

UTICAJ VALPROINSKE KISELINE I TEMOZOLOMIDA NA JETRU DEXAMETAZONOM SUPRIMIRANIH PACOVA

Autor: MILICA ĐORĐEVIĆ

e-mail: djordjevic.m.milica@gmail.com

Mentor: asist. dr Natali Rakočević

Zavod za histologiju i embriologiju

Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Uvod: Temozolomid i valproinska kiselina se koriste u terapiji glioblastoma. Animalni eksperimenti na ovu temu zahtevaju snažnu imunosupresiju deksametazonom radi sprečavanja odbacivanja implantiranih ćelija tumora. Nedovoljno je radova o kombinovanom uticaju ova tri leka na jetru.

Cilj rada: Ispitati uticaj valproinske kiseline i temozolomida na jetru deksametazonom imunosuprimiranih pacova pomoću histoloških metoda.

Materijal i metode: U eksperimentu su korišćeni Wistar albino pacovi, 20 mužjaka. Životinje su anestetizirane i izvršena je inokulacija humane ćelijske linije glioblastoma U87 u putamen. Deksametazon (1.5 mg/kg) je davan svaki drugi dan počevši od dana pre inokulacije. Za sprečavanje infekcije korišćen je cefadroksil. Životinje su bile podeljene u 4 grupe: kontrolnu, koja je dobijala deksametazon, T grupu, koja je pored deksametazona dobijala i temozolomid, V grupu, koja je dobijala deksametazon i valproinsku kiselinu, i TV grupu, koja je dobijala deksametazon, temozolomid i valproinsku kiselinu. Temozolomid je davan od 8. do 10. dana, a valproinska kiselina od 6. do 12. od dana inokulacije. Žrtvovanje je izvršeno 14. dana, zatim su napravljeni isecci iz jetri i nakon standardne histološke tehnike urađeno je hematoxylin-eosin, Masson's trichrome i periodic acid-Schiff bojenje.

Rezultati: Na svim uzorcima se pojavljuje balonirajuća degeneracija jetre i pozitivno periodic acid-Schiff bojenje, koje ukazuje na akumulaciju glikogena. Najveća balonirajuća degeneracija prisutna je u T grupi, a akumulacija glikogena u TV grupi. Najmanje promene su uočene u V grupi.

Zaključak: Tretiranje pacova imunosuprimiranih visokom dozom deksametazona sa temozolomidom je pogoršalo balonirajuću degeneraciju hepatocita, dok je sa temozolomidom i valproinskom kiselinom ublažilo balonirajuću degeneraciju, ali intenziviralo akumulaciju glikogena. U kombinaciji sa valproinskom kiselinom, deksametazon je ublažio balonirajuću degeneraciju i akumulaciju glikogena.

Ključne reči: glioblastom, temozolomid, valproinska kiselina, deksametazon, hepatotoksičnost.

UVOD

Glioblastom (GB) je najčešći maligni tumor mozga. Stopa preživljavanja osoba koje odbiju terapiju je oko 3 meseca. Savremena medicina je omogućila da 40% obolelih pacijenata doživi drugu godinu lečenja. U procesu suzbijanja ovog tumora, pored operativnih metoda i radioterapije, koristi se i aktivna supstanca temozolomid (TMZ). Smatra se da ova supstanca, alikilirajući molekule DNK tumorskih ćelija, dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i sledstveno apoptoze tumorskih ćelija. Pokazano je da je uvođenje TMZ u terapiju pacijenata sa GB povećalo stopu preživljavanja u odnosu na korišćenje samo radioterapije. Nažalost, stopa preživljavanja je i dalje niska i iznosi 15–20 meseci [1].

Jedan od najčešćih simptoma GB su epileptični napadi, zbog čega se u terapiji dodaje

i antiepileptik valproinska kiselina (VK) [2]. VK spada u grupu antiepileptika koji zahtevaju intenzivan metabolizam jetre, te može biti uzrok njenog oštećenja. Smatra se da ova kratkolančana masna kiselina negativno utiče na mitohondrije hepatocita, pospešujući nastanak slobodnih radikala, koji dovode do nastanka oksidativnog stresa [3]. Sledstveno, hronična upotreba VK može dovesti do razvoja mikrovezikularnog steatohepatitisa [4]. Nasuprot dugom korišćenju TMZ u medicini, mali je broj radova na temu njegove hepatoksičnosti. Malobrojni dokumentovani slučajevi pojave hepatitisa u toku lečenja GB korišćenjem TMZ u sadejstvu sa VK pokazuju da je uzročnik VK, jer se stanje pacijenta poboljšalo nakon što je on bio isključen iz terapije [5].

