_2 na aktivaciju NF-κB preko kojeg se odvija regulacija sinteze upalnih hepatotoksičnih citokina i oksidativnih radikala (51, 106-108), aktivacija iNOS-a (57, 107), stimulacija sinteze supresivnog citokina IL-10 (109), endogenih antioksidansa (110) i cAMP-a koji ima različita imunosupresivna i protuupalna svojstva (111). Usprkos tomu, neki od navedenih mehanizama nisu u konačnici dokazani jer njihova uloga u hepatotoksičnosti APAP-a nije u potpunosti razjašnjena, a i dobiveni učinci s PGE_2 katkad su bili proturječni – to se prvenstveno odnosi na aktivaciju NF-κB i iNOS-a.

Poznato je da PGI_2 djeluje antiagregacijski, vazodilatacijski i kardioprotektivno. Stabilni analog PGI_2, beraprost, koristi se u liječenju periferne arterijske okluzivne bolesti, primarne

plućne hipertenzije i vaskularnih komplikacija šećerne bolesti. Isto tako, beraprost je pokazao protektivni učinak u animalnim modelima akutne hepatotoksičnosti uzrokovane primjenom Con A i ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom (103). Drugi stabilni analog PGI_2, iloprost, imao je protektivni učinak u modelu akutne hepatotoksičnosti uzrokovane CCl4 *in vitro* (u kulturi hepatocita) i *in vivo* (112). Za PGI_2, kao i za PGE_2, se drži da ima citoprotektivni učinak. Mehanizam te protekcije nije poznat i predmet je daljnjih istraživanja. Naime, u modelu hepatotoksičnosti uzrokovane APAP-om *in vitro* iloprost je u vrlo uskom rasponu doza (10^{-9}-10^{-12} M) povećao preživljenje i odgodio nabiranje membrane hepatocita te nije imao učinka na razinu unutarstaničnog GSH, čime je isključena interferencija s metabolizmom APAP-a. Budući da se radilo o vrlo niskim dozama lijeka (10^{-12} M, pa čak i 10^{-14} M), vrlo je vjerojatno da protektivni učinak nije posredovan IP-receptorima, već da je riječ o izravnom učinku PGI_2. Osim u jetri, PGI_2 je imao protektivni učinak i u drugim organima (bubrezi, pankreas, želudac) što je pokazano u različitim studijama, uglavnom *in vitro* (113).

TxA_2 je snažan stimulator agregacije trombocita i kontrakcijske aktivnosti glatkog mišića krvnih žila i dišnih puteva. Zbog kratkog poluvijeka života u krvi, njegova uloga u patofiziologiji određenih bolesti nije dokraja razjašnjena. Ravnoteža između stvaranja PGI_2 i TxA_2 je od iznimnog značaja za održavanje homeostaze u kardiovaskularnom sustavu i neravnoteža u korist stvaranja TxA_2 vodi razvoju ishemijske bolesti srca i krvnih žila (infarkt miokarda, angina pektoris). Također, TxA_2 je važan čimbenik u nastanku bolesti drugih organa i organskih sustava: želučanog ulkusa, plućne embolije, respiratornog distres sindroma, septičkog šoka i kroničnog zatajenja bubrega. Neka istraživanja su pokazala da je TxA_2 važan medijator u patogenezi oštećenja jetre u različitim animalnim eksperimentalnim modelima. Uporaba inhibitora TxA_2-sintaze, OKY-046, i kemijskog antagonista TP-receptora, ONO-3708, povećala je preživljenje životinja, smanjila porast ALT-a i AST-a kao i stupanj patohistološkog oštećenja jetre u miševa u modelu akutne hepatotoksičnosti uzrokovane primjenom CCl4, LPS i anti-BLP (engl. *basis liver protein*, BLP) protutijelima (114). Pokazano je da se inhibicijom stvaranja TxA_2 povećava proizvodnja PGI_2 u kratkotrajnoj kulturi homogenata jetre u miševa intoksiciranih s APAP-om jer inhibicija sinteze TxA_2 *per se* nije dovoljna kako bi se spriječilo oštećenje jetre (115). Stabilni agonist TxA_2 – U-46619, primijenjen i.v., značajno je povećao razinu ALT-a i AST-a u plazmi miševa što izravno potvrđuje patogenu ulogu TxA_2 u mehanizmima hepatotoksičnosti potaknute ksenobioticima (114). Sveukupno, vjerojatno zbog kratkog biološkog poluvijeka, nedostatka

stabilnih agonista i potentnih antagonista, nema čvrstih dokaza o mogućoj patogenetskoj ulozi TxA_2 u toksičnom oštećenju jetre.

U zadnja tri desetljeća se intenzivno istražuje utjecaj različitih proupalnih i protuupalnih tvari na ishod otrovanja APAP-om i drugim kemijskim toksičnim agensima te se pokazalo kako prostanoidi sudjeluju u mehanizmima oštećenja jetrenih i drugih stanica ksenobioticima i u nekim imunološkim toksičnim reakcijama. U početku se uglavnom smatralo da prostanoidi pridonose toksičnom djelovanju ksenobiotika. O mogućim protektivnim učincima prostanoida ima više podataka u literaturi, ali su oni proturječni. Najčešće su oni dobiveni u pokusima *in vitro* pa je upitna njihova relevantnost u pokusima *in vivo* (116). Općenito se smatra da PGE_2 i PGI_2 imaju hepatoprotektivni, a TxA_2 hepatotoksični učinak, ali to nije nipošto čvrsto dokazano, osobito u pokusima *in vivo*. Zna se da su mehanizmi te protekcije odnosno toksičnosti izuzetno složeni i nisu do kraja razjašnjeni (97, 103, 114), pa je svrha ovih istraživanja utvrditi mehanizme protektivnog djelovanja PGE_2 i PGI_2 odnosno toksičnog djelovanja TxA_2 u modelu akutne hepatotoksičnosti uzrokovane primjenom visoke doze APAP-a u miševa.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj naših istraživanja bio je:

1. Istražiti učinak tri prostanoida**,** PGE_2, PGI_2 i TXA_2, na toksičnost APAP-a *in vivo* na temelju određivanja preživljenja miševa, razine aminotransferaza (ALT) u plazmi i histopatoloških promjena u jetri tretiranih životinja;

2. Istražiti utjecaj pojedinih kemijskih agonista ili antagonista receptora (EP, IP i TP) ili specifičnih sintaza (PGE_2-sintaza i TxA_2-sintaza) PGE_2, PGI_2 i TXA_2 kao i učinak primjene protutijela na stabilni metabolit TxA_2 – TxB_2 (anti-TxB_2) na toksičnost APAP-a;

3. Istražiti učinak primjene samog APAP-a, kemijskih antagonista receptora ili specifičnih sintaza za PGE_2 i PGI_2 te anti-TxB_2 na razinu stvaranja pojedinih prostanoida *ex vivo*, u kratkotrajnoj kulturi fragmenata jetre tretiranih životinja;

4. Odrediti učinak primjene APAP-a, PGE_2 i kemijskog antagonista mPGES-1, CAY10526, na razinu aktivacije NF-kB i stupanj izraženosti iNOS-a u jetri tretiranih životinja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pokusne životinje

U svim pokusima su upotrijebljeni miševi visokosrodnih sojeva CBAT6T6/H Zg, C57Bl/6 i (CBAT6T6xC57Bl/6)F1, stari 12-20 tjedana i uzgojeni na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Upotrijebljeni su miševi obaju spolova, a u pojedinim pokusima korištene su životinje jednog spola. Pokusne životinje su držane u standardnim laboratorijskim uvjetima; regulirani 12-h ciklus svjetla i tame, temperatura prostorije 22 ± 2 °C, vlažnost zraka 50 ± 5%, te sterilizacija kaveza i stelje dvaput tjedno. Ovisno o veličini kaveza, pokusne životinje su držane u makrolonskim kavezima u skupinama 6-8 odnosno 10-20 miševa. Hranjene su kolačima za Charles Rivers miševe (kat. br. 4RF21, Diet Standard, Milan, Italija). Svi postupci sa životinjama su bili odobreni od Etičkog povjerenstva za rad s pokusnim životinjama Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Reagencije i tretman životinja

Na-fenobarbiton je nabavljen od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska). Čistu supstanciju APAP-a smo dobili kao poklon od tvrtke Belupo (Koprivnica, Hrvatska). Specifična protutijela na stabilni metabolit TxA_2 (anti-TxB_2, kat. br. P7291), kemijski antagonist TP-receptora (daltroban, kat.br. D7441) i kemijski antagonist tromboksan sintaze (benzilimidazol – BZI, kat. br. 116416) su nabavljeni od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD). Stabilni analozi PGE_2 (dm-PGE_2, kat. br. 14750), PGI_2 (iloprost, kat. br. 18215) i TxA_2 (U-46619, kat. br. 16450), TxB_2 (kat. br. 19030), kemijski blokatori/antagonisti mikrosomalne PGE-sintaze 1 – mPGES-1 (CAY10526, kat. br. 10010088) i IP-receptora (CAY10441, kat. br. 10005186) su nabavljeni od tvrtke Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, SAD). Primarna (IgG) poliklonska kunićja protutijela na NF-κB p65 (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).

Budući da se PGE_2 brzo metabolizira u inaktivni metabolit, 13,14-dihidro-15-keto PGE_2, u pokusima je korišten njegov stabilni analog, 16,16-dimetil-PGE_2 (dm-PGE_2). Komercijalna

otopina dm-PGE_2 u metil-acetatu je evaporirana pod nježnom strujom dušika, a ostatna supstanca je otopljena (1 mg/mL) u PBS-u (engl. *phosphate bufferd saline*, PBS; pH = 7,2). Dm-PGE_2 (0,2 mg/kg) je primijenjen intraperitonealno (i.p.) u volumenu 0,2 mL 30 min prije ili 2 sata nakon primjene APAP-a. Pošto su CAY10526 i CAY10441 teško topljivi u vodenim otapalima, prvo su otopljeni u organskom otapalu, N,N-dimetilformamidu (DMF; 25 mg/mL), zatim razrijeđeni u PBS-u (pH = 7,2) i konačno primijenjeni (2 mg/kg, i.p.) 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a. Budući da se PGI_2 brzo metabolizira u 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, u određenim pokusima je korišten, uz čisti PGI_2 (natrijeva sol), i njegov stabilni analog, iloprost. PGI_2 je prvo otopljen u Tris-puferu (1M, pH = 8,5, 1 mg/mL), razrijeđen u 5%-bikarbonatu i primijenjen (10 µg/kg, i.p.) 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a. Komercijalna otopina iloprosta u metil-acetatu je evaporirana pod nježnom strujom dušika, a ostatna supstanca je otopljena (1 mg/mL) u PBS-u i primijenjena 30 min prije APAP-a (0,1 i 0,5 mg/kg, i.p.). TxB_2 je otopljen u 96%-etanolu, razrijeđen u PBS-u i primijenjen 30 min prije APAP-a (2 mg/kg, i.p.). Komercijalna otopina U-46619 u metil-acetatu je evaporirana pod nježnom strujom dušika, a ostatna supstanca je otopljena u PBS-u (1 mg/mL) i primijenjena intravenski (i.v.) u repnu venu (0,2 i 0,8 mg/kg) 30 min prije APAP-a (U-46619, primijenjen i.p., ne pokazuje učinak *in vivo*). Kemijski antagonist TP-receptora, daltroban, je otopljen u Tris-puferu (1M, pH = 7,4, 0,6 mg/mL) i primijenjen 30 min prije APAP-a (5 mg/kg, i.p.). Antagonist tromboksan sintaze, BZI, je otopljen u PBS-u (1 mg/mL) i primijenjen 2 sata nakon APAP-a (50 mg/kg, i.p.). Anti-TxB_2 protutijela (anti-TxB_2) su otopljena u PBS-u i potom primijenjena (40 µg/kg, i.p.) 3 sata prije APAP-a. Doze navedenih supstanci (za primjenu *in vivo*) su odabrane na temelju dostupnih podataka u literaturi (97, 101, 103, 105, 115, 117) ili podataka o toksičnosti dobivenih na temelju naših preliminarnih istraživanja u kojima su praćeni učinci navedenih supstanci na preživljenje i histopatološke promjene u jetri tretiranih životinja. Životinje u kontrolnim skupinama su primile odgovarajući vehikulum (otapalo). Preživljenje miševa je praćeno tijekom 48 sati nakon primjene APAP-a budući da gotovo sve životinje uginu ili se oporave unutar tog perioda.

3.3. Uspostava i mjerenje hepatotoksičnosti potaknute APAP-om

S ciljem indukcije jetrenih enzima, citokroma P450 (CYP), miševi su tijekom 7 dana u vodi za piće dobivali Na-fenobarbiton (0,3 g/L). Noć uoči pokusa (14-16 sati prije primjene APAP-a) životinjama je uklonjena hrana. Stalnim miješanjem magnetskom miješalicom, APAP je otopljen u toplom PBS-u kojemu su dodane 1-2 kapi Tween 20. Životinje su izvagane i odgovarajuća doza APAP-a je primijenjena pomoću intragastrične sonde (i.g.) u volumenu 0,4-0,5 mL. Životinje su nakon toga još 4 h ostavljene bez hrane (105, 115, 117). U svrhu praćenja preživljenja životinja, APAP je primijenjen u dozama 250 i 300 mg/kg, koje su u našim preliminarnim istraživanjima uzrokovale smrtnost u 43-72% tretiranih miševa. Za određivanje koncentracije alanin-aminotransferaze (ALT) i NO u plazmi, za histopatološku, imunohistokemijsku i imunofluorescencijsku analizu jetrenih rezova te za mjerenje stvaranja prostanoida (PGE_2, PGI_2 i TxB_2) u jetrenim fragmentima *ex vivo*, miševi su tretirani visokim subletalnim dozama APAP-a (150 i 200 mg/kg). Eksperimentalne i kontrolne skupine životinja brojile su 12-13 miševa (praćenje preživljenja) ili 6-10 miševa (sva ostala mjerenja).

Uporaba anestetika i analgetika. Kao sredstvo za umjerenu ili duboku anesteziju rabio se Na-fenobarbiton, koji se preporučuje u literaturi. Otopljen je u PBS-u, otopina je sterilizirana kroz Milipore filtar i primijenjena i.p. u volumenu 0,2-0,25 mL. Za površnu (blagu) anesteziju koristio se Avertin (3-bromoetanol, Sigma-Aldrich), kao sredstvo koje se brzo i ujednačeno apsorbira nakon i.p. primjene.

Uzimanje uzoraka krvi. Miševi su dobili 250 jedinica (U) heparina i.p. 15 min prije uzimanja krvi. Uzorci krvi su uzimani primarno metodom punkcije orbitalnog venskog pleksusa. Blago anesteziran miš se hvatanjem za rep slobodnom rukom postavi na žičani poklopac kaveza te se palcem i kažiprstom čvrsto nategne koža iza ušiju tako da se izazove egzoftalmus. Nakon toga, miš se fiksira pridržavanjem repa i donjeg dijela tijela malim prstom i dlanom. Kapilarna cjevčica se uvede u medijalni očni kut te blago rotira dok krv ne počne teći kroz cjevčicu u epruvetu. Kao anestetik se rabio Avertin jer, pri ponavljanim krvarenjima, Na-fenobarbiton može inducirati P450 oksidaze u jetri i na taj način promijeniti metabolizam APAP-a i primijenjenih tvari. U nekim pokusima krv je uzimana punkcijom zagrijane lateralne repne vene ili

odsijecanjem komadića repa. U oba slučaja krv se uzimala u neanestezirane životinje koja je bila smještena u adaptabilni, prozračni, plastični držač za miševe.

Mjerenje koncentracije ALT-a u plazmi. Koncentracija ALT-a u plazmi mjerena je 20-22 sata nakon primjene APAP-a. Miševi su dobili 250 U heparina i.p. 15 min prije uzimanja krvi. Krv se vadila iz medijalnog očnog kuta heparinizirani kapilarnim cjevčicama. Rabio se ovaj postupak uzimanja krvi jer je stupanj hemolize krvi, koji interferira s optičkim očitavanjem rezultata, najniži. Nakon centrifugiranja krvi na 300 g, odijeljena je plazma i pohranjena na -80 °C. Koncentracija ALT-a u plazmi je određena standardnim laboratorijskim metodama (105, 117).

Patohistološka analiza jetre. Miševi su, pod blagom eterskom anestezijom, žrtvovani cervikalnom dislokacijom 20-22 sata nakon davanja APAP-a. Jetreni režnjevi svake životinje (9-10 miševa po skupini) su fiksirani u puferiranom 4% paraformaldehidu, dehidrirani u povećavajućim koncentracijama etanola i uklopljeni u parafin. Nakon toga su režnjevi jetrenog tkiva, debljine 5 µm, 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. Smatrano je da su jetreni režnjevi sa stupnjem većim od 2 bili značajno oštećeni (118).