Kortikosteroidi se često daju pacijentima sa GB u cilju smanjenja vazogenog edema udruženog sa GB i smanjenja intrakranijalnog pritiska. Takođe se daju i preoperativno i pre radioterapije radi smanjenja neželjenih dejstava ovih terapijskih modaliteta [6]. Dodatno, *in vivo* ispitivanja GB na animalnim modelima, intracerebralnom stereotaksičnom implantacijom tumorskih ćelija, zahtevaju snažnu imunosupresiju radi sprečavanja odbacivanja tumora. Deksametazon (DEX) je lek izbora iz ove grupe, zbog svoje visoke potentnosti i minimalne mineralokortikoidne aktivnosti, dugog poluživota [7]. Pored imunosupresivnih efekata kortikosteroida, oni ostvaruju i brojne metaboličke efekte. Jetra je jedan od ključnih organa preko kog ispoljavaju ova dejstva [8]. Smatra se da DEX štiti jetru poboljšavajući održivost hepatocita, ali istovremeno njegova primena može biti povezana sa brojnim komplikacijama. Zato se mora obratiti pažnja na dozu, dužinu tretiranja, vreme davanja leka, način primene i interakciju sa drugim lekovima [9].

S obzirom na čestu kombinovanu primenu ovih lekova kako u kliničkim uslovima lečenja bolesnika sa GB, tako i u eksperimentalnim modelima ispitivanja GB-a, želeli smo detaljnije da ispitamo efekte kombinovanja ovih lekova na jetru

CILJ RADA

Ispitivanjem uticaja valproinske kiseline i temozolomida deksametazonom imunosuprimiranih pacova uz pomoć histoloških metoda želeli smo da utvrdimo kakvo dejstvo na jetru imaju kombinacije ovih lekova

MATERIJAL I METODE

Životinje

U eksperimentu je bilo korišćeno 20 Wistar albino pacova, muškog pola, mase 200–300 g. Eksperimenti sa životinjama su odobreni od strane Etičkog komiteta Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (Broj rešenja: 323-07-01030/2020-05). Zamorci su čuvani u ventiliranom kabinetu sa HEPA filterom (temperatura 24°C i relativna vlažnost 40%) uz veštačke 12 h cikluse svetla i mraka. Životinje su tokom celog eksperimenta imale na raspolaganju *ad libitum* vodu i komercijalnu peletiranu hranu.

Ćelijska kultura

Za inokulaciju tumora korišćena je humana ćelijska linija glioblastoma U87. Ćelije su kultivisane u T25 flaskovima u medijumu Modified Eagle Medium-u, suplementiranog sa 10% fetalnim goveđim serumom, 1% penicilin-streptomycin, 1% neesencijalne amino-kiseline i 2 mM glutamina, čuvane u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂. Pasaža je rađena po dostizanju 75% prekrivenosti flaska. Nakon druge pasaže, ćelije su tripsinizirane, izbrojane i resuspendovane u fosfat-puferisanom salinu u koncentraciji od 100 000 ćelija/μl.

Inokulacija

Svi pacovi su bili podvrgnuti inokulaciji. Životinje su prethodno bile anestetizirane intraperitonealno kombinacijom ketamina (100 mg/kg) i ksilazina (20 mg/kg), a izostanak refleksa retrakcije ekstremiteta je uziman za znak postignute duboke anestezije. Inokulacija je bila izvođena na stereotaksičnom aparatu (Stoelting®, SAD). Po postavljanju životinje, urađena je incizija poglavine, a bušilicom napravljena rupa u lobanji za prolaz igle do putamena, unilateralno sa desne strane. Koordinate za inokulaciju: AP = 1.6mm, ML = -2.0, DV = -6.0mm (Gieryng et al., 2017a) u odnosu na bregmu. Upotrebom 10 µl Hamilton™ šprica sa 26 G iglom, 100 000 ćelija u 4 µl rastvora su ubrizgane u putamen, brzinom od 0.5 µl/min. Nakon završene inokulacije, ostavljeno je 10 minuta pre izvlačenja same igle, radi prevencije aspiracije i vraćanja tumorskih ćelija. Poglavina pacova tretirana je 10% povidon jod rastvorom, a koža glave ušivena.

Dizajn eksperimenta

Imunomodulacija inflamatornog odgovara na ubrizgane ćelije glioma postignuta je supkutanim injekcijama deksametazona (Dexason® rastvor za injekciju, 1.5 mg/kg), koje su davane na svaki drugi dan svim pacovima, počevši od jednog dana pre izvršene inokulacije. U cilju prevencije infekcije, svi pacovi su bili tretirani cefadroksilom (Valdocef® oralna suspenzija, 17 mg/kg), svakodnevno tokom 7 dana, počevši od dana inokulacije.

Metodom slučajnog izbora su formirane 4 grupe sa po 5 pacova: kontrolna grupa pacova (K), koji nakon inokulacije nisu primali terapiju, grupa pacova koja je bila tretirana temozolomidom (T), grupa koja je bila tretirana temozolomidom i valproinskom kiselinom (TV) i grupa koja je primila samo valproinsku kiselinu (V). Temozolomid (Temodal® kapsule rastvorene u fiziološkom rastvoru, 10 mg/kg) davan je oralnom gavažom tokom 3 dana, od 8. do 10. dana od inokulacije. Valproinska kiselina (Eftil® sirup, 200 mg/kg) administrirana je takođe oralnom gavažom, tokom 7 dana – od 6. do 12. dana postinokulaciono. Životinje su žrtvovane 14. dana od inokulacije. Životinje su prvo anestetizirane intraperitonealno kombinacijom ketamina (100 mg/kg) i ksilazina (20 mg/kg), nakon čega je rađena transkardijalna perfuziona fiksacija sa 10% paraformaldehidom. Nakon adekvatne fiksacije organa, jetre su izvađene in toto, izmerene i fotografisane (Canon EOS 2000D), a potom su uzeti i isecci za histološku analizu.

Histološka obrada i analiza

Fiksirani isecci jetre su dehidrirani i potom ukalupljeni u parafin. Na rotirajućem mikrotomu (Leica), napravljeni su 5 mikrometarski rezovi koji su dalje podvrgnuti rutinskom hematoxilin-eozin (HE) bojenju, kao i specijalnim bojenjima: Masonovom trihromnom bojenju radi određivanja kolagena u intersticijumu jetre i perijodna kiselina-Šif-ovom bojom (PAS bojenje) za identifikaciju intracelularne količine glikogena. Mikrofotografije obojenih preseka su načinjene kamerom Leica MC 190. Dobijeni uzorci su semikvantitativno analizirani prema stepenu balonirajuće degeneracije i količine glikogena u hepatocitima, od najmanje količine (+) ka najvećoj (++++)

REZULTATI

Makroskopska analiza

Sve jetre su analizirane makroskopski – kratkom inspekcijom i palpacijom, odmah po otvaranju abdomena, pre torakotomije i sledstvene perfuzione fiksacije. Makroskopski, nisu uočene razlike između jedinki. Sve pregledane jetre su bile uobičajenih veličina, glatke i uniformno prebojene površine, prekrivene glatkim i vlažnim kapsulama. Palpatorno meke, bez vidljivih patoloških promena ili osetnih patoloških rezistencija. Nakon

fiksacije, sve jetre su izmerene, bez značajnih razlika između različitih eksperimentalnih grupa (podaci merenja nisu prikazani) (Slika 1: 1A-D).