3.4. Imunohistokemijska analiza

Miševi su, pod blagom eterskom anestezijom, žrtvovani cervikalnom dislokacijom 6 sati nakon davanja APAP-a. Jetreni režnjevi su uzeti od svake životinje (6 miševa po skupini), fiksirani u 4% paraformaldehidu i potom dehidrirani u 100% etanolu. Rezovi tkiva su uklopljeni u parafinsko ulje, serijski narezani na 7 µm 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% H_2O_2, isprani u PBS-u i grijani 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 sat na sobnoj temperaturi u ovlaženoj posudi. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi tkiva su inkubirani s biotiniliranim sekundarnim protutijelom (rabbit UniTect ABC Kit, Oncogene, Boston, Mass., SAD) na sobnoj temperaturi tijekom 30 min. Rezovi su zatim isprani u PBS-u, inkubirani s avidin-biotiniliranim hrenovim peroksidaznim kompleksom (ABC) tijekom 30 min, ponovno isprani u PBS-u i obojeni s diaminobenzidinom (DAB). Konačno, rezovi su isprani u destiliranoj vodi, obojeni s 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 činile su 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 Olympus BX51 mikroskop.

3.5. Imunohistokemijska kvantifikacija

Broj stanica je bio kvantitativno evaluiran od dvojice nezavisnih istraživača i svrstan kao negativne (neobojene) 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 program 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 programa DP-SOFT, verzija 3.1.

3.6. Imunofluorescencijska analiza

Nakon deparafinizacije i rehidracije, rezovi tkiva su grijani u citratnim puferu u mikrovalnoj pećnici (95 °C) tijekom 17 min. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, rezovi tkiva su oprani u svježem PBS-u. Rezovi su inkubirani s kozjim serumom (Normal Goat Serum, X0907 DAKO, Glostrup, Danska) kroz 1 sat u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela. Nakon toga, rezovi su inkubirani s primarnim poliklonskim kunićjim anti-NF-κB p65 protutijelom (1:100) tijekom 1 sat. Nakon nekoliko ispiranja u PBS-u, rezovi su tijekom 1 sat inkubirani s razrijeđenim (1:200) sekundarnim protutijelom (Texas Red, kat. br. sc-2780, Santa Cruz Biotechnology). Po završetku inkubacije, rezovi su oprani u PBS-u i obojeni s diamidino-2-fenilindolom (DAPI) s ciljem da se oboje jezgre stanica. Nakon završnog ispiranja u PBS-u, rezovi tkiva su postavljeni, osušeni na zraku i pokriveni (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Kontrola specifičnosti protutijela podrazumijevala je izostavljanje primarnog protutijela iz postupka bojanja. Rezovi su analizirani pomoću fluorescentnog mikroskopa (Olympus BX61, Tokyo, Japan). Imunofluorescentne slike su napravljene pomoću digitalne kamere DP71, postavljene na fluorescentni mikroskop. U tu svrhu su korišteni programi Olympus Cell i Adobe Photoshop.

3.7. Određivanje stvaranja PGE_2, PGI_2 i TxB_2 *ex vivo*

Miševi su, pod blagom eterskom anestezijom, žrtvovani cervikalnom dislokacijom 6 sati nakon primjene APAP-a. Razina prostanoida određivala se mjerenjem koncentracije PGE_2, PGI_2 i TxB_2 u supernatantima koji su dobiveni kratkotrajnom kulturom fragmenata jetrenog tkiva (proizvodnja *ex vivo*). Uzorci jetrenog tkiva su isjeckani na sitne komadiće (1-2 mm^3) u hladnom PBS-u. Tijekom cijelog daljnjeg postupka tkivo je držano na ledu (+4 °C) da bi se spriječila spontana sinteza prostanoida. Potom je tkivo još dva puta oprano u svježem PBS-u (metodom taloženja i odlijevanja) kako bi se odstranili mogući nekrotični dijelovi tkiva i krv. Nakon toga je 200-400 mg tkiva premješteno u plastične epruvete kojima je prethodno izmjerena masa. Uzorci su centrifugirani na 500 g kroz 3 min, nakon čega je odliven supernatant i izmjerena masa tkiva. Tkivo je potom resuspendirano u minimalnom esencijalnom mediju (MEM, 5 μl MEM/mg tkiva)

i inkubirano tijekom 1 sat na 37 °C u vodenoj kupelji uz povremeno miješanje (svakih 5 minuta). Nakon centrifugiranja na 500 g tijekom 5 min, uzet je supernatant i pohranjen na -80 °C do mjerenja koncentracije prostanoida. Prije pohrane, supernatantima je dodan indometacin (konačna koncentracija 5 μg/mL) da bi se spriječila spontana sinteza prostanoida u preostalim staničnim fragmentima jetre. Pošto PGI_2 i TxB_2 imaju vrlo karatak poluvijek života ($t_{1/2}$ oko 30 s), njihova razina se određivala na temelju mjerenja koncentracije njihovih metabolita, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ i 11-dehidro TxB_2 ($t_{1/2}$ oko 3 odnosno 45 min). Koncentracije prostanoida su određene korištenjem PGE_2-, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$- i 11-dehidro TxB_2-EIA (prem engl. enzyme immunosorbent assay, EIA) setova kemikalija, pri čemu su strogo poštivane upute proizvođača (Cayman Chemical, SAD).

3.8. Mjerenje koncentracije NO u plazmi

Uzorci plazme su uzeti 6 sati nakon što su miševi primili APAP i zatim pohranjeni na -80 °C do određivanja koncentracije NO. U svrhu kvantifikacije stvaranja NO, nitrat (NO_3^-) je prvo reduciran u nitrit (NO_2^-) korištenjem zrnaca kadmija obloženih bakrom (NITRALYZER-II, Nitrate to Nitrite reduction kit, World Precision Instruments, Sarasota, FL, SAD). Koncentracija nitrita je izmjerena 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).

3.9. Statistička obradba podataka

Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM. 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 učinjene su korištenjem Studentovog t-testa. Usporedbe između više skupina testirane su pomoću ANOVA-e (engl. analysis of variance, ANOVA) s *post hoc* testiranjem (Bonferronijev i Dunnettov test) značajnosti između pojedinih skupina. Statistička značajnost je bila izražena pri $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Istraživanje učinaka PGE_2

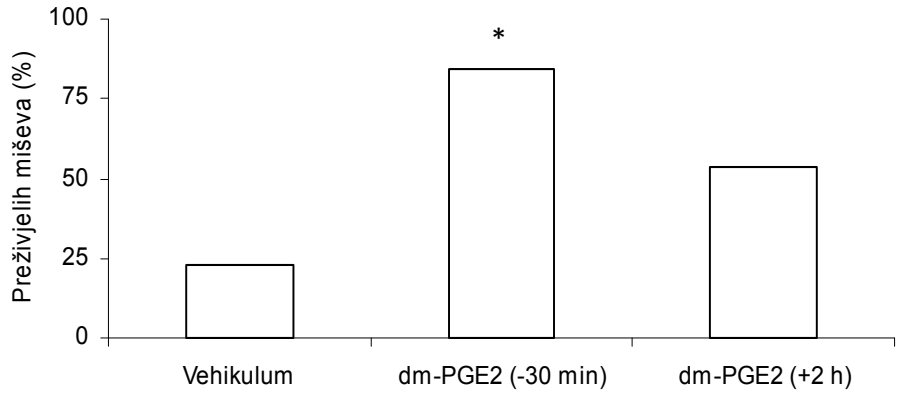
4.1.1. Učinak dm-PGE_2 i CAY10526 na preživljenje miševa s oštećenjem jetre izazvanim primjenom APAP-a

Stabilni agonist PGE_2, dm-PGE_2 (0,2 mg/kg, i.p.), i kemijski antagonist mPGES-1, CAY10526 (2 mg/kg, i.p.), su primijenjeni 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a (300 mg/kg). Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati nakon intragastrične primjene APAP-a. Dm-PGE_2, primijenjen 30 min prije APAP-a, je statistički značajno povećao preživljenje životinja u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 1A, $p<0,05$), dok je njegova primjena 2 sata nakon APAP-a također povećala preživljenje životinja, ali bez statističke značajnosti (Slika 1A, $p>0,05$). CAY10526, primijenjen 30 min prije i 2 sata nakon APAP-a, je smanjio preživljenje životinja, iako razlika nije bila statistički značajna (Slika 1B, $p>0,05$ za obje usporedbe).

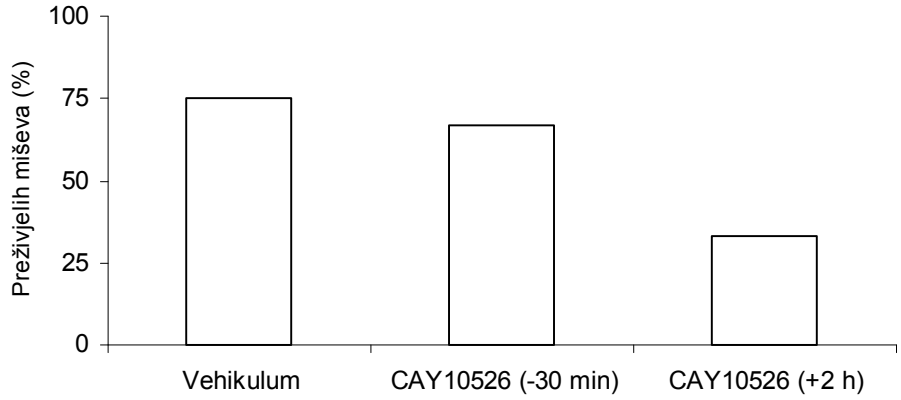
4.1.2. Učinak dm-PGE_2 i CAY10526 na plazmatske vrijednosti ALT-a

Dm-PGE_2 (0,2 mg/kg, i.p.) je primijenjen 30 min prije ili 2 sata nakon, dok je CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) primijenjen 2 sata nakon APAP-a (150 mg/kg). Koncentracija ALT-a je određena 20-22 sata nakon intragastrične primjene APAP-a. Dm-PGE_2, i prije i nakon primjene APAP-a, je značajno smanjio porast ALT-a (Slika 2A, $p<0,05$ za obje usporedbe). Primjenom CAY10526, povećala se razina ALT-a u plazmi, ali zbog velike varijabilnosti unutar skupine taj porast nije bio statistički značajan (Slika 2B, $p>0,05$).

A

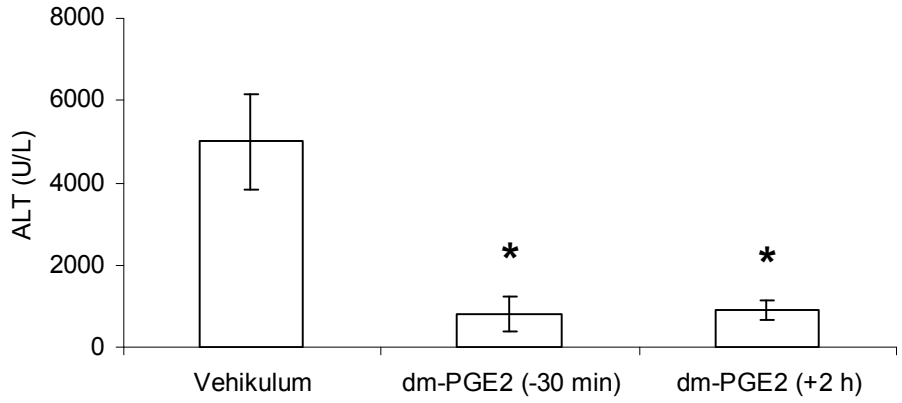


B

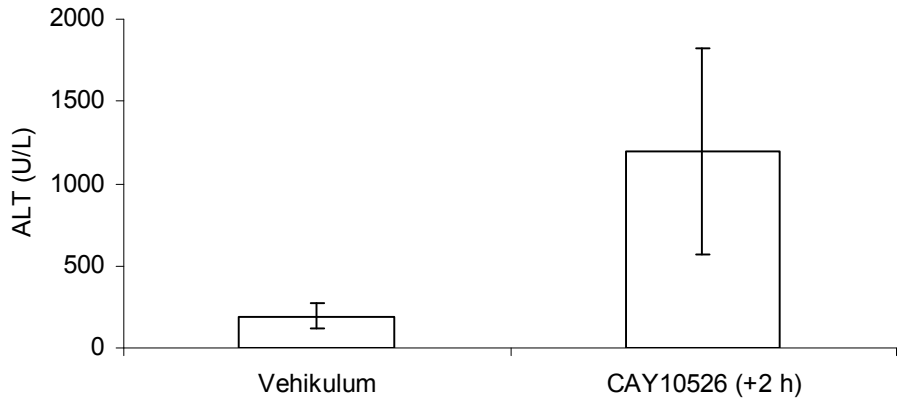


Slika 1. Učinak dm-PGE_2 i CAY10526 na preživljenje miševa s oštećenjem jetre izazvanim primjenom APAP-a. APAP (300 mg/kg) je primijenjen *per os* (pomoću intragastrične sonde) i preživljenje je praćeno tijekom sljedećih 48 sati. **A**. dm-PGE_2 (0,2 mg/kg, i.p.) i **B**. CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) su primijenjeni 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a. Kontrolna skupina je primila vehikulum 30 min prije APAP-a. n=12 ili 13 miševa po skupini. *$p<0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, hi-kvadrat test.

A



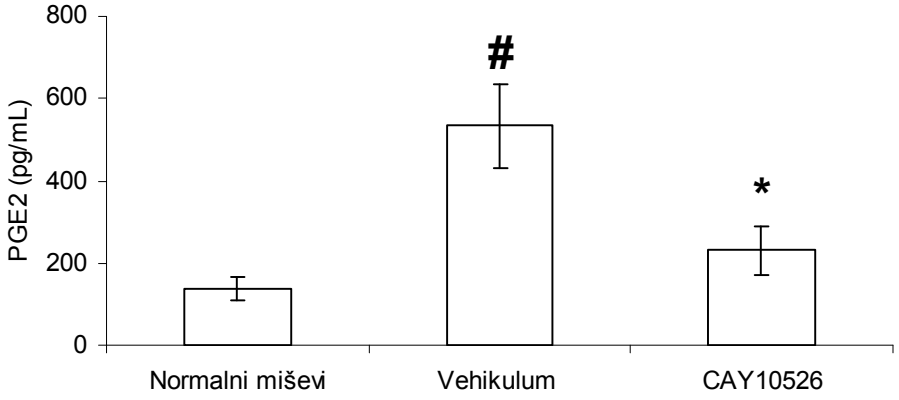
B



Slika 2. Učinak dm-PGE_2 i CAY10526 na plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa s oštećenjem jetre izazvanim primjenom APAP-a. APAP (150 mg/kg) je primijenjen *per os* (pomoću intragastrične sonde) i koncentracija ALT-a je određena 20-22 sata nakon APAP-a. **A**. dm-PGE_2 (0,2 mg/kg, i.p.) je primijenjen 30 min prije ili 2 sata nakon, dok je kontrolna skupina primila vehikulum 30 min prije APAP-a. **B**. CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 2 sata nakon APAP-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n=8-10 miševa po skupini. *$p<0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, test ANOVA s naknadnom Dunnettovom multiplom usporedbom (A) i Studentov t-test (B).

4.1.3. Učinak CAY10526 na stvaranje PGE_2 *ex vivo*

Razina PGE_2 je bila određena u supernatantima inkubiranih jetrenih fragmenata uzetih od normalnih (netretiranih) miševa ili miševa koji su dobili APAP i 2 sata kasnije tretirani s CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) ili vehikulumom. U usporedbi s normalnim miševima, davanje samog APAP-a (APAP + vehikulum) je značajno povećalo stvaranje PGE_2, dok je primjena CAY10526 značajno smanjila navedeno povećanje stvaranja PGE_2 (Slika 3, $p<0,05$ za obje usporedbe).



Slika 3. Učinak CAY10526 na stvaranje PGE_2 *ex vivo*. APAP (150 mg/kg) je primijenjen *per os*, a CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 2 sata nakon APAP-a. Jetreni fragmenti su priređeni 6 sati nakon primjene APAP-a. Koncentracija PGE_2 je određena u supernatantima prethodno inkubiranih (1 sat) jetrenih fragmenata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n=6 miševa po skupini. $^{\#}p<0,05$ u usporedbi s normalnim miševima, $*p<0,05$ u usporedbi s miševima koji su primili vehikulum, test ANOVA s naknadnom Bonferronijevom multiplom usporedbom.