Mikroskopska analiza

1. HE bojenje

Na svim pregledanim preparatima je uočeno baloniranje hepatocita, ali u različitom stepenu između različitih eksperimentalnih grupa. U K grupi pacova baloniranje je zahvatilo širok pojas lobulusa oko portnih prostora (+++) (Slika 1: 2A, 3A). Hepatociti su uvećani i zaokrugljeni, centralno postavljenog jedra. Jedra hepatocita sa veoma izraženim baloniranjem su piknotično izmenjena. Tanak pojas citoplazme je vidljiv na periferiji ćelija. Najveća balonirajuća degeneracija (+++++) je uočena u T grupi u panacinusnim regijama parenhima jetre. Oko centralne vene nalaze se malobrojni hepatociti pune citoplazme i pravilnog oblika. S druge strane, patološke promene su najslabije izražene na preparatima V grupe (+). Hepatociti su dominantno neizmenjeni, okruglog, pretežno euhromatičnog jedra, sa vidljivim jedarcima. Citoplazma je ravnomerno raspoređena. Uzak pojas periportalnih hepatocita karakterišu blaže balonirajuće promene (Slika 1: 2C, 3C). Kod jetri TV pacova vidljiva je periportalna degeneracija (++), nešto manjeg obima u odnosu na K grupu, ali većeg u odnosu na V grupu (Slika 1: 2D, 3D).

2. Masson trihromno bojenje

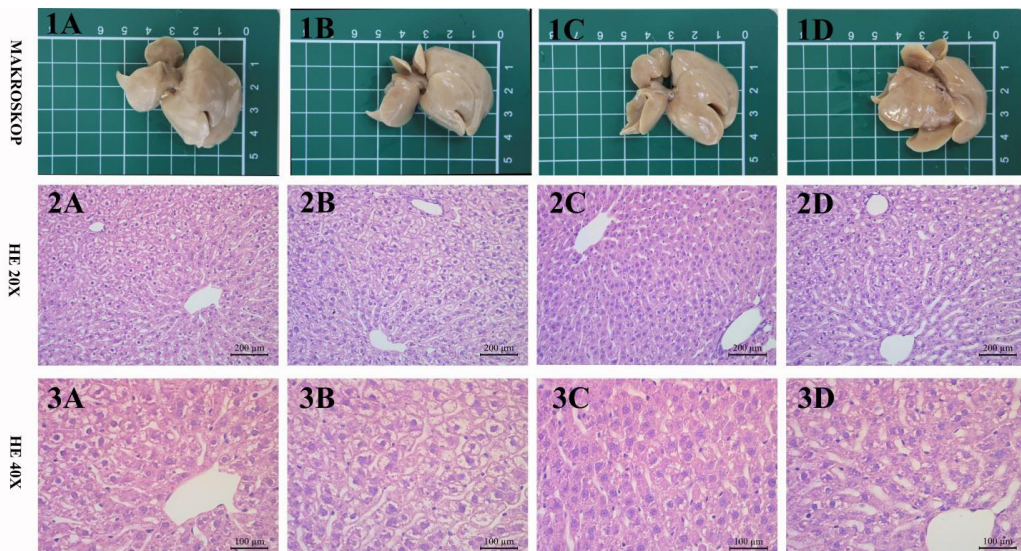
Specifično bojenje kolagena svih jedinki, bez intergrupnih razlika, ukazalo je na fiziološke manje količine finih vlakana portnih prostora, bez znakova fibroznog ožiljavanja (Slika 2 A-D).

3. PAS bojenje

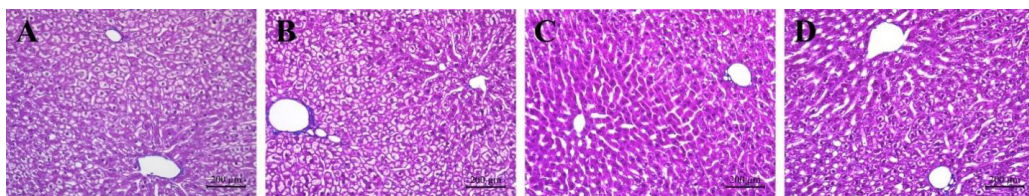
U K grupi, hepatociti centrolobularnog pojasa pokazuju punu citoplazmu, sa intenzivnijim depozitom glikogena (+++). Iako hepatociti periportalne zone pokazuju veću količinu citoplazme u odnosu na HE bojenje, identifikovani glikogen ne nadomešta u potpunosti prazan prostor citoplazme (Slika 3: 1A, 2A). S obzirom na ekstenzivno baloniranje jetri T grupe pacova, intenzitet PAS bojenja je slabiji u T grupi naspram K grupe (++), iako je oskudna citoplazma intenzivno obojena. Malobrojni hepatociti pune citoplazme oko centralne vene su približne, možda čak i intenzivnije prebojenosti (Slika 3: 1B, 2B). Najmanja količina glikogena prisutna je kod V grupe pacova (+). Glikogen je ravnomerno raspoređen citoplazmom hepatocita (Slika 3: 1C, 2C). Nasuprot tome, najviše glikogena u hepatocitima uočeno je u TV grupi, panacinusno veoma visok intenzitet prebojenosti citoplazme (++++). Periportalni hepatociti i pored visokog intenziteta prebojenosti, ipak pokazuju neravnomerno raspoređenu, delimično ispraznu citoplazmu (Slika 3: 1D, 2D).

Tabela 1. Semikvantitativna analiza uočenih promena na uzorcima jetre po grupama

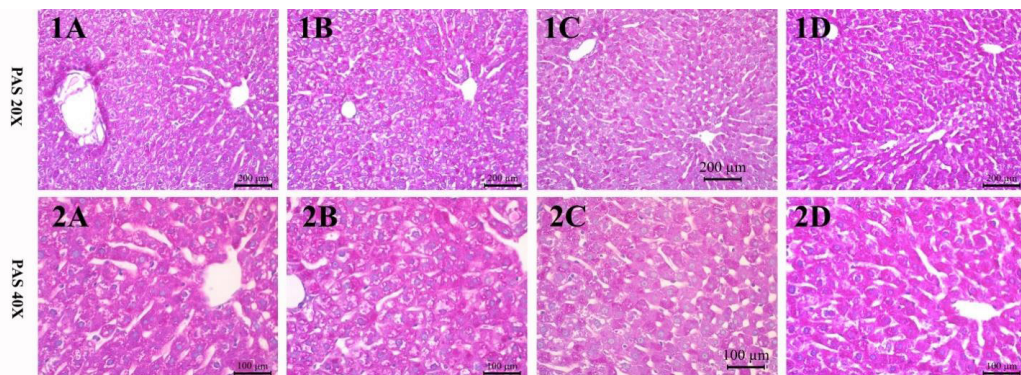
	K grupa DEX	T grupa DEX + TMZ	V grupa DEX + VK	TV grupa DEX + TMZ + VK
Stepen baloniranja hepatocita	+++	++++	+	++
Stepen deponovanja glikogena	+++	++	+	++++



Slika 1. Makroskopski izgled tkiva jetre pacova. K grupa (1A), T grupa (1B), V grupa (1C), TV grupa (1D). Mikroskopski izgled parenhima jetre pacova bojene HE metodom. K grupa (2A, 3A), T grupa (2B, 3B), V grupa (2C, 3C), TV grupa (2D, 3D)



Slika 2. Mikroskopski izgled parenhima jetre pacova bojene Masonn trichrome metodom, uveličano 20 x. K grupa (A), T grupa (B), V grupa (C), TV grupa (D)



Slika 3. Mikroskopski izgled parenhima jetre pacova bojene PAS metodom. K grupa (1A, 2A), T grupa (1B, 2B), V grupa (1C, 2C), TV grupa (1D, 2D)