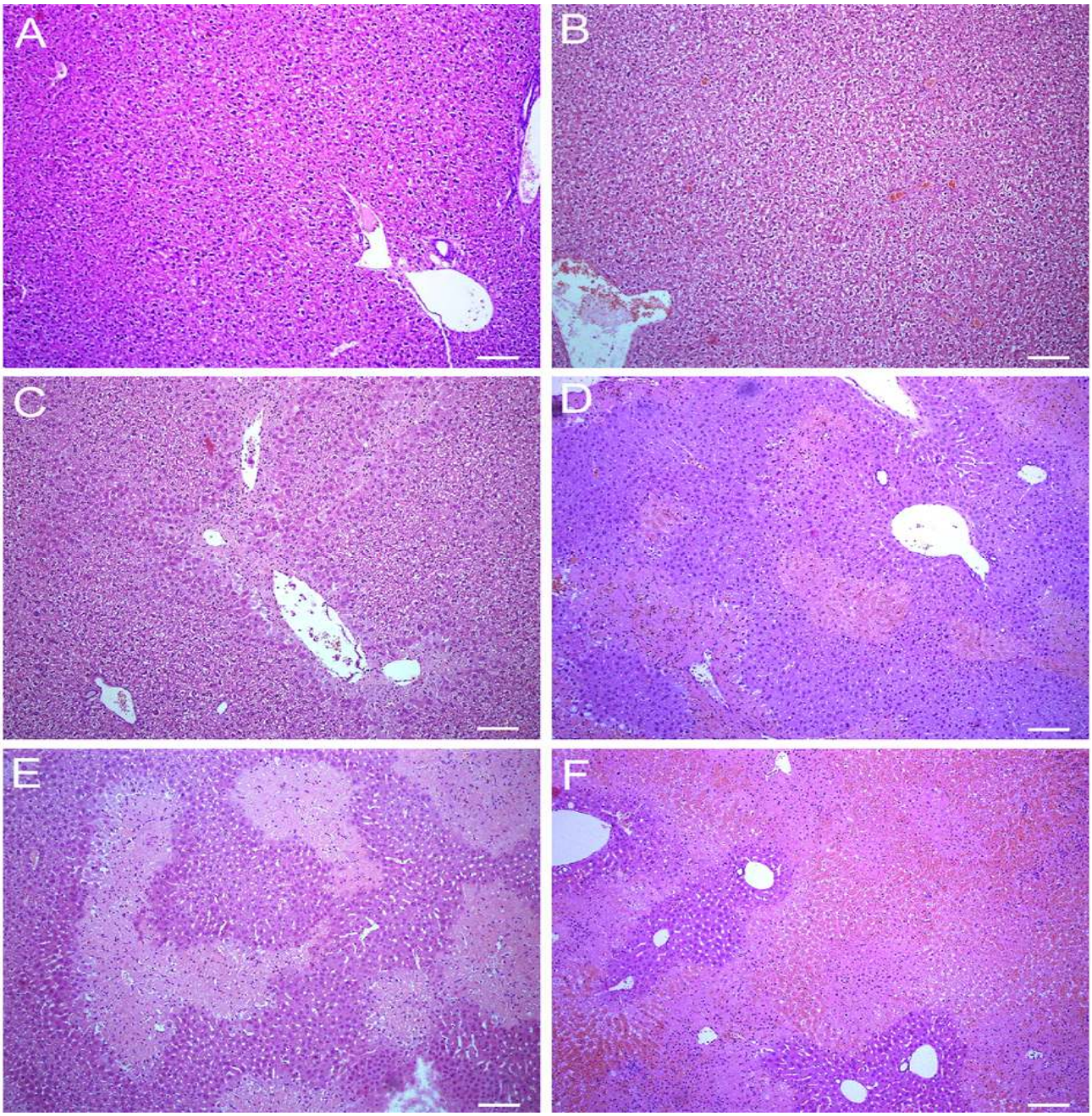
4.1.4. Histopatološke promjene u jetri miševa tretiranih s PGE_2 i CAY10526

Makroskopski, na cijeloj površini jetre nekih životinja tretiranih s APAP-om mogle su se vidjeti tamnocrvene, hemoragično-nekrotične pjege na žutoj podlozi. Mikroskopski, oštećenje jetrenog tkiva je stupnjevano korištenjem arbitrarne skale 0-5 kako je opisano u Materijalima i metodama (Slika 4). Težina nekroze bila je varijabilna između pojedinih skupina, između životinja unutar iste skupine, kao i između različitih područja jetre uzete od jedne životinje. Ipak, dm-PGE2 je značajno smanjio broj i veličinu nekrotičnih područja što se moglo vidjeti makroskopskim pregledom i histološkom analizom jetrenog tkiva. Makroskopska i mikroskopska oštećenja jetrenog parenhima bila su izrazitija u miševa tretiranih s CAY10526 (Tablica 1).

Tablica 1. Učinak dm-PGE_2 i CAY10526 na oštećenje jetre izazvano primjenom APAP-a

	Stupanj histopatološkog oštećenja[c]						
Tretman miševa[a]	0	1	2	3	4	5	Stupanj>2[d]
Vehikulum + APAP	1	2	2	2	2	1	5/10
Dm-PGE_2 + APAP	6	4	0	0	0	0	0/10*
APAP + dm-PGE_2	6	3	1	0	0	0	0/10*
	Stupanj histopatološkog oštećenja[c]						
Tretman miševa[b]	0	1	2	3	4	5	Stupanj>2[d]
APAP + vehikulum	1	3	2	1	2	0	3/9
APAP + CAY10526	0	1	1	2	3	2	7/9

[a]dm-PGE2 (0,2 mg/kg, i.p.) je primijenjen 30 min prije ili 2 sata nakon, a kontrolna skupina je primila vehikulum 30 min prije APAP-a. [b]CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 2 sata nakon APAP-a. Miševi su žrtvovani i jetre su uzete 20-22 sata nakon primjene APAP-a (150 mg/kg). [c]Stupanj histopatološkog oštećenja je određen na temelju intenziteta hepatocelularne nekroze kako je opisano u Materijalima i metodama. [d]Stupnjevi veći od 2 su predstavljali značajno izraženu nekrozu. n=9 ili 10 miševa po skupini. *Statistički značajno različito u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p<0,05$), hi-kvadrat test.



Slika 4. Histopatološke promjene u jetri normalnih miševa i onih tretiranih s APAP-om. Jetre su uzete 20-22 sata nakon primjene APAP-a (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). Opisi svakog stupnja su prikazani u Materijalima i metodama. Rezovi tkiva su obojeni s hematoksilinom i eozinom (originalno povećanje, 100x).

4.1.5. Imunohistokemijska analiza aktivacije NF-κB

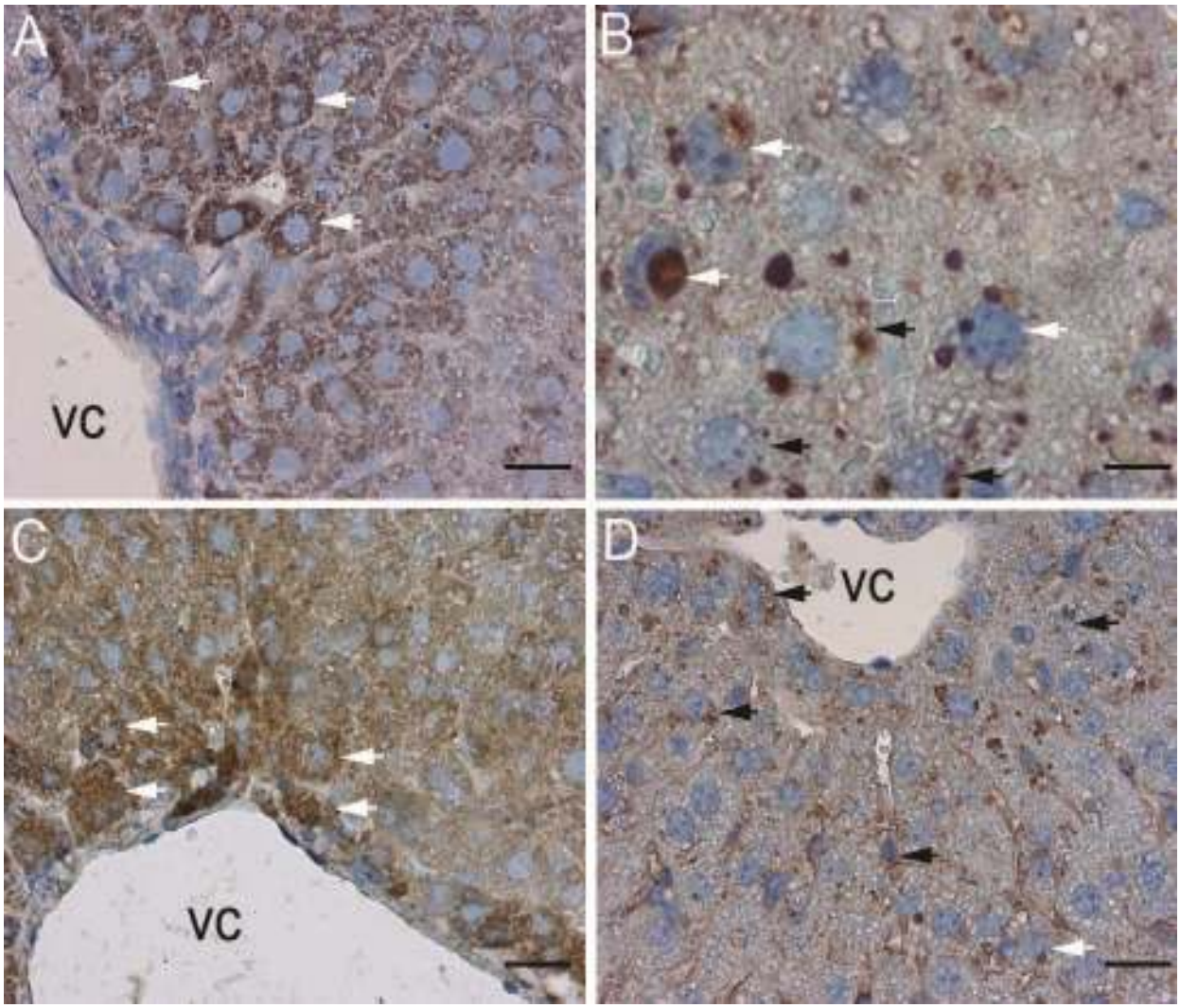
Aktivacija NF-κB, nakon primjene APAP-a, je praćena na temelju imunohistološke lokalizacije njegove podjedinice p65. Miševi su 30 min prije uštrcavanja APAP-a primili PGE_2 (0,2 mg/kg, i.p.) i vehikulum, dok je CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) primijenjen 2 sata nakon APAP-a. Kontrolnu skupinu su činili normalni miševi.

Normalni miševi. NF-κB 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-κB je također bila izražena u pojedinačnim stanicama u jetrenim lobulima i oko centralne vene (eferentne arteriole) (Slika 5A). Gotovo sva imunoreaktivnost na NF-κB je bila prisutna u citoplazmi i samo je u 3,7% pozitivnih stanica ona bila prisutna i u jezgri (Tablica 2).

Miševi tretirani s APAP-om (vehikulum + APAP). 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 5B). 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-κB, imunoreaktivnost je također bila prisutna i u jezgri hepatocita (21,8% pozitivnih stanica) što ukazuje na značajno veću aktivnost NF-κB u usporedbi s normalnim miševima (Tablica 2, $p<0,001$).

Miševi tretirani s dm-PGE_2. Cijelo jetreno tkivo je bilo infiltrirano s upalnim stanicama. Mnogo stanica je bilo u različitim mitotskim razdobljima što ukazuje na regeneraciju jetrenog tkiva. Oko krvnih žila je bilo mnogo reaktivnih stanica s malim, difuzno raspoređenim zrncima dajući pojedinim stanicama jaku pozitivnost u citoplazmi u usporedbi s jezgrom (Slika 5C). Imunohistokemijska lokalizacija NF-κB je uglavnom bila izražena u citoplazmi, a u jezgri je ona bila značajno manja (8 % pozitivnih stanica) u usporedbi s miševima tretiranim samo s APAP-om (Tablica 2, $p<0,001$).

Miševi tretirani s CAY10526. Imunohistokemijska izraženost NF-κB je u jetrenim stanicama pokazivala uglavnom perimembranozni uzorak. U središnjem dijelu lobula pozitivnost na NF-κB je bila izražena i u citoplazmi i u jezgri, s prisutnim vakuolama u oba stanična odjeljka (Slika 5D). U usporedbi s miševima kojima je dat samo APAP, imunohistokemijska izraženost NF-κB u jezgri je bila veća (23 % pozitivnih stanica), ali bez statističke značajnosti (Tablica 2, $p>0,05$).



Slika 5. Imunohistokemijska izraženost NF-κB p65 u jetri. A. *Normalni miševi*. Pozitivnost na NF-κB je bila uglavnom prisutna u obliku difuznog uzorka u citoplazmi stanica (bijele strjelice), napose u područjima oko centralne vene, ×40, ljestvica 25 μm. B. *Miševi tretirani s APAP-om (vehikulum + APAP)*. Imunopozitivnost na NF-κB se očitovala u vidu perimembranoznih vakuolarnih nakupina u jezgri (bijele strjelice) i citoplazmi (crne strjelice), ×100, ljestvica 10 μm. C. *Miševi tretirani s dm-PGE_2 (PGE_2 + APAP)*. Imunohistokemijska izraženost NF-κB je bila slična onoj u skupini normalnih miševa (vidi pod A), ×40, ljestvica 25 μm. D. *Miševi tretirani s CAY10526 (APAP + CAY10526).* Imunohistokemijska izraženost NF-κB je bila slična onoj u skupini miševa tretiranih s APAP-om (vidi pod B), ×40, ljestvica 25 μm. VC-centralna vena. Imunohistokemijsko bojanje podjedinice p65 NF-kB. n=6 životinja po skupini.

4.1.6. Imunofluorescencijska analiza aktivacije NF-κB

Imunofluorescencijska analiza izraženosti NF-κB u jetrenim stanicama općenito je potvrdila prijašnju imunohistokemijsku analizu. U skupini normalnih miševa je samo nekoliko stanica imalo izraženu pozitivnost jezgre na NF-κB (Slika 6A). U skupini miševa tretiranih s APAP-om (vehikulum + APAP) pozitivnost jezgre na NF-κB je bila značajno veća u usporedbi s normalnim miševima (Slika 6B), dok je tretman s dm-PGE_2 smanjio tu pozitivnost (Slika 6C). U miševa tretiranih s CAY10526 pozitivnost jezgre na NF-κB je bila slična onoj u skupini miševa tretiranih s APAP-om (Slika 6D).