Uticaj visoke doze deksametazona na hepatocite

Iako makroskopski nisu uočene razlike između jedinki eksperimentalnih grupa, značajne histološke promene uočene su na HE preparatima – prvenstveno baloniranje hepatocita različitog stepena (Slika 1: 2A-D, 3A-D). Baloniranje hepatocita primetno i u K grupi pacova odgovara ranije opisanim promenama pri primeni visokih doza koritikosteroida u dostupnoj literaturi [10,11,12]. Balonirani hepatociti su tipičan znak steatohepatitisa, a kortikosteroidi su među mnogobrojnim mogućim uzročnicima [13]. Ispražnjena citoplazma uvećanih hepatocita, bez vidljivih membrana vakuola i sa centralno postavljenim jedrima naših eksperimentalnih grupa međutim ne odgovara karakterističnim znacima kortikosteroidima izazvane makrovezikularne steatoze: krupna, jasno ograničena vakuola uz periferno potisnuto jedro. Takođe, ni makroskopski nalaz uredno prebojene jetre ne ide u prilog masnoj infiltraciji jetre. Osim akumulacije lipida, baloniranje hepatocita može biti i rezultat akumulacije glikogena [13]. Specifično PAS bojenje citoplazme ukazalo je na visoku koncentraciju glikogena K grupe (Slika 3: 1A,2A). Klasičan hiperglikemijski efekat kortikosteroida je posledica stimulacije glikogenolize i sledstvene deplecije glikogena hepatocita, što je u suprotnosti sa intenzivnim PAS bojenjem K grupe. In vitro ispitivanje uticaja deksametazona na metabolizam glukoze pokazalo je bifazno dejstvo pri primeni visokih doza kortikosteroida [14], koje su korišćene i u našoj studiji. Akutna glikogenoliza po primeni DEX praćena je sekundarnom glikogeneozom i akumulacijom glikogena u hepatocitima, objašnjavajući uočen viši intenzitet citoplazme K grupe. Ipak, deponovan glikogen tek delom objašnjava uvećane hepatocite, s obzirom na to da su periportni hepatociti čak i pri PAS bojenju praznjikave citoplazme, mada u znatno manjem intenzitetu nego na HE bojenju. Baloniranje periportalnih hepatocita pri primeni visokih doza kortikosteroida koje se ne može u potpunosti objasniti depoom glikogena na PAS bojenju uočili su i drugi autori [11,12]. Promenu su identifikovali kao „steroidna vakuolarna hepatopatija“, bez pružanja mogućeg objašnjenja. Imajući u vidu da kortikosteroidi povećavaju stvaranje slobodnih radikala i uzrokuju oksidativni stres ćelija, naročito u visokim dozama, moguće je da su uvećani hepatociti delom i posledica degenerativnog baloniranja, gde usled poremećaja rada ATP pumpi sledstveno dolazi do intracelularnog nakupljanja vode i bubrenja ćelija [13]. Ovu teoriju potkrepljuju i piknotična jedra koja su uočena kod najintenzivnijih baloniranja hepatocita, jedva uočljive citoplazme.

Uticaj valproinske kiseline i temozolomida na promene indukovane visokim dozama deksametazona

Intenzitet baloniranja varirao je između eksperimentalnih grupa. Dodatak TMZ kortikosteroidnoj terapiji doveo je do pogoršanja baloniranja ćelija. TMZ se kao hidrosolubilna supstanca koja hidrolizuje pri fiziološkoj pH ne metaobliše u jetri [15]. Iz tog razloga, detaljnije ispitivanje njegovog uticaja na hepatocite je prenebregnuto postojećom literaturom. Ipak, kao alkilirajući citostatik, TMZ doprinosi stvaranju slobodnih radikala i mogao bi pogoršati oksidativni stres izazvan visokim dozama DEX. S obzirom na tako ekstenzivno baloniranje, intenzitet PAS bojenja je slabiji u T grupi naspram kontrole, iako su malobrojni hepatociti pune citoplazme oko centralne vene približne, možda čak i intenzivnije prebojenosti.

Nasuprot efektima TMZ, dodavanje VK je značajno smanjilo baloniranje hepatocita. Ovo je prilično neočekivan rezultat, jer se smatra da je VK hepatotoksična i da izazivajući inhibiciju mitohondrija povećava oksidativni stres hepatocita [16]. Ispoljavanje oštećenja hepatocita i razvoj karakterističnog mikrovezikularnog steatohepatitisa pokazano je na

toksičnim modelima pri kojima su korićene dvostruko veće koncentracije VK – 700 mg/kg intraperitonealno aplikovane, u odnosu na 300 mg/kg davane VK oralnom gavažom u našoj studiji. Ipak, ne samo da nije dovela do pogoršanja, već je paradoksalno dovela do smanjenja baloniranja. Mogući mehanizam atenuacije efekata DEX može biti u smanjenju ekspresije receptora za kortikosteroide. Naime, VK je potentni inhibitor histon deacetylaze koja sprečava acetilaciju steroidnih receptora i sledstvenu internalizaciju i razgradnju receptora [17]. VK na taj način indirektno stimuliše razgradnju receptora i slabi odgovor na primenjenu kortiko terapiju. Intenzitet PAS bojenja V grupe je slabiji u odnosu na K grupu, a glikogen je ravnomerno raspoređen citoplazmom hepatocita. Depleciju glikogena objašnjavaju glikogenolitički efekti VP stimulacijom enzima ključnih za oslobađanje glukoze iz glikogena [18].