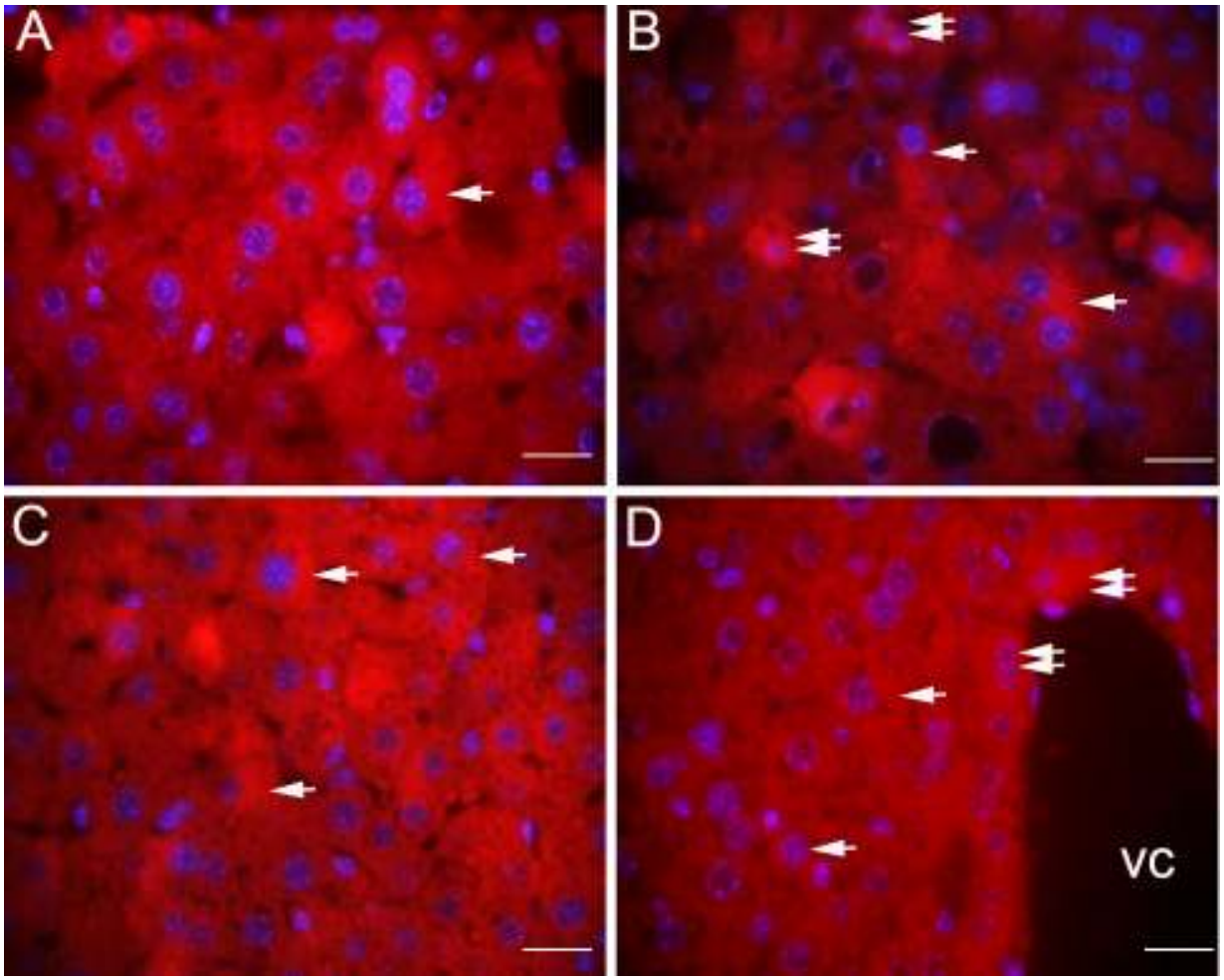
4.1.7. Imunohistokemijska analiza izraženosti iNOS-a u citoplazmi jetrenih stanica

Normalni miševi. Zrnate nakupine iNOS-a, organizirane u male skupine, su bile prisutne u citoplazmi malog broja hepatocita, dok citoplazma većine drugih stanica nije bila pozitivna na iNOS (Slika 7A). Stanice na unutarnjoj površini sinusoidnih kapilara (endotelne ili Kupfferove stanice) su također bile pozitivne na iNOS. Bilo je samo 3,9% stanica s citoplazmatskom pozitivnošću na iNOS (Tablica 2).

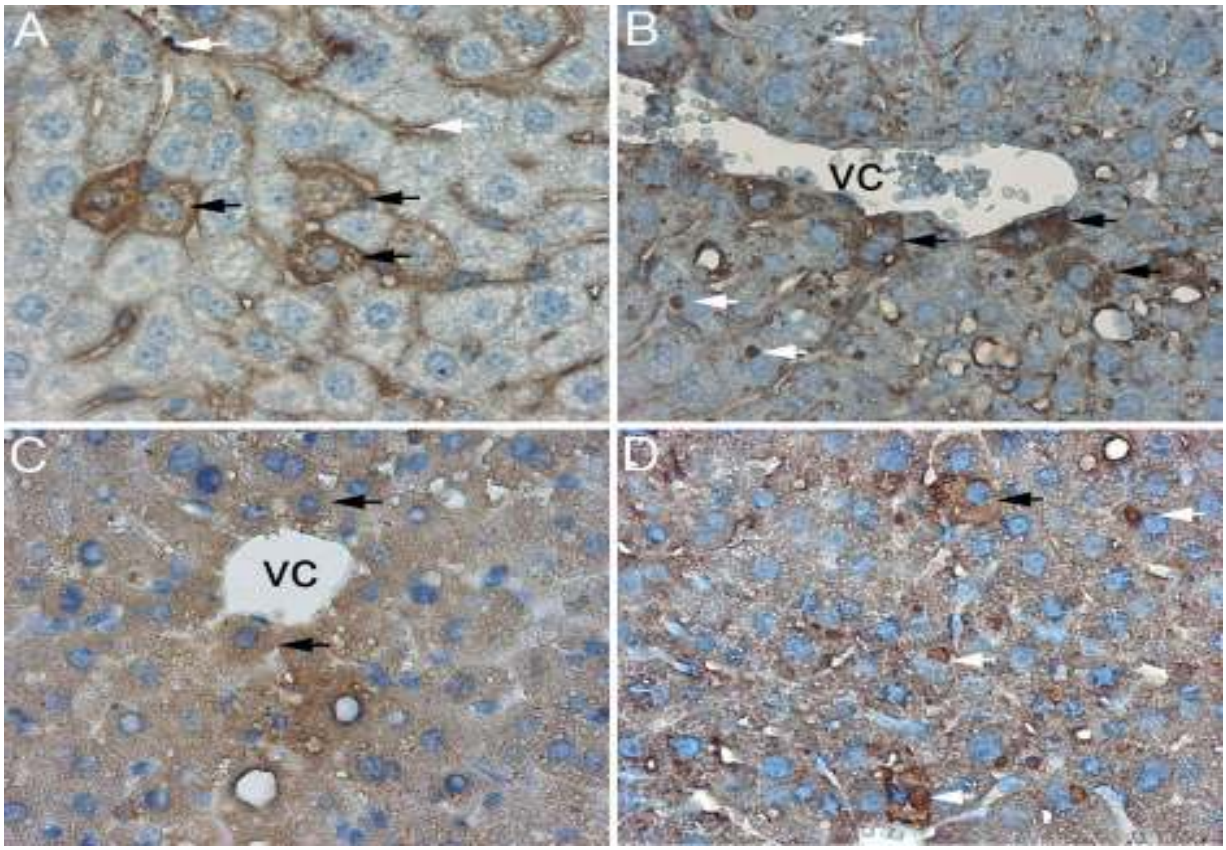
Miševi tretirani s APAP-om (vehikulum + APAP). iNOS je bio izražen u citoplazmi hepatocita u obliku malih, gusto zbijenih zrnaca ili velikih pojedinačnih vakuola. Neke endotelne ili Kupfferove stanice su također bile pozitivne na iNOS (Slika 7 B). Broj jetrenih stanica pozitivnih na iNOS (41,6% pozitivnih stanica) je bio statistički značajno veći u usporedbi s normalnim miševima (Tablica 2, $p<0,001$).

Miševi tretirani s dm-PGE_2. Citoplazmatska izraženost iNOS-a je pokazivala zrnati uzorak, naročito u stanicama smještenim oko centralne vene (Slika 7C). Broj jetrenih stanica pozitivnih na iNOS (20,5% stanica) je bio značajno manji u usporedbi sa skupinom miševa tretiranih s APAP-om (Tablica 2, $p<0,001$).

Miševi tretirani s CAY10526. iNOS je bio izražen u citoplazmi hepatocita u obliku finih zrnatih nakupina ili velikih pojedinačnih vakuola (Slika 7D). Broj stanica, koje su bile pozitivne na iNOS, nije bio značajno veći (42,5% pozitivnih stanica) u odnosu na skupinu miševa tretiranih s APAP-om (Tablica 2, $p>0,05$).



Slika 6. Imunofluorescencija podjedinice p65 NF-κB u jetrenim stanicama. A. *Normalni miševi*. B. *Miševi tretirani s APAP-om (vehikulum + APAP)*. C. *Miševi tretirani s dm-PGE_2 (PGE_2 + APAP)*. D. *Miševi tretirani s CAY10526 (APAP + CAY10526)*. Bijele strjelice pokazuju, crveno obojenu, nuklearnu ili perinuklearnu pozitivnost na NF-κB. Imunofluorescencijsko bojenje podjedinice p65 NF-κB, x100, ljestvica 10 μm. VC-centralna vena. n=6 životinja po skupini.



Slika 7. Imunohistokemijska izraženost iNOS-a u jetri. A. *Normalni miševi*. Imunopozitivnost na iNOS je bila uglavnom prisutna u obliku difuznog uzorka u citoplazmi hepatocita (crne strjelice), a također je bila izražena i u citoplazmi endotelnih stanica (bijele strjelice), ×40. B. *Miševi tretirani s APAP-om (vehikulum + APAP)*. Imunopozitivnost na iNOS se očitovala u vidu difuznih granularnih (crne strjelice) ili vakuolarnih (bijele strjelice) nakupina u citoplazmi jetrenih stanica, ×40. C. *Miševi tretirani s PGE_2 (PGE_2 + APAP)*. Imunohistokemijska izraženost iNOS-a je pokazala difuzni uzorak (crne strjelice) u citoplazmi hepatocita bližih centralnoj veni, ×40. D. *Miševi tretirani s CAY10526 (APAP + CAY10526)*. Imunohistokemijska izraženost iNOS-a u citoplazmi je bila slična onoj u skupini miševa tretiranih s APAP-om (vidi pod B), ×40. VC-centralna vena. Imunohistokemijsko bojanje iNOS-a, ljestvica 25 μm. n=6 životinja po skupini.

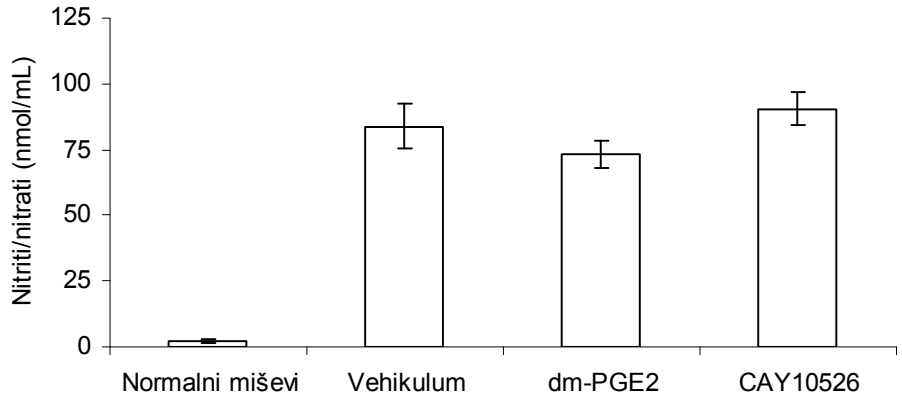
Tablica 2. Kvantifikacija imunopozitivnosti na NF-κB i iNOS u jetrenim stanicama

	% hepatocita[a] pozitivnih na:	
Skupina	NF-κB	iNOS
Normalni miševi	3,7 ± 0,7	3,9 ± 0,5
Vehikulum + APAP	21,8 ± 3,8[b]	41,6 ± 4,4[b]
PGE_2 + APAP	8,0 ± 1,4[b,c]	20,5 ± 4,0[b,c]
APAP + CAY10526	23,0 ± 4,0[b,d]	42,5 ± 4,9[b,d]

[a]U svakom jetrenom polju (100 μm × 100 μm) je izračunat postotak pozitivnih stanica na NF-κB i iNOS te izražen kao srednja vrijednost ± SEM. [b]Statistički značajna razlika u odnosu na normalne miševe. [c]Statistički značajna razlika u odnosu na miševe tretirane s vehikulumom i APAP-om. [d]Statistički značajna razlika u odnosu na miševe tretirane s PGE_2. Razlike između skupina životinja su bile statistički značajne pri vrijednosti $p<0,001$, test ANOVA s naknadnom Bonferronijevom multiplom usporedbom.

4.1.8. Učinak dm-PGE_2 i CAY10526 na plazmatsku koncentraciju nitrita/nitrata

Sinteza NO u jetri, izražena kao omjer koncentracije nitriti/nitrati u plazmi, je bila gotovo nemjerljiva u normalnih životinja. Davanje APAP-a je značajno povećalo koncentraciju nitrita u plazmi, dok je tretman životinja s PGE_2 smanjio tu razinu, ali bez statističke značajnosti. U miševa tretiranih s CAY10526 razina nitrita je bila povišena u usporedbi sa skupinom koja je primila APAP, ali razlika nije bila statistički značajna (Slika 8, $p>0,05$ za obje usporedbe).



Slika 8. Učinak dm-PGE_2 i CAY10526 na koncentraciju nitrita/nitrata u plazmi miševa. APAP (150 mg/kg) je primijenjen *per os* i 6 sati kasnije je određena koncentracija nitrita/nitrata u plazmi. Koncentracija nitrita u plazmi normalnih miševa bila je 0,50 ± 0,11 U/L. Dm-PGE_2 (0,2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 30 min prije, dok je CAY10526 (2 mg/kg, i.p.) primijenjen 2 sata nakon APAP-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n=6 miševa po skupini. Koncentracija nitrita u miševa tretiranih s vehikulumom (vehikulum + APAP), PGE_2 (PGE_2 + APAP) i CAY10526 (APAP + CAY10526) je bila značajno veća u usporedbi s normalnim miševima ($p<0,05$). Nije bilo statistički značajne razlike između skupina životinja koje su primile APAP ($p>0,05$), test ANOVA s naknadnom Bonferronijevom multiplom usporedbom.

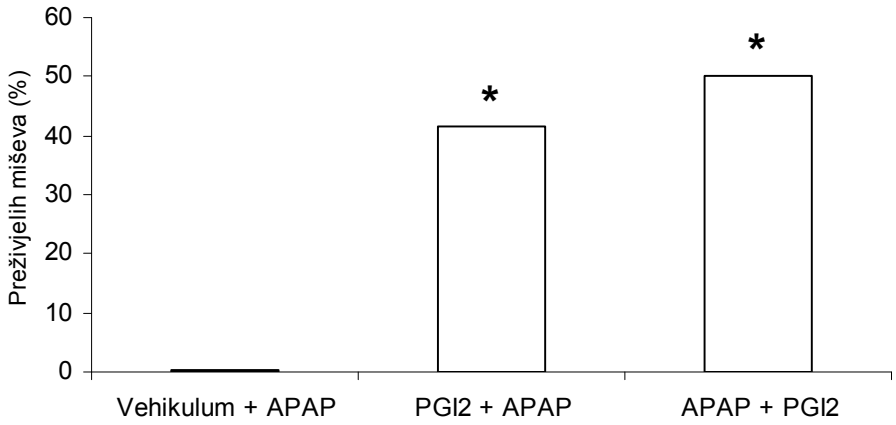
4.2. Istraživanje učinaka PGI_2

4.2.1. Učinak PGI_2 i CAY10441 na preživljenje miševa s oštećenjem jetre izazvanim primjenom APAP-a

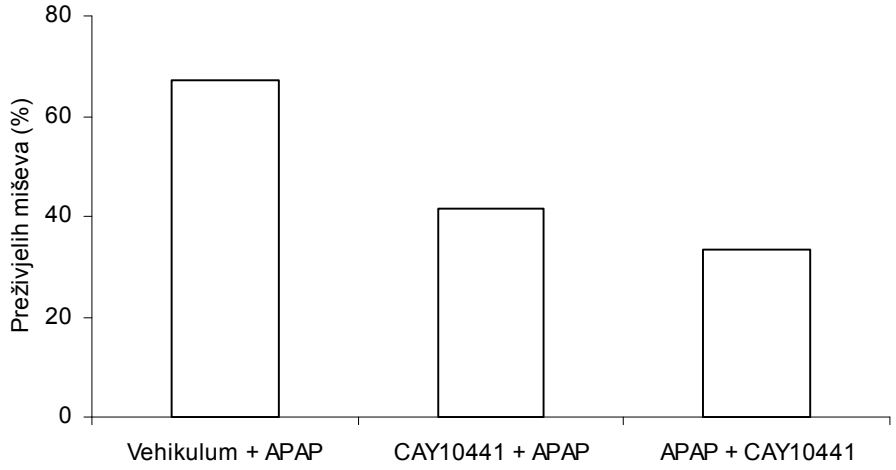
PGI_2 (10 μg/kg, i.p.) i kemijski antagonist IP-receptora, CAY10441 (2 mg/kg, i.p.), su primijenjeni 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a (300 mg/kg). Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati nakon intragastrične primjene APAP-a. PGI_2, primijenjen 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a, je statistički značajno povećao preživljenje životinja u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 9A, $p<0,05$ za obje usporedbe). CAY10441 je smanjio preživljenje životinja kad

je bio primijenjen 30 min prije i 2 sata nakon APAP-a, iako razlika nije bila statistički značajna (Slika 9B, p>0,05 za obje usporedbe).

A



B



Slika 9. Učinak PGI_2 i CAY10441 na preživljenje miševa s oštećenjem jetre izazvanim primjenom APAP-a. APAP (300 mg/kg) je primijenjen *per os* (pomoću intragastrične sonde) i preživljenje je praćeno tijekom sljedećih 48 sati. **A**. PGI_2 (10 μg/kg, i.p.) i **B**. CAY10441 (2 mg/kg, i.p.) su primijenjeni 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a. Kontrolna skupina je primila vehikulum 30 min prije APAP-a. n=12 miševa po skupini. *p<0,05 u usporedbi s kontrolnom skupinom, hi-kvadrat test.

4.2.2. Učinak PGI_2 i CAY10441 na plazmatsku koncentraciju ALT-a

PGI_2 (10 μg/kg, i.p.) i CAY10441 (2 mg/kg, i.p.) su primijenjeni 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a (200 mg/kg). Koncentracija ALT-a je određena 20-22 sata nakon intragastrične primjene APAP-a. PGI_2, i prije i nakon primjene APAP-a, je smanjio porast ALT-a u odnosu na kontrolnu skupinu, s tim da je to smanjenje bilo značajno ($p<0,05$) kad je PGI_2 primijenjen 30 min prije APAP-a (Slika 10A). Primjenom CAY10441, povećala se razina ALT-a u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu, a to povećanje je bilo statistički značajno ($p<0,05$) kad je CAY10441 primijenjen 2 sata nakon APAP-a (Slika 10B).

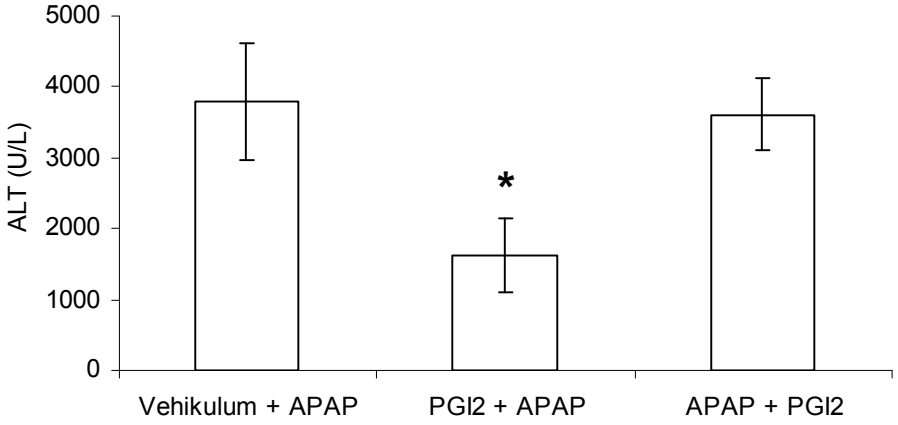
4.2.3. Učinak iloprosta na preživljenje miševa i plazmatsku koncentraciju ALT-a

Iloprost, stabilni agonist PGI_2, je primijenjen u 2 različite doze (0,1 mg/kg i 0,5 mg/kg, i.p.) 30 min prije intragastrične primjene APAP-a. APAP je primijenjen u dozama 300 mg/kg (praćenje preživljenja) i 200 mg/kg (određivanje ALT-a). Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati, a plazmatska koncentracija ALT-a je određena 20-22 sata nakon primjene APAP-a. Iloprost, u dozama 0,1 mg/kg i 0,5 mg/kg, je povećao preživljenje životinja (Slika 11A) odnosno smanjio porast ALT-a u plazmi (Slika 11B) u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti (Slika 11, $p>0,05$ za sve usporedbe).

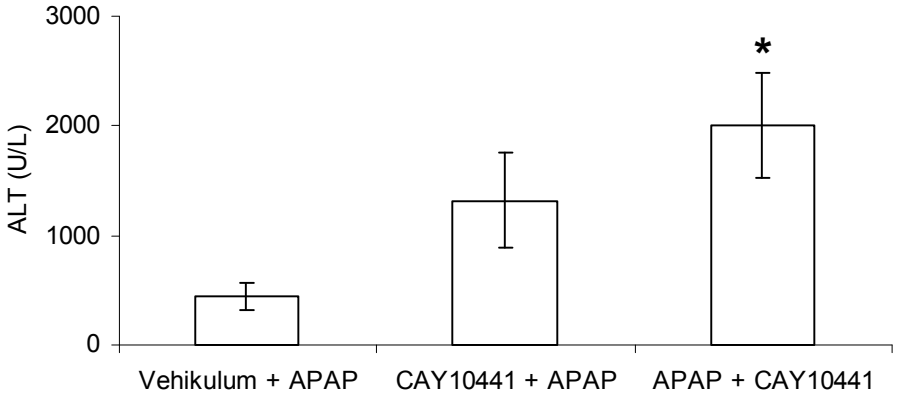
4.2.4. Histopatološke promjene u jetri miševa tretiranih s PGI_2 i CAY10441

PGI_2 je, iako ne statistički značajno, smanjio broj i veličinu nekrotičnih područja u odnosu na kontrolnu skupinu, što se moglo vidjeti makroskopskim pregledom i histološkom analizom jetrenog tkiva. Makroskopska i mikroskopska oštećenja jetrenog parenhima su bila izrazitija u miševa tretiranih s CAY10441 u odnosu na kontrolnu skupinu, ali razlika nije bila statistički značajna (Tablica 3).

A

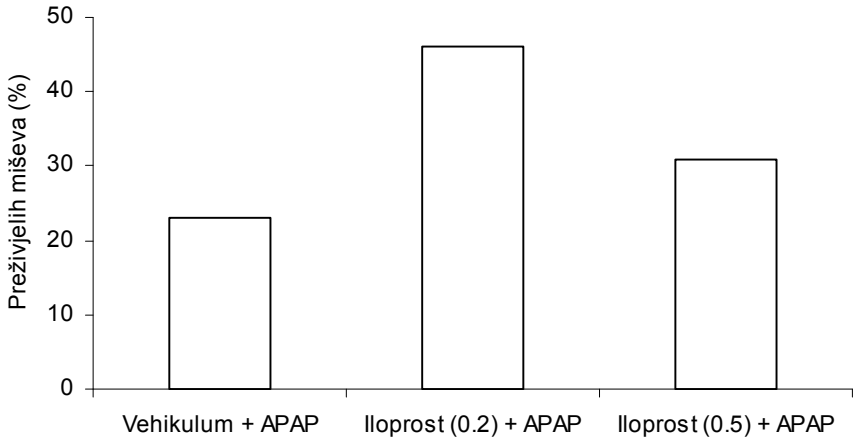


B

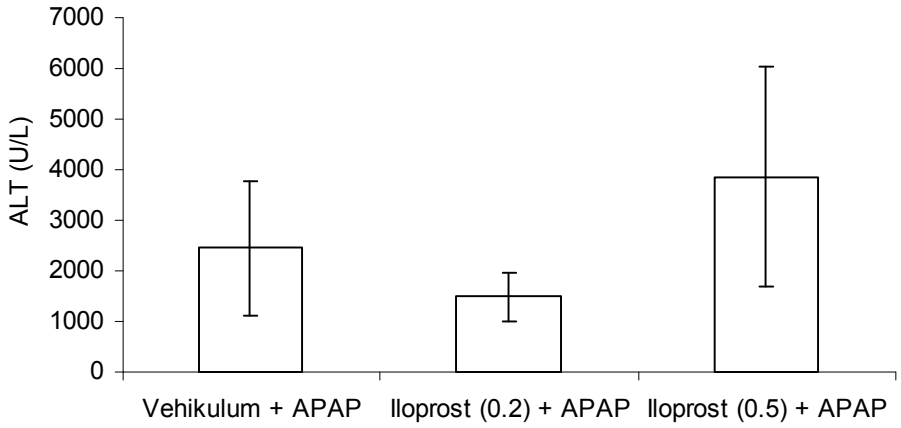


Slika 10. Učinak PGI_2 i CAY10441 na plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa s oštećenjem jetre izazvanim primjenom APAP-a. APAP (200 mg/kg) je primijenjen *per os* i koncentracija ALT-a je određena 20-22 sata nakon APAP-a. **A**. PGI_2 (10 μg/kg, i.p.) i **B**. CAY10441 (2 mg/kg, i.p.) su primijenjeni 30 min prije ili 2 sata nakon, dok je kontrolna skupina primila vehikulum 30 min prije APAP-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n=8-10 miševa po skupini. *$p<0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom, ANOVA test s naknadnom Dunnettovom multiplom usporedbom.

A



B



Slika 11. Učinak iloprosta na preživljenje i plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa intoksiciranih s APAP-om. APAP je primijenjen *per os* pomoću intragastrične sonde u dozama 300 mg/kg (praćenje preživljenja) i 200 mg/kg (određivanje koncentracije ALT-a). Iloprost (0,1 i 0,5 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 30 min prije APAP-a. **A**. Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati nakon primjene APAP-a; n=12 miševa po skupini, hi-kvadrat test. **B**. Koncentracija ALT-a je određena 20-22 sata nakon primjene APAP-a; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM; n=8-10 miševa po skupini, ANOVA test s naknadnom Dunnettovom multiplom usporedbom.

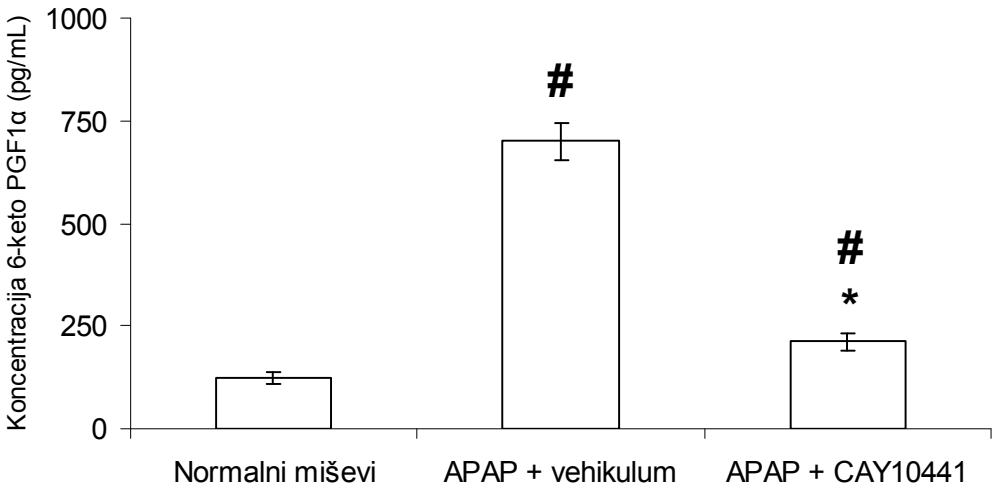
Tablica 3. Učinak PGI_2 i CAY10441 na oštećenje jetre izazvano primjenom APAP-a

	Stupanj histopatološkog oštećenja[c]						
Tretman miševa[a]	0	1	2	3	4	5	Stupanj>2[d]
Vehikulum + APAP	0	2	2	2	1	1	4/8
PGI_2 + APAP	1	3	2	1	1	0	2/8
APAP + PGI_2	1	3	1	1	1	1	3/8
	Stupanj histopatološkog oštećenja[c]						
Tretman miševa[b]	0	1	2	3	4	5	Stupanj>2[d]
APAP + vehikulum	0	2	2	1	2	1	4/8
APAP + CAY10441	0	1	1	2	2	2	6/8

[a]PGI_2 (10 μg/kg, i.p.) je primijenjen 30 min prije ili 2 sata nakon, a kontrolna skupina je primila vehikulum 30 min prije APAP-a. [b]CAY10441 (2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 2 sata nakon APAP-a. Miševi su žrtvovani i jetre uzete 20-22 sata nakon primjene APAP-a (200 mg/kg). [c]Stupanj histopatološkog oštećenja je određen na temelju intenziteta hepatocelularne nekroze kako je opisano u Materijalima i metodama. [d]Stupnjevi veći od 2 su predstavljali značajno izraženu nekrozu. n=8 miševa po skupini, hi-kvadrat test.

4.2.5. Učinak CAY10441 na stvaranje PGI_2 *ex vivo*

Stvaranje stabilnog metabolita PGI_2, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, je bilo određeno u supernatantima inkubiranih jetrenih fragmenata uzetih od normalnih (netretiranih) miševa ili miševa koji su primili APAP i 2 sata kasnije tretirani s CAY10441 (2 mg/kg, i.p.) ili vehikulumom. U usporedbi s normalnim miševima, primjena samog APAP-a (APAP + vehikulum) je značajno povećala stvaranje 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, dok je primjena CAY10441 značajno smanjila navedeno povećanje stvaranja 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (Slika 12, $p<0,05$ za obje usporedbe).



Slika 12. Učinak CAY10441 na stvaranje 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ *ex vivo*. APAP (150 mg/kg) je primijenjen *per os* pomoću intragastrične sonde, a CAY10441 (2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 2 sata nakon APAP-a. Jetreni fragmenti su priređeni 6 sati nakon primjene APAP-a. Koncentracija 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ je određena u supernatantima prethodno inkubiranih (1 sat) jetrenih fragmenata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n=6 miševa po skupini. $^{\#}p<0,05$ u usporedbi s normalnim miševima; $^{*}p<0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom (APAP + vehikulum), test ANOVA s naknadnom Bonferronijevom multiplom usporedbom.

4.3. Istraživanje učinaka TxA_2

4.3.1. Učinak TxB_2 i anti-TxB_2 na preživljenje i plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa intoksiciranih s APAP-om

Stabilni metabolit TxA_2, TxB_2 (2 mg/kg, i.p.), je primijenjen 30 min prije, a anti- TxB_2 protutijela (anti-TxB_2) 3 sata prije intragastrične primjene APAP-a: 300 mg/kg za praćenje preživljenja životinja i 150 mg/kg za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a. Kontrolna skupina je primila vehikulum 30 min prije APAP-a. Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati, a koncentracija ALT-a je određena 20-22 sata nakon primjene APAP-a. Primjenom anti-

TxB_2 statistički se značajno povećalo preživljenje životinja odnosno smanjio porast ALT-a u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$), dok TxB_2 nije pokazao značajan učinak na oba parametra (Slika 13A i B).

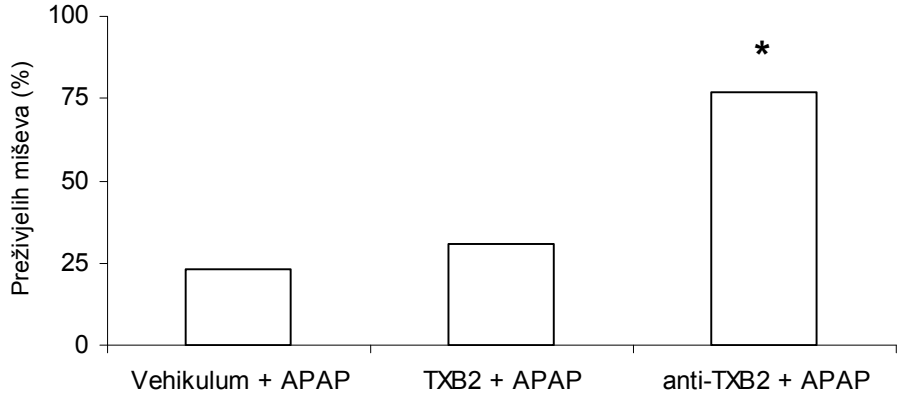
4.3.2. Učinak U-46619 na preživljenje miševa i plazmatsku koncentraciju ALT-a

Stabilni agonist TP-receptora, U-46619 (0,2 i 0,8 mg/kg, i.v.), i vehikulum su primijenjeni 30 min prije intragastrične primjene APAP-a: 300 mg/kg za praćenje preživljenja životinja i 150 mg/kg za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a. Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati, a koncentracija ALT-a određena 20-22 sata nakon primjene APAP-a. U-46619, primijenjen u obje doze, nije imao učinka na preživljenje i plazmatsku koncentraciju ALT-a tretiranih životinja (Slika 14A i B, $p>0,05$ za obje usporedbe).

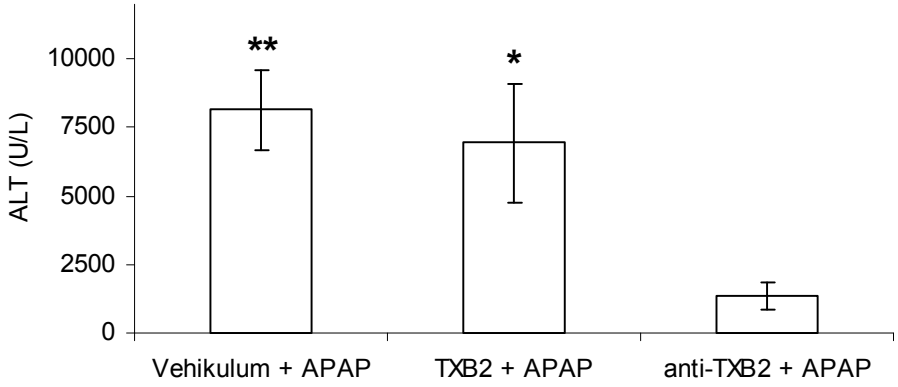
4.3.3. Učinak BZI na preživljenje miševa i plazmatsku koncentraciju ALT-a

Kemijski antagonist TxA_2-sintaze, BZI (50 mg/kg, i.p.), i vehikulum su primijenjeni 2 sata nakon intragastrične primjene APAP-a: 350 mg/kg za praćenje preživljenja životinja i 200 mg/kg za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a. Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati, a koncentracija ALT-a određena 20-22 sata nakon primjene APAP-a. BZI je značajno povećao preživljenje odnosno smanjio porast plazmatske koncentracije ALT-a tretiranih životinja (Slika 15A i B, $p<0,05$ za obje usporedbe).