Istovremena primena TMZ i VK uz DEX terapiju TV grupe pacova smanjilo je baloniranje hepatocita u odnosu na K i T grupu, iako je većeg stepena u odnosu na V grupu, odražavajući smanjenje protektivnih efekta VK dodatkom TMZ. Ali za razliku od V grupe sa deplecijom glikogena u odnosu na kontrolu, TVP grupa je pokazala najintenzivniju koncentraciju glikogena. Pored glikogenetskog efekta DEX, novije studije su pokazale i glikogenetsko dejstvo TMZ dezinhibicijom glikogen sintetaze. Kostimulacija glikogeneze od strane DEX i TMZ prevagnula je glikogenolitički efekat VK.

Primena visokih doza kortikosteroida u cilju imunosupresije pacova dovela je do značajne akumulacije glikogena u hepatocitima uz periportalnu balonirajuću degeneraciju. Iako imaju svoje mesto u lečenju pacijenata glioblastoma, primena je praćena značajnim neželjenim dejstvima koja, kako novije studije pokazuju, delovanjem na jetru kao i brojnim drugim mehanizmima zapravo smanjuju stepen preživljavanja pacijenata sa GB [19]. Dodatak TMZ pogoršava oštećenja indukovana DEX. Protektivno dejstvo i atenuacija hepatotoksičnih neželjenih dejstava TMZ i DEX – lekova koji su neizostavni u lečenju GB, podvlače značaj VK kao leka izbora u terapiji epileptičnih napada ovih bolesnika.

ZAKLJUČAK

Imunosupresija pacova visokom dozom deksametazona izazvala je prominentne balonirajuće promene hepatocita.

Tretiranje imunosuprimiranih pacova sa:

- TMZ pogoršalo je balonirajuću degeneraciju hepatocita bez značajnog uticaja na depoziciju glikogena, što ukazuje da alkilirajući efekat TMZ dodatno oštećuje hepatocite kroz oksidativni stres i disfunkciju mitohondrija.
- VK značajno je ublažilo štetne efekte deksametazona na jetru i smanjilo akumulaciju glikogena, što sugerise potencijalno hepatoprotektivno dejstvo verovatno posredovano antioksidativnim i epigenetskim mehanizmima.
- kombinacijom TMZ i VK ublažilo je balonirajuće efekte deksametazona, ali je istovremeno intenziviralo akumulaciju glikogena, što može ukazivati na metaboličku adaptaciju hepatocita usled promena u regulaciji glukoneogeneze i skladištenja energije.

Dobijeni rezultati sugerišu da VK može delimično zaštititi jetru od citotoksičnih efekata TMZ u uslovima imunosupresije, ali da kombinovana primena može menjati energetske metaboliizam jetre. Ovo ima značajne implikacije za bezbednost kombinovane terapije kod pacijenata koji primaju visoke doze kortikosteroida.

Za potpunije razumevanje mehanizama uočenih promena, buduća istraživanja treba da obuhvate analizu biohemijskih markera funkcije jetre (AST, ALT, GGT), oksidativnog stresa i mitohondrijalne funkcije, kao i ultrastrukturne promene hepatocita. Takvi nalazi mogu doprineti racionalnijoj i bezbednijoj upotrebi TMZ i VK u kliničkoj praksi.