A

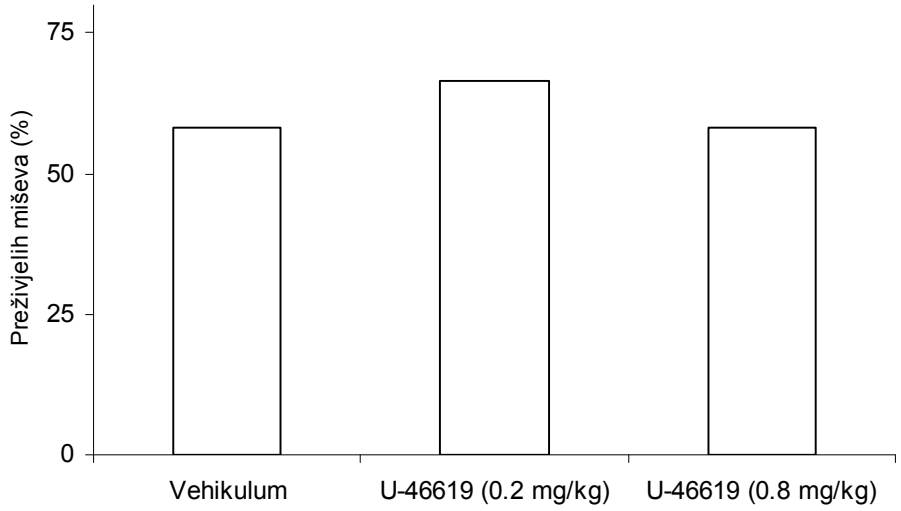


B

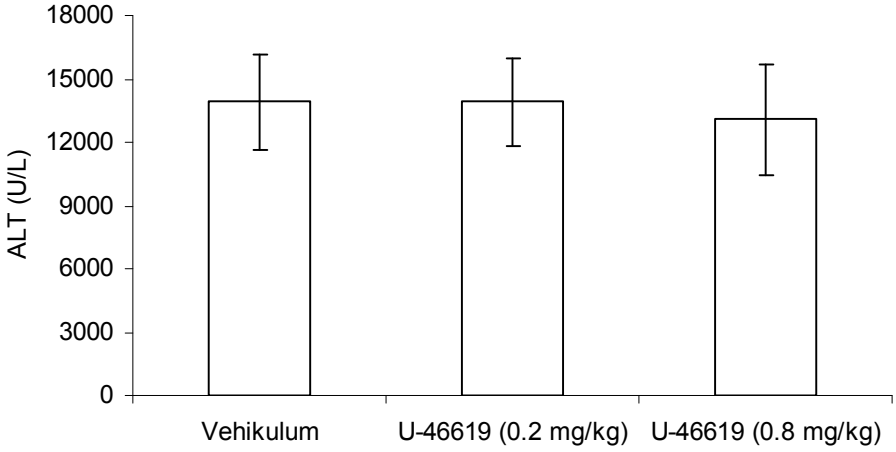


Slika 13. Učinak TxB_2 i anti-TxB_2 na preživljenje i plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa intoksiciranih s APAP-om. **A.** Za praćenje preživljenja miševa (tijekom 48 sati nakon primjene APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 300 mg/kg; n=13 miševa po skupini; *p<0,05 u usporedbi s kontrolnom skupinom (vehikulum + APAP), hi-kvadrat test. **B.** Za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a (20-22 sata nakon APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 150 mg/kg; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM; n=10 miševa po skupini, test ANOVA s naknadnom Bonferronijevom multiplom usporedbom; **p<0,01 i * p<0,05 u usporedbi sa skupinom tretiranom s anti-TxB_2. **A.** i **B.** TxB_2 (2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 30 min, a anti-TxB_2 (40 μg/kg, i.p.) 3 sata prije APAP-a.

A

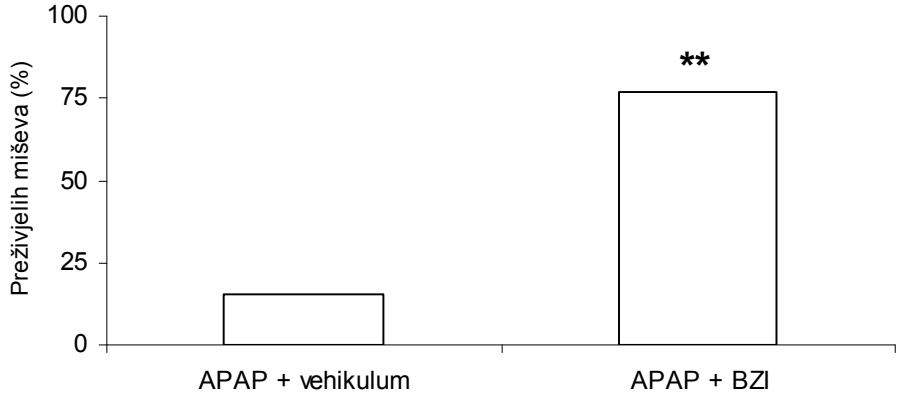


B

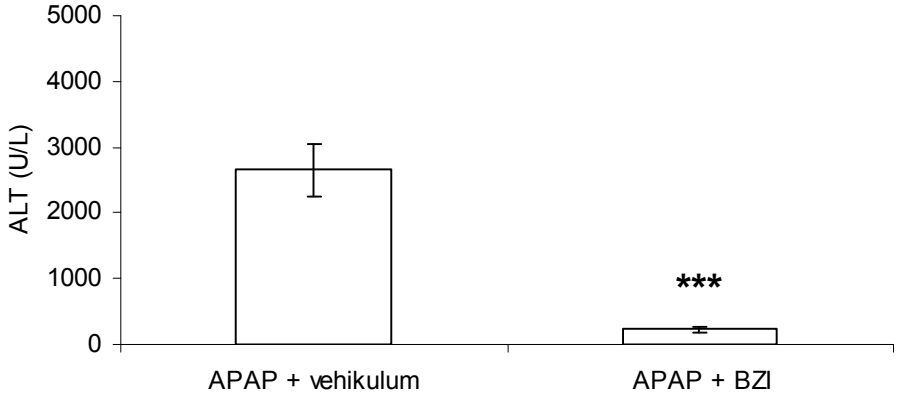


Slika 14. Učinak U-46619 na preživljenje i plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa intoksiciranih s APAP-om. **A.** Za praćenje preživljenja (tijekom 48 sati od primjene APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 300 mg/kg; n=12 miševa po skupini, hi-kvadrat test. **B.** Za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a (20-22 sata nakon APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 150 mg/kg; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM; n=8 miševa po skupini, test ANOVA s naknadnom Dunnettovom multiplom usporedbom. **A.** i **B.** U-46619 i vehikulum su primijenjeni 30 min prije APAP-a.

A



B



Slika 15. Učinak BZI na preživljenje i plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa intoksiciranih s APAP-om. **A.** Za praćenje preživljenja (tijekom 48 sati od primjene APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 350 mg/kg; n=13 miševa po skupini, hi-kvadrat test. **B.** Za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a (20-22 sata nakon APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 200 mg/kg; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM; n=10 miševa po skupini, Studentov t-test. **A.** i **B.** BZI (50 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 2 sata nakon APAP-a; **p<0,01 i *** p<0,001 u usporedbi s kontrolnom skupinom.

4.3.4. Učinak daltrobana na preživljenje miševa i plazmatsku koncentraciju ALT-a

Kemijski antagonist TP-receptora, daltroban (5 mg/kg, i.p.), i vehikulum su primijenjeni 30 min prije intragastrične primjene APAP-a: 300 mg/kg za praćenje preživljenja životinja i 150 mg/kg za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a. Preživljenje životinja je praćeno tijekom 48 sati, a koncentracija ALT-a određena 20-22 sata nakon primjene APAP-a. Daltroban nije imao značajan učinak na preživljenje odnosno porast plazmatske koncentracije ALT-a tretiranih životinja (Slika 16A i B, $p>0,05$ za obje usporedbe).

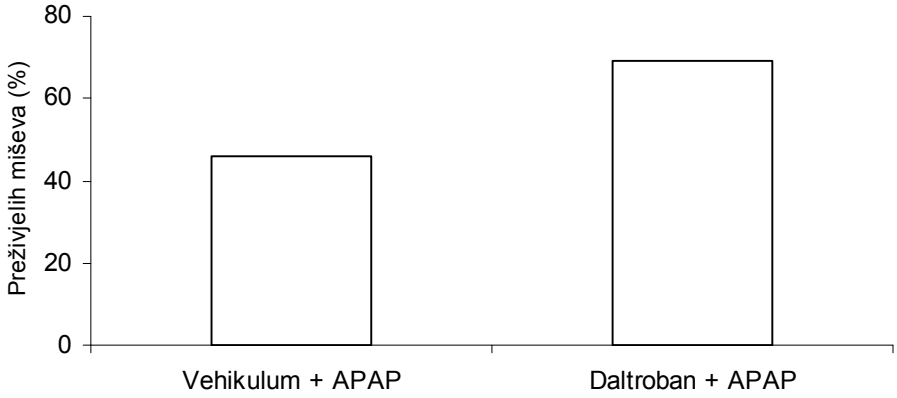
4.3.5. Histopatološke promjene u jetri miševa tretiranih s TxB_2, anti-TxB_2 i BZI

Anti-TxB_2 i BZI su značajno smanjili broj i veličinu nekrotičnih područja što se moglo vidjeti makroskopskim pregledom i histološkom analizom jetrenog tkiva. Međutim, suprotno očekivanom, makroskopska i mikroskopska oštećenja jetrenog parenhima nisu bila izrazitija u miševa tretiranih s TxB_2 u usporedbi s miševima koji su dobili vehikulum (Tablica 4).

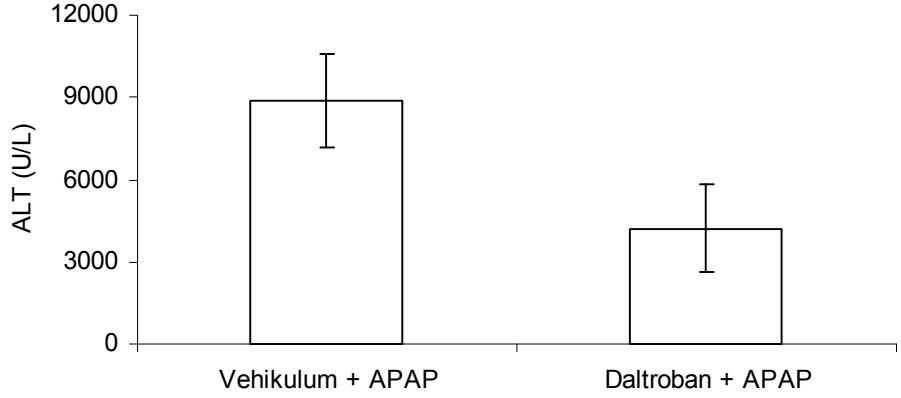
4.3.6. Učinak anti-TXB_2 na stvaranje TxB_2 *ex vivo*

Stvaranje TxB_2 je bilo određeno u supernatantima inkubiranih jetrenih fragmenata i plazmi uzetih od normalnih miševa ili miševa koji su tretirani s anti-TxB_2 (40 µg/kg, i.p.) i vehikulumom 3 sata prije primjene APAP-a (150 mg/kg). U usporedbi s normalnim miševima, primjena samog APAP-a (vehikulum + APAP) je značajno povećala stvaranje TxB_2 u supernatantima jetrenih fragmenata, dok je primjena anti-TxB_2 značajno smanjila navedeno povećanje razine TxB_2 (Slika 17, $p<0,05$ za obje usporedbe). U usporedbi s normalnim miševima, primjena APAP-a je značajno povećala stvaranje TxB_2 u plazmi (Slika 17, $p<0,05$), dok je primjena anti-TxB_2 smanjila navedeno povećanje razine TxB_2, ali bez statističke značajnosti (Slika 17, $p>0,05$).

A



B

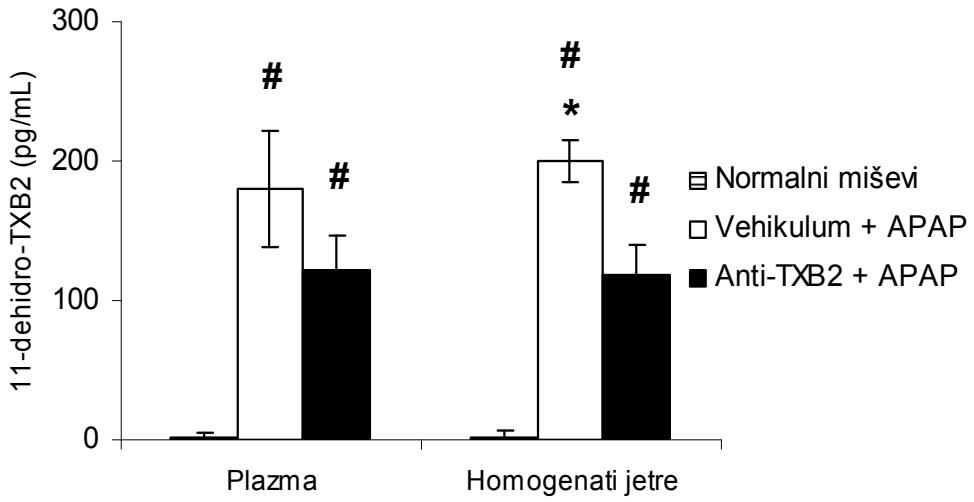


Slika 16. Učinak daltrobana na preživljenje i plazmatsku koncentraciju ALT-a u miševa intoksiciranih s APAP-om. **A.** Za praćenje preživljenja (tijekom 48 sati od primjene APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 300 mg/kg; n=12 miševa po skupini, hi-kvadrat test. **B.** Za određivanje plazmatske koncentracije ALT-a (20-22 sata nakon APAP-a), APAP je primijenjen u dozi 150 mg/kg; rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM; n=8 miševa po skupini, Studentov t-test. **A.** i **B.** Daltroban (5 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 30 min prije APAP-a.

Tablica 4. Učinak TxB_2, anti-TxB_2 i BZI na oštećenje jetre izazvano primjenom APAP-a

	Stupanj histopatološkog oštećenja[b]						
Tretman miševa[a]	0	1	2	3	4	5	Stupanj>2[c]
Vehikulum + APAP	0	2	1	1	3	1	5/8
TxB_2 + APAP	0	2	2	2	2	0	4/8
Anti-TxB_2 + APAP	2	3	2	0	1	0	1/8*
APAP + BZI	1	3	1	1	1	1	3/8

[a]TxB_2 (2 mg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 30 min, a anti-TxB_2 (40 μg/kg, i.p.) 3 sata prije APAP-a. BZI (50 mg/kg, i.p.) je primijenjen 2 sata nakon APAP-a. Miševi su žrtvovani i jetre su uzete 20-22 sata nakon primjene APAP-a (200 mg/kg). [b]Stupanj histopatološkog oštećenja je određen na temelju intenziteta hepatocelularne nekroze kako je opisano u Materijalima i metodama. [c]Stupnjevi veći od 2 su predstavljali značajno izraženu nekrozu. n=8 miševa po skupini. *$p<0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom (vehikulum + APAP), hi-kvadrat test.



Slika 17. Učinak anti-TxB_2 na stvaranje TxB_2 *ex vivo*. APAP (150 mg/kg) je primijenjen *per os* pomoću intragastrične sonde, a anti-TxB_2 (40 µg/kg, i.p.) i vehikulum su primijenjeni 3 sata prije davanja APAP-a. Uzorci plazme i jetreni fragmenti su priređeni 6 sati nakon primjene APAP-a. Koncentracija TxB_2 je određena u plazmi i supernatantima prethodno inkubiranih (1 sat) jetrenih fragmenata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n=6 miševa po skupini. $^{\#}p<0,05$ u usporedbi s normalnim miševima; $*p<0,05$ u usporedbi s miševima kojima je uštrcan anti-TxB_2, test ANOVA s naknadnom Bonferronijevom multiplom usporedbom.

5. RASPRAVA

Budući da je intoksikacija s APAP-om jedan od glavnih uzroka akutnog zatajenja jetre u zapadnom dijelu svijeta (80, 81), rabljena je kao model akutnog oštećenja jetre u kojem su se ispitivali učinci PGE_2, PGI_2 i TxA_2 i njihovih derivata na mehanizme hepatotoksičnosti uzrokovane ksenobioticima.

Iako je protektivni učinak PGE_2 i njegovih stabilnih analoga dokazan u raznim modelima akutnog oštećenja jetre, osobito u onima koji su posredovani reakcijama imunološkog sustava (97, 103, 119), u modelu akutnog oštećenja jetre potaknutog APAP-om ta je protekcija dokazana samo neizravno. Pokazano je da nedostatno stvaranje PGE_2 u miševa s izbačenim genom za COX-2 ($COX2^{-/+}$ i $COX2^{-/-}$ "knock out") te njena inhibicija selektivnim inhibitorom COX-2, celecoxibom, povećavaju hepatotoksični učinak APAP-a (101). Naša prijašnja istraživanja su pokazala da je protektivni učinak PGE_2 i IL-1α u oštećenju jetre potaknutog APAP-om dokinut primjenom anti-PGE_2 protutijela (105). Ti rezultati pokazuju kako je endogena sinteza PGE_2 važna u protekciji jetre od oštećenja uzrokovanog ksenobioticima. Naši rezultati jasno pokazuju da je PGE_2 povećao preživljenje životinja, napose kad je bio primijenjen prije APAP-a. Također, PGE_2 je ublažio oštećenje jetre što se očitovalo u smanjenju porasta plazmatske koncentracije ALT-a i smanjenju stupnja histopatološkog oštećenja jetre. Ovi rezultati su u skladu s prijašnjim nalazima, opisanim od drugih autora, koji su pokazali protektivni učinak PGE_2 u akutnom oštećenju jetre uzrokovanom drugim hepatotoksičnim agensima (etanol, CCl4, aflatoksin, Con A, DGalN, LPS sam ili u kombinaciji s DGalN) (97, 103). Zaštitni učinak dm-PGE_2 nije posljedica interferencije s apsorpcijom APAP-a iz crijeva jer dm-PGE_2 ima zaštitni učinak i kad se APAP uštrca miševima i.p. (neobjavljeni rezultati). Također, pokazano je da PGE_2 ne interferira s metabolizmom APAP-a u jetri (120). To isto potvrđuju rezultati naših istraživanja u kojima smo pokazali da je dm-PGE_2 bio protektivan kad se primijenio 2 sata nakon APAP-a, tj. u vrijeme kad je metabolička pretvorba PGE_2 uvelike dovršena.

CAY10526, selektivni antagonist mikrosomalne PGE-sintaze 1 (mPGES-1), povećava toksični učinak APAP-a, što se očitovalo u povećanju smrtnosti miševa, plazmatske vrijednosti ALT-a i histopatoloških promjena u jetri miševa. Prema dostupnoj literaturi, ovo je prvi put da je CAY10526 bio upotrijebljen u modelu akutnog oštećenja jetre ksenobioticima *in vivo*. Mehanizam njegovog toksičnog djelovanja na jetru vjerojatno je posredovan inhibicijom sinteze

PGE_2, budući da je u velikoj mjeri spriječio stvaranje PGE_2 *ex vivo* u jetrenim fragmentima i pokazao najjači učinak kad je bio primijenjen 2 sata nakon APAP-a. Ovo neizravno pokazuje da je PGE_2 endogeni hepatoprotektivni agens, što se potvrdilo i u našim preliminarnim istraživanjima u kojima je pokazano da sama primjena APAP-a povećava sintezu endogenih PGE_2 i PGI_2 u jetri (rezultati nisu prikazani). Ovo, na prvi pogled neobično, povećanje sinteze navedenih PG rezultat je povećanog izražaja i stvaranja enzima COX-2 u jetri miševa intoksiciranih s APAP-om (101). Precizan slijed događanja kojima APAP dovodi do pojačanog izražaja COX-2 još je uvijek predmet rasprave, ali se smatra da je to dio endogenog zaštitničkog odgovora organizma na štetno djelovanje ksenobiotika (101). Zna se da je uloga tako nastalog enzima COX-2 složena i ovisna o vrsti toksičnog agensa; naime, u miševa $COX^{-/-}$, u usporedbi s kontrolnim divljim sojem životinja ($COX^{+/+}$), LPS je pokazao manji toksični učinak na jetru (121). Razlog tomu najvjerojatnije leži u različitim molekularnim mehanizmima putem kojih ksenobiotici uzrokuju oštećenje jetre. Mogućnost da PGE_2 ili PGI_2 djeluju kao endogeni hepatoprotektivni agensi bit će predmetom naših budućih, podrobnijih istraživanja.

Pokazalo se da primjena APAP-a u miševa uzrokuje veću aktivaciju NF-κB u jetrenim stanicama u usporedbi s kontrolnim životinjama. To potvrđuju i druga istraživanja u kojima je pokazano da je oštećenje jetre potaknuto APAP-om posredovano oksidativnim stresom i ovisno, barem dijelom, o NF-κB (51, 89). Imunohistokemijsko i imunofluorescencijsko ispitivanje je potvrdilo da primjena PGE_2 u značajnoj mjeri smanjuje aktivaciju i posljedičnu translokaciju NF-κB iz citoplazme u jezgru hepatocita izazvanu s APAP-om, dok je CAY10526 pokazao uglavnom suprotan učinak. U drugom animalnom modelu je pokazano kako selektivni agonist EP4-receptora smanjuje stvaranje proupalnih citokina, kemokina, adhezijskih molekula i aktivaciju NF-κB (108). U kulturi jetrenih makrofaga (Kupfferove stanice) štakora tretiranoj s LPS-om, PGE_2 je smanjio stvaranje TNF-α putem smanjenja aktivacije NF-κB (106). Aktivacija NF-κB povećava izražaj gena odgovornih za regulaciju sinteze proupalnih medijatora, uključujući iNOS, TNFα, IL-1, IL-10 i COX-2, a svaki od njih je uključen u oštećenje jetre potaknuto APAP-om (51). Iako još uvijek nije posve jasno ima li NF-κB protektivnu ili patogenetsku ulogu u oštećenju jetre potaknutom APAP-om, naši rezultati pokazuju da bi protektivni učinak PGE_2 mogao biti posredovan inhibicijom aktivacije NF-κB.

Također, opazili smo da primjena APAP-a znatno povećava postotak jetrenih stanica pozitivnih na iNOS te da primjena PGE_2 značajno smanjuje taj postotak i stvaranje NO, što se

očituje u sniženoj (iako ne statistički značajno) koncentraciji nitrita i nitrata u plazmi. CAY10526 je imao blago izražen suprotan učinak na izražaj iNOS-a i stvaranje NO. Ti nalazi su u skladu s drugim istraživanjima u kojima je pokazano značajno povećanje stvaranja NO u oštećenju jetre uzrokovanom s APAP-om (93, 122), što govori u prilog tomu da povećana sinteza iNOS-a ima patogenetsku ulogu u ovom modelu. Ipak, podatci u literaturi su krajnje oprječni u pogledu uloge iNOS-a u oštećenju jetre potaknutom s APAP-om, tj. da li je ona protektivna (potiče regeneraciju jetre) ili destruktivna (patogenetska, toksična) (92, 98, 123). Slično je pokazano i u drugim animalnim modelima akutnog oštećenja jetre (CCl4, Con A, imuni hepatitis i dr.) (124, 125). Objašnjenje za ove proturječne rezultate moglo bi biti u pretpostavci da iNOS ima patogenetsku, a cNOS protektivnu ulogu, ili da djelovanje NO i njegovih derivata ovisi o prisutnosti molekula na koje djeluje i težini oksidativnog oštećenja tkiva uzrokovanog superoksidnim ionima (O^{2-}) u datim okolnostima i modelu (107). Pokazano je da NO veže O^{2-} stvarajući peroksinitrit koji potom uzrokuje nitraciju proteina i oštećenje tkiva (85, 122). Usprkos njegovoj proturječnoj ulozi u hepatotoksičnosti, NO se općenito smatra proupalnim medijatorom što, barem djelomično, potvrđuju i naši rezultati.

Prikazana istraživanja jasno pokazuju da PGI_2 ima hepatoprotektivni učinak; značajno povećava preživljenje životinja kad se primjeni i prije i nakon APAP-a. Također, PGI_2 je smanjio plazmatsku razinu ALT-a, napose kad je primijenjen prije APAP-a, te histopatološke promjene u jetri, premda ovaj zadnji učinak nije bio značajan. Ovi rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima u kojima su opisani protektivni učinci PGE_2 i PGI_2 u različitim modelima akutne hepatotoksičnosti uzrokovane ksenobioticima: CCl4, etanol, aflatoksin, Con A, D-GalN, LPS sam ili u kombinaciji s D-GalN (97, 103). No, oni se razlikuju od onih koje je opisao Guarner i sur., naime, u tom eksperimentalnom modelu PGI_2 je imao hepatoprotektivni učinak samo kad je bio primijenjen 2 sata poslije APAP-a (115). U našim je istraživanjima PGI_2 pokazao protektivni učinak kad je bio primijenjen i prije i nakon APAP-a, dapače, protekcija je bila izraženija prije davanja APAP-a. Budući da su doza PGI_2 i ustroj eksperimenata bili gotovo identični, jedino objašnjenje za tu razliku je drugi soj miševa koji je korišten u navedenim istraživanjima.

Podatci u literaturi o djelovanju iloprosta na preživljenje laboratorijskih životinja u modelu hepatotoksičnosti uzrokovane APAP-om su vrlo oskudni. Većina istraživanja o učincima iloprosta u različitim modelima hepatotoksičnosti je provedena *in vitro*, tj. na kulturama jetrenih stanica (112, 113, 126). Na temelju toga, pretpostavili smo da će iloprost, stabilni analog PGI_2,

pokazati snažan protektivan učinak u našim eksperimentima. Ipak, iloprost (u obje doze: 0,1 mg/kg i 0,5 mg/kg) nije značajno povećao preživljenje životinja odnosno smanjio razinu ALT-a u plazmi miševa tretiranih APAP-om. Mogući razlog tom slabom učinku mogao bi biti u činjenici da je iloprost primijenjen u pojedinačnoj i možda prevelikoj dozi. Bursch i sur. su pokazali da je iloprost imao protektivan učinak u kulturi hepatocita štakora u vrlo uskom rasponu doza (10^{-9}-10^{-12}M) i u većini istraživanja *in vivo* bio je davan životinjama u obliku trajne i.v. infuzije (0,1 µg/kg/min) (112, 113, 126). Podatci o uporabi drugih stabilnih agonista PGI_2 (beraprost, cikaprost) u eksperimentalnim modelima su također vrlo oskudni.

CAY10441 je jedan od najpotentnijih visokoafinitetnih liganada i funkcionalnih antagonista IP-receptora. U našim istraživanjima je pokazao hepatotoksični učinak što se očitovalo u povećanju smrtnosti životinja, plazmatske koncentracije ALT-a i histopatoloških promjena u jetri. Prema podatcima dostupnim u literaturi, ovo je prvi put da je CAY10441 upotrijebljen u *in vivo* modelu akutne hepatotoksičnosti uzrokovane APAP-om ili nekim drugim toksičnim agensom. Mehanizam njegovog hepatotoksičnog djelovanja vjerojatno je posredovan blokadom IP-receptora jer je najjači učinak imao kad je bio primijenjen 2 sata nakon APAP-a; ovo neizravno pokazuje da je PGI_2 endogeni hepatoprotektivni agens. To je potvrdilo i naše ranije istraživanje u kojem je pokazano da sama primjena APAP-a značajno povećava sintezu PGI_2 u jetri tretiranih životinja.

U literaturi se navodi kako je TxB_2 biološki inaktivni metabolit TxA_2 (16), no postoje istraživanja u kojima je dokazana biološka aktivnost TxB_2 (127, 128). Osim toga, TxA_2 je izrazito nestabilan spoj ($t_{1/2}$ oko 30 s) koji se spontano hidrolizira u TxB_2 ($t_{1/2}$ iznosi 5-7 min). Oslanjajući se na te činjenice, po prvi puta je istraživan učinak TxB_2 i anti-TxB_2 u modelu akutne hepatotoksičnosti uzrokovane APAP-om. Primjena anti-TxB_2 je imala snažan hepatoprotektivni učinak što se očitovalo u značajno većem preživljenju odnosno smanjenju plazmatske koncentracije ALT-a i histopatoloških promjena u jetri tretiranih miševa. Također, primjena anti-TxB_2 je značajno smanjila stvaranje TxB_2 u kratkotrajnoj kulturi fragmenata jetre, dok u plazmi to smanjenje nije bilo značajno. Nasuprot tome, TxB_2 nije imao očekivani učinak *in vivo*, dapače, pokazao je blago hepatoprotektivno djelovanje. Ovaj neočekivani učinak TxB_2 možda bi se mogao objasniti činjenicom da je TxB_2 bio otopljen u dimetilsulfoksidu (DMSO), a sam DMSO je vrlo hepatoprotektivan (i u količini manjoj od one primijenjene u našem pokusu) u miševa intoksiciranih s APAP-om (Kelava i sur., poslano za tisak). Nadalje, u testu agregacije trombocita

TxB_2 nije uzrokovao očekivanu agregaciju (naši neobjavljeni rezulati). Iz svega navedenog može se zaključiti kako je TxB_2 biološki inaktivan spoj te da anti-TxB_2 svoj učinak najvjerojatnije ostvaruju križnom reaktivnošću s TxA_2. Na taj način smo neizravno ustanovili da TxA_2 ima patogenetski učinak u ovom modelu. Primjenom kemijskih antagonista TxA_2-sintaze (OKY-046) i TP-receptora (ONO-3708), u drugim animalnim modelima akutne hepatotoksičnosti (CCl4, LPS, imuni hepatitis) dobiveni su rezultati koji upućuju na štetni učinak TxA_2. Navedeni agensi su, uz smanjenje razine ALT-a i AST-a u plazmi i patohistoloških promjena u jetri, smanjili stvaranje TxB_2 *ex vivo* u homogenatima jetre tretiranih životinja (114). Također, u modelu akutnog hepatitisa potaknutog visokom dozom APAP-a pokazano je da je primjena inhibitora TxA_2-sintaze, OKY-1581, u značajnoj mjeri smanjila stvaranje TxA_2 *ex vivo*, ali ta inhibicija *per se* nije bila dovoljna za hepatoprotektivni učinak. Inhibicijom TxA_2-sintaze dolazi do preusmjeravanja sinteze PG u korist PGI_2 za kojeg se smatra da djeluje citoprotektivno (115).

U-46619 je stabilni agonist TP-receptora i njegova i.v. primjena se često koristi kao model za izazivanje iznenadne smrti u laboratorijskih životinja. U ovom modelu njegova primjena (u dozama 0,2 i 0,8 mg/kg) nije dovela do smanjenja preživljenja životinja odnosno povećanja plazmatske razine ALT-a. Mogući uzrok njegove nedjelotvornosti mogao bi biti u činjenici što su se u većini slučajeva u istraživanjima *in vivo*, pri sličnim dozama U-46619, koristili drugi mišji sojevi (114). Kemijski antagonist TP-receptora, daltroban, je pokazao hepatoprotektivni učinak tako što je povećao preživljenje miševa i smanjio porast ALT-a u plazmi, iako bez statističke značajnosti. Prema dostupnoj literaturi, ovo je prvi put da je daltroban bio upotrijebljen u modelu oštećenja jetre uzrokovanog toksičnim agensima *in vivo*. U drugim eksperimentalnim modelima, daltroban je, pri sličnim dozama, snažno neutralizirao porast vazokonstriktornog tonusa i arterijskog tlaka izazvanih s TxA_2 (129). Protektivni učinak daltrobana vjerojatno je posredovan kemijskim blokiranjem TP-receptora čime je onemogućeno djelovanje TxA_2, a to je istovjetno učinku postignutom uporabom prije spomenutih antagonista TP-receptora.

BZI, selektivni inhibitor TxA_2-sintaze, pokazao je snažan hepatoprotektivni učinak u modelu akutne hepatotoksičnosti potaknute APAP-om što se odrazilo na svim istraživanim parametrima oštećenja jetre. Naime, Guarner i sur. su u istom modelu ispitivali njegov učinak i utvrdili da je BZI (20 mg/kg, i.p.) hepatoprotektivan samo kad je bio primijenjen 30 min prije APAP-a. Isti autori su pokazali da BZI interferira s metabolizmom APAP-a i da je to isključivi razlog njegovog protektivnog djelovanja (115). Zbog toga smo u našim istraživanjima primijenili

BZI (50 mg/kg, i.p.) 2 sata nakon APAP-a, a razlog njegovog hepatoprotektivnog učinka vjerojatno leži u činjenici da primjena BZI u tako visokoj dozi u znatnoj mjeri sprječava stvaranje TxB_2.