LITERATURA

1. Witthayanuwat S, Pesee M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(9):2613-17.
2. Wen PY, Schiff D. Valproic acid as the AED of choice for patients with glioblastoma? The jury is out. *Neurology*. 2011;77(12):1114-5.
3. Sokmen BB, Tunali S, Yanardag R. Effects of vitamin U (S-methyl methionine sulphonium chloride) on valproic acid induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3562-6.
4. Kesterson JW, Granneman GR, Machinist JM. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. I. Toxicologic, biochemical and histopathologic studies. *Hepatology*. 1984;4(6):1143-52.
5. Neyns B, Hoorens A, Stupp R. Valproic acid related idiosyncratic drug induced hepatotoxicity in a glioblastoma patient treated with temozolomide. *Acta Neurol Belg*. 2008;108(4):131-4.
6. Pitter KL, Tamagno I, Alikhanyan K, et al. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain*. 2016;139:1458-71.
7. Cenciari M, Valentino M, Belia S, Sforza L, Rosa P, Ronchetti S, et al. Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Front Mol Neurosci*. 2019;12-65.
8. Van Raalte DH, Brands M, Van Der Zijl NJ, Muskiet MH, Pouwels PJ, Ackermans MT, et al. Low-dose glucocorticoid treatment affects multiple aspects of intermediary metabolism in healthy humans: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2011;54(8):2103-12.
9. Eken, H. Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol*. 2006;12(33):5379.
10. Noel KI. Hepatic Tissues under the Effect of Dexamethasone: Histological Study, Dose and Duration Related Changes. *Iraqi J Med Sci*. 2013;11:113-8.
11. Lowe AD, Campbell KL, Barger A, Schaeffer DJ, Borst L. Clinical, clinicopathological and histological changes observed in 14 cats treated with glucocorticoids. *Vet Rec*. 2008;162(24):777-83.
12. Fittschen C, Bellamy JE. Prednisone-induced morphologic and chemical changes in the liver of dogs. *Vet Pathol*. 1984;21(4):399-406.
13. MacSween RN, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portmann BC, editors. *Pathology of the liver*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.
14. Zheng XF, Liu L, Zhou J, Miao MY, Zhou JR, Zhu D, Xia ZF, Jiang CL. Biphasic effects of dexamethasone on glycogen metabolism in primary cultured rat hepatocytes. *J Endocrinol Invest*. 2009;32(9):756-8.
15. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. [Updated 2020 Sep 2]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548816/>
16. Mnif L, Sellami R, Masmoudi J. Valproic Acid and Hepatic Steatosis: A Possible Link? About a Case Report. *Psychopharmacol Bull*. 2016;46(2):59-62.
17. Thomas S, Munster PN. Histone deacetylase inhibitor induced modulation of anti-estrogen therapy. *Cancer letters*. 2009;280(2):184-91.
18. Schnackenberg LK, Jones RC, Thyparambil S, Taylor JT, Han T, Tong W, Hansen DK, Fuscoe JC, Edmondson RD, Beger RD, Dragan YP. An integrated study of acute effects of valproic acid in the liver using metabolomics, proteomics, and transcriptomics platforms. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 2006;10(1):1-4.
19. Klement RJ, Champ CE. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma in part through their elevation of blood glucose levels. *Brain*. 2017;140(3):e16.

EFFECTS OF VALPROIC ACID AND TEMOZOLOMIDE ON THE LIVER OF IMMUNOSUPPRESSED RATS BY DEXAMETHASONE

Author: MILICA ĐORĐEVIĆ

Email: djordjevic.m.milica@gmail.com

Mentor: TA Natali Rakočević

Department of Histology and Embryology

Faculty of Medicine, University of Novi Sad

Introduction: Temozolomide and valproic acid are used in the treatment of glioblastoma. Animal experiments on this topic require strong immunosuppression with dexamethasone. There is insufficient work on the combined effect of these three drugs on the liver.

Aim: To examine the effects of valproic acid and temozolomide on the liver of rats immunosuppressed by dexamethasone.

Materials and Methods: In our experiment, we used 20 male Wistar albino rats. All animals were anesthetized, and the human glioblastoma U87 cell line was inoculated. Dexamethasone (1.5 mg/kg) was given on the day before inoculation, and afterwards on every other day. Cefadroxil was used to prevent infection. Animals were divided into 4 groups: control group receiving only dexamethasone, T group receiving dexamethasone and temozolomide, V group receiving dexamethasone and temozolomide, and TV group receiving dexamethasone, temozolomide, and valproic acid. Temozolomide was given from the 8th to the 10th day, and valproic acid from the 6th to the 12th day from the day of inoculation of the cell line. The sacrifice was performed on the 14th day after inoculation. Liver incisions were made and staining was performed: hematoxylin-eosin, Masson's, and periodic acid-Schiff.

Results: Ballooning degeneration of the liver and positive periodic acid-Schiff staining appear on all samples, but the degree of change differs from one group to another.

Conclusion: Treatment of rats immunosuppressed with high doses of dexamethasone with temozolomide worsened the ballooning degeneration of hepatocytes, while treatment with temozolomide and valproic acid alleviated ballooning degeneration but intensified glycogen accumulation. Valproic acid, in cooperation with dexamethasone, alleviated ballooning degeneration and glycogen accumulation.

Keywords: glioblastoma; temozolomide; valproic acid; dexamethasone; hepatotoxicity