Zna se da su u modelu akutnog toksičnog oštećenja jetre uzrokovanog ksenobioticima Kupfferove stanice i privučene ekstrahepatične upalne stanice glavno mjesto stvaranja endogenih prostanoida (57, 97, 116). Iako COX-1 i COX-2 igraju važnu ulogu u upalnim procesima, u načelu COX-1 je konstitutivno izražena u većini stanica i odgovorna za fiziološko stvaranje PG, dok je COX-2 inducibilna i njen, inače vrlo nizak, izražaj se drastično povećava nakon nekog upalnog podražaja. Pokazano je da primjena jednokratne visoke doze APAP-a i ConA u miševa $COX\text{-}2^{-/-}$ i miševa u kojih je COX-2 selektivno inhibirana lijekom celecoxibom uzrokuju značajno veće oštećenje jetre (veća smrtnost životinja, povišene jetrene transaminaze i patohistološko oštećenje jetre) u usporedbi s netretiranim divljim sojem miševa. U istih životinja je koncentracija endogeno stvorenih PGE_2, PGI_2 i PGD_2 u plazmi i homogenatima jetre bila značajno snižena. To neizravno govori u prilog endogeno stvorenim PG kao mogućim hepatoprotektivnim medijatorima (101, 103). Doista, u modelima hepatotoksičnosti *in vivo*, potaknutim ConA ili ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom, primjena stabilnih analoga PGI_2 (beraprosta) i PGE_2 (misoprostola) je imala snažan protektivni učinak (103, 130).

Naša istraživanja su pokazala da PGI_2 i PGE_2 štite jetru od toksičnog djelovanja APAP-a, a da njegova primjena dovodi do značajno povećanog stvaranja PGI_2 i PGE_2 u supernatantima fragmenata jetre tretiranih životinja (*ex vivo*). Drugi autori su pokazali da primjena stabilnih agonista PGE_2 i PGI_2 ima protektivni učinak u različitim modelima akutne hepatotoksičnosti (etanol, CCl4, aflatoksin, Con A, DGalN, LPS) ili toksičnosti za druga tkiva *in vitro* i *in vivo* (97, 103) pa se za ove agense često navodi da djeluju citoprotektivno. Mehanizmi te protekcije nisu do kraja jasni i postoji više mogućih mehanizama. Tako je za PGE_2 i PGI_2 pokazano da *in vitro* i *in vivo* smanjuju stvaranje TNF-α i IFN-γ u jetrenim leukocitima, NK-stanicama i limfocitima T miševa intoksiciranih s ConA (103). Kontrolom aktivacije NF-κB, PGE_2 regulira sintezu upalnih hepatotoksičnih citokina i oksidativnih radikala (51, 106-108), regulira aktivaciju iNOS-a (57, 107), stimulira sintezu supresivnog citokina IL-10 (109), endogenih antioksidansa (110) i cAMP-a koji ima imunosupresivni, protuupalni i antiapoptotski učinak (111, 131). Pokusi *in vitro* su pokazali da cAMP, kao i PGE_2, inhibira oslobađanje potencijalno hepatotoksičnih, proupalnih medijatora: TNF-α, IL-1 i IFN-γ (132, 133). Za PGI_2 je pokazano da *in vitro*, osim što povećava

unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a, izravno štiti jetrene stanice od nekroze, vjerojatno stabilizacijom stanične membrane ili inhibicijom otpuštanja lizosomalnih enzima (113). Ima li PGI_2 takav učinak *in vivo*, još uvijek nije poznato. Sljedeća mogućnost je da PGI_2, putem inhibicije agregacije trombocita i vazodilatacije, smanjuje vaskularnu kongestiju, povećava protok krvi i dopremu kisika hepatocitima, čineći ih tako otpornijima na štetno djelovanje ksenobiotika (115). Neizravno je pokazano da endogeno stvoreni produkti COX-2 potiču izražaj proteina toplinskog šoka (HSP), a njihov izražaj izrazito je smanjen u miševa COX-$2^{-/-}$. HSP imaju važnu ulogu u staničnom signaliziranju (inaktivacija NF-κB) te djeluju hepatoprotektivno i antiapoptotski (101, 102). Ostali, potencijalno važni, mehanizmi uključuju kontrolu signalnih puteva posredovanih PPAR-om za koje PG služe kao endogeni ligandi (protuupalni učinak u jetri), inhibiciju senzibilizacije i funkcije limfocita T posredovanu s PG i pojačavanje antiapoptotskog učinka u Kupfferovim stanicama (101, 134, 135). TxA_2 je potentan stimulator agregacije trombocita i ima izuzetno snažan vazokonstrikcijski učinak što je pokazano u različitim modelima *in vitro* i *in vivo*. Uključen je u patogenezu ulkusne bolesti želuca i smatra se da bi mogao imati sličan patogenetski učinak u mehanizmu nastanka toksičnog hepatitisa (3, 136).

U konačnici, naša istraživanja pokazuju da egzogeno primijenjeni ili endogeno stvoreni PGE_2 i PGI_2 djeluju hepatoprotektivno i da su uključeni u obranu organizma od štetnog djelovanja ksenobiotika, dok bi TxA_2 mogao imati hepatotoksični učinak. Oslanjajući se na naše rezultate, protektivni učinak PGE_2 je posredovan, barem djelimično, smanjenom aktivacijom i izražajem NF-κB i iNOS-a. Iz svega navedenog, vidljivo je da su molekularni mehanizmi te protekcije ili toksičnosti prostanoida izuzetno složeni i nisu do kraja razjašnjeni te su potrebni dodatni napori u njihovom rasvjetljavanju. Unatoč brojnim istraživanjima koja idu u tom smjeru, N-acetilcistein (NAC) još uvijek ostaje jedini antidot u kliničkoj praksi u slučaju predoziranja APAP-om. Naši rezultati sugeriraju da bi PGE_2 i PGI_2 mogli imati veliki terapijski potencijal u liječenju bolesnika s toksičnim hepatitisom.

6. ZAKLJUČCI

1. Dm-PGE_2 (0,2 mg/kg, i.p.), primijenjen 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a, je imao snažan hepatoprotektivni učinak: značajno je povećao preživljenje životinja te smanjio porast plazmatske koncentracije ALT-a i stupanj patohistoloških promjena u jetri. Kemijski antagonist mikrosomalne PGE-sintaze 1, CAY10526 (2 mg/kg, i.p.), je pokazao uglavnom suprotan učinak.

2. Imunohistokemijska i imunofluorescencijska analiza jetrenih rezova su pokazale da primjena APAP-a u znatnoj mjeri povećava aktivaciju i translokaciju NF-κB iz citoplazme u jezgru, kao i izražaj iNOS-a u citoplazmi jetrenih stanica. Isto tako, APAP je značajno povećao koncentraciju nitrita/nitrata u plazmi. Primjena dm-PGE_2 je značajno smanjila translokaciju NF-κB u jezgru odnosno izražaj iNOS-a u citoplazmi hepatocita. CAY10526 nije značajno utjecao na ove parametre. Dm-PGE_2 i CAY10526 nisu značajno mijenjali koncentraciju nitrita/nitrata u plazmi.

3. PGI_2 (10 μg/kg, i.p.) je, kao i PGE_2, pokazao hepatoprotektivni učinak. Značajno je povećao preživljenje životinja (30 min prije i 2 sata nakon APAP-a) i smanjio porast ALT-a u plazmi (30 min prije APAP-a), dok je na smanjenje histopatoloških promjena u jetri imao blagi učinak. Kemijski blokator IP-receptora, CAY10441 (2 mg/kg, i.p.), je imao uglavnom suprotan učinak.

4. Stabilni agonist IP-receptora, iloprost (0,1 i 0,5 mg/kg, i.p.), je imao blagi hepatoprotektivni učinak: 8 i 23%-tno povećanje u broju preživjelih životinja i 20%-tno smanjenje porasta ALT-a u plazmi.

5. Primjena anti-TxB_2 (40 μg/kg, i.p.) je značajno smanjila smrtnost, porast plazmatske koncentracije ALT-a i stupanj histopatoloških promjena u jetri miševa tretiranih visokom dozom APAP-a. TxB_2 (2 mg/kg, i.p.) i stabilni agonist TP-receptora, U-46619 (0,2 i 0,8 mg/kg, i.v.), nisu imali očekivani hepatotoksični učinak.

6. Selektivni inhibitor TxA_2-sintaze, BZI (50 mg/kg, i.p., 2 sata nakon APAP-a), je pokazao snažan protektivni učinak time što je značajno smanjio smrtnost, porast ALT-a u plazmi i izraženost histopatoloških promjena u jetri životinja tretiranih toksičnom dozom APAP-a.

Kemijski antagonist TP-receptora, daltroban (5 mg/kg, i.p., 30 min prije APAP-a), je imao sličan učinak, ali bez statističke značajnosti.

7. Primjena visoke doze APAP-a je značajno povećala stvaranje endogenih prostanoida (PGE_2, PGI_2 i TxA_2) *ex vivo*, u supernatantima kratkotrajne kulture fragmenata jetre, dok je primjena CAY10526, CAY10441 i anti-TxB_2 značajno smanjila njihovo stvaranje.

7. SAŽETAK

Prostanoidi su spojevi koji nastaju razgradnjom lipida stanične membrane te posreduju u mnogim fiziološkim i patofiziološkim zbivanjima u gotovo svim organima i tkivima u organizmu. Prostaglandin E_2 (PGE_2), kojeg sintetizira mnogo vrsta stanica, i prostaglandin I_2 (PGI_2), kojeg stvara endotel krvnih žila, imaju jak citoprotektivni i vazodilatacijski učinak u probavnom sustavu te u nekoliko drugih vrsta tkiva i stanica. Tromboksan A_2 (TxA_2), kojeg uglavnom stvaraju trombociti, je snažan induktor agregacije trombocita, ima jak vazokonstrikcijski učinak i posreduje u nastanku ulkusa u probavnom sustavu. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu PGE_2, PGI_2 i TxA_2 u obrani organizma od toksičnog učinka paracetamola (acetaminofen, APAP) čiji su predoziranje ili kronična uporaba visokih doza najčešći uzroci akutnog zatajenja jetre u zapadnom svijetu. Pokusi su bili obavljeni na visokosrodnim mišjim sojevima CBAT6/T6, C57Bl/6 i (CBAT6T6xC57Bl/6)F1 u kojih je gastričnom sondom primijenjena letalna (250-300 mg/kg) ili visoka subletalna (150-200 mg/kg) doza APAP-a. Stabilni analozi PGE_2 (dm-PGE_2, 0,2 mg/kg) i PGI_2 (iloprost, 0,2 i 0,5 mg/kg), PGI_2 (10 μg/kg), kemijski antagonisti mikrosomalne PGE-sintaze 1 (CAY10526, 2 mg/kg), IP-receptora (CAY10441, 2 mg/kg) i TP-receptora (daltroban, 5 mg/kg), TxB_2 (2 mg/kg) te inhibitor TxA_2-sintaze – benzilimidazol (BZI, 50 mg/kg) primijenjeni su intraperitonealno (i.p.) 30 min prije ili 2 sata nakon APAP-a. Anti-TxB_2 protutijela (anti-TxB_2, 40 μg/kg) su primijenjena i.p. 3 sata prije, dok je stabilni agonist TxA_2 (U-46619, 0,2 i 0,8 mg/kg) primijenjen intravenski (i.v.) 30 min prije APAP-a. Toksičnost APAP-a se određivala na temelju 48-satnog praćenja preživljenja životinja, mjerenja koncentracije alanin aminotransferaze (ALT) u plazmi i određivanja histološkog stupnja oštećenja jetre 20-22 sata nakon primjene APAP-a. Dm-PGE_2 i PGI_2 su pokazali snažan hepatoprotektivni učinak kad su bili primijenjeni 30 min prije i 2 sata nakon APAP-a. Iloprost nije pokazao značajan učinak na toksičnost APAP-a, dok su CAY10526 i CAY10441 povećali hepatotoksični učinak kad su bili primijenjeni 2 sata nakon APAP-a. Anti-TxB2 i BZI su također imali snažan hepatoprotektivni učinak, a daltroban je djelimično smanjio toksičnost APAP-a. TxB_2 i U-46619 nisu imali učinka u ovom modelu akutnog hepatitisa potaknutog APAP-om. Imunohistokemijskom i imunofluorescencijskom analizom jetrenog tkiva je pokazano da PGE_2 smanjuje aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF-κB i citoplazmatski izražaj inducibilne NO-sintaze (iNOS). Ovo istraživanje potkrjepljuje hipotezu da TxA_2 ima

patogenetski učinak, dok su PGE_2 i PGI_2 endogeni posrednici u obrani organizma od štetnog djelovanja hepatotoksičnih agenasa. Protektivno djelovanje PGE_2 je, barem dijelom, posredovano smanjenom aktivacijom NF-κB i izražajem iNOS-a. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se ustanovio precizan mehanizam na kojem se temelji citoprotektivni učinak prostaglandina u akutnom toksičnom oštećenju jetre.

Ključne riječi: prostanoidi, APAP, oštećenje jetre, NF-κB, imunohistokemija

8. THE ROLE OF PROSTANOIDS IN ACUTE ACETAMINOPHEN HEPATOTOXICITY

SUMMARY

Prostanoids are lipid compounds that mediate variety of physiological and pathological functions in almost all body tissues and organs. Prostaglandin E_2 (PGE_2), which is synthesized by many cell types, and prostaglandin I_2 (PGI_2), which is synthesized by the vascular endothelium, has a strong cytoprotective and vasodilatory effects in the gastrointestinal tract and in several other tissues and cells. Thromboxane A_2 (TxA_2) is a major product of arachidonate metabolism in platelets. It is a powerful inducer of platelet aggregation and vasoconstriction and it shows ulcerogenic activity in gastrointestinal tract. These observations prompted us to investigate whether PGE_2, PGI_2 or TxA_2 play a role in host defence to toxic effect of acetaminophen (paracetamol, APAP), which overdose or chronic use of a high dose is a major cause of acute liver failure in the western world. CBAT6T6, C57Bl/6 and (CBAT6T6xC57Bl/6)F1 satybrid mice of both sexes were intoxicated with a single lethal (250-300 mg/kg) or high sublethal (150-200 mg/kg) dose of APAP, which was administered to animals by oral gavage. Stabile analogues of PGE_2 (dm-PGE_2, 0,2 mg/kg) and PGI_2 (iloprost, 0,2 or 0,5 mg/kg), PGI_2 (10 μg/kg), inhibitors of PGE_2 production through the selective modulation of mPGES-1 expression (CAY10526, 2 mg/kg), PGI receptor (CAY10441, 2 mg/kg) and TxA receptor (daltroban, 5 mg/kg), TxB_2 (2 mg/kg) and inhibitor of TxA_2-synthase – benzyl imidazole (BZI, 50 mg/kg) were given to mice intraperitoneally (i.p.) 30 min before or 2 h after APAP administration. Anti-TxB_2 antibodies (anti-TxB_2, 40 μg/kg) were given i.p. 3 h before, while stabile analogue of TxA_2 (U-46619, 0,2 and 0,8 mg/kg) was injected into mice intravenously (i.v.) 30 min before APAP. The toxicity of APAP was determined by observing the survival of mice during 48 h, by measuring concentration of alanine-aminotransferase (ALT) in plasma 20-22 h after APAP administration and by liver histology. The results have shown that PGE_2 and PGI_2 exhibit a strong hepatoprotective effect when they are given to mice either before or after APAP, while CAY10526 and CAY10441 demonstrated mainly the opposite effect. Iloprost had no significant influence on APAP toxicity. Anti-TxB_2 and BZI were significantly hepatoprotective and daltroban showed mainly the same (but non significant) action on APAP-induced hepatotoxicity.

TxB_2 and U-46619 were ineffective in this model of acute liver injury. Immunohistochemistry and immunofluorescence to NF-κB revealed that administration of dm-PGE_2 down regulated, in a significant manner, the activation of NF-κB and its translocation from the cytoplasm to the nucleus of hepatocytes. The present results also showed that PGE_2 significantly diminished expression of iNOS in hepatocytes and reduced NO production, which was reflected by lower (albeit statistically non significant) nitrite/nitrate concentration in plasma. Our findings support the hypothesis that TxA_2 has a pathogenic role in liver toxicity induced with APAP, while PGE_2 and PGI_2 have a cytoprotective effect and are involved in the defence of the organism to noxious effects of xenobiotics on liver. According to our results, this protection is mediated, at least partially, through down regulation of NF-κB activation and iNOS expression. Therefore, further work is needed to elucidate precise mechanisms underlying cytoprotective effects of PGs in acute liver injury.

Key words: prostanoids, APAP, liver injury, NF-κB, immunohistochemistry