

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

**Dažādu vielu efekti uz aknu šūnu līnijas HepG2 enzīmu
aktivitāti**

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Viktorija Boldireva**

Studenta apliecības numurs: vs18083

Maģistra darba vadītājs: profesore, Dr. habil.biol. Ruta Muceniece

RĪGA 2023

ANOTĀCIJA

Maģistra darba mērķis bija izpētīt silimarīna, metformīna, diklofenaka, nimesulīda, neostigmīna, celekoksiba, atorvastatīna un simvastatīna ietekmi uz aknu enzīmu AST, ALP, ALAT, un AChE aktivitāti cilvēku aknu šūnu līnijas HepG2 taukainās aknas modelī, ko izraisa ar oleīnskābes un palmitīnskābes pievienošanu šūnu barotnei. Zināms, ka nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi ilgstoši lietojot izraisa aknu enzīmu līmeņu pieaugumu, bet silimarīns, metformīns un statīni ir ieteikti kā nespecifiski NATAS terapijas līdzekļi. AChE palielināšanās taukainās aknas modeļšūnās norāda, ka arī holīnerģiska sistēma varētu būt iesaistīta NATAS patoģenēzē. Rezultāti parāda, ka visas vielas izraisa paaugstināto aknu enzīmu aktivitātes samazinājumu, bet nenovēro selektivitāti. Pieļaujam, ka NATAS modelī 24 h laikā visas pētītās vielas samazināja taukskābju iekļūšanu šūnā un tādējādi samazināja to efektus uz enzīmiem.

Atslēgvārdi: ne-alkohola taukaino aknu slimība, acetilholīnesterāze, alanīnaminotransferāze, aspartātamīnotransferāze, sārmainā fosfotāze, HepG2.

ABSTRACT

The aim of the master's thesis was to investigate the effects of silimarin, metformin, diclofenac, nimesulide, neostigmine, celecoxib, atorvastatin and simvastatin on the liver enzymes AST, ALP, ALT, and AChE activity in human liver cell lines HepG2 fatty liver model caused by oleic acid and the addition of palmitic acid to cell medium. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have been known to cause increased levels of liver enzymes during long-term administration, while silimarin, metformin and statins are recommended as non-specific therapy of NATAS. The increase in AChE in fatty liver models indicates that the cholinergic system could also be involved in the pathogenesis of NATAS. The results show that all substances lead to an increased activity of liver enzymes but do not observe selectivity. In the NATAS model, all the substances studied reduced the uptake of fatty acids within 24 hours and thus reduced their effects on enzymes.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease, acetylcholinesterase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, HepG2.

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	1
IEVADS	2
1. LITERATŪRAS APSKATS	4
1.1. Taukaino aknu slimība	4
1.2. Patofizioloģiskie mehānismi	6
1.3. Diagnostika	9
1.4. Taukaino aknu slimības ārstēšanas iespējas.....	14
1.5. <i>In vitro</i> aknu pētniecības metodes	19
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	23
2.1. Pētāmās vielas	23
2.2. Reagentu komerciāli pieejamie komplekti.....	23
2.3. Laboratorijas materiāli un iekārtas	24
2.4. HepG2 šūnu stimulēšana ar izvēles zālēm un supernatanta iegūšana	26
2.5. AST aktivitātes mērīšana	26
2.6. ALP aktivitātes mērīšana	27
2.7. AChE aktivitātes mērīšana	28
2.8. ALAT aktivitātes mērīšana	29
2.9. Datu statistiskā analīze.....	30
3. REZULTĀTI	31
3.1. Vielu efekti uz AST aktivitāti	31
3.2. Vielu efekti uz ALP aktivitāti	39
3.3. Vielu efekti uz ALAT aktivitāti	41
3.4. Vielu efekti uz AChE aktivitāti.....	43
4. DISKUSIJA	44
4.1. Dažādu vielu efekti uz AST, ALP, ALAT aktivitāti HepG2 šūnas taukainas aknas modelī.....	45
4.2. Dažādu vielu efekti uz AChE aktivitāti HepG2 šūnas taukainas aknas modelī.....	51
5. SECINĀJUMI.....	54
6. PATEICĪBAS	55
LITERATŪRAS SARAKSTS	56

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ACh - acetilholīns
AChE - acetilholīnesterāze
AChEI - acetilholīnesterāzes inhibitori
ALAT - alanīna aminotransferāze
ALP - sārmainā fosfatāze
AST - aspartātaminotransferāze
dH₂O - dejonizēts ūdens
DNS - dezoksiribonukleīnskābe
ET - endoplazmatiskais tīkls
GGT - gamma-glutamīl transferāzes
NASH - ne-alkohols steatohepatīts
NATAS - ne-alkohola taukaina aknu slimība
NPL - nesteroīdi pretiekaisuma līdzekļi
NPR - nesalocīta proteīna reakcija
OD - optiskais blīvums
ROS - reaktīvo skābekļa savienojumi
SH - steatohepatīts
TG - triglicerīdi
TS - taukskābes
2D divdimensiju modelis
3D - trīsdimensiju modelis

IEVADS

Ne-alkohola taukaino aknu slimību (NATAS) parasti raksturo ar aknām saistītu enzīmu alanīnaminotransferāzes (ALAT) un aspartātaminotransferāzes (AST) seruma līmeņa paaugstināšanos, kas 1-2 reizes pārsniedz normas augšējo robežu. Tomēr, neskatoties uz NATAS esamību, līdz 50% pacientu var būt normāls ALAT un AST līmenis. Gamma-glutamiltansferāzes (GGT) līmenis var paaugstināties arī tad, ja tiek ievadītas organismam svešas vielas, piemēram, zāles (piemēram, fenobarbitāls, fenitoīns vai varfarīns) vai alkohols. GGT parasti ir pirmais aknu enzīms, kas palielinās asinīs, kad tiek bloķēts vai saspiegts kāds no aknu žultsvadiem. Šī iemesla dēļ tas ir visjutīgākais aknu enzīmu tests, lai noteiktu žults ceļu problēmas. Daudzu veidu aknu darbības traucējumi var izraisīt paaugstinātu GGT līmeni asinīs, tāpēc veselības aprūpes sniedzēji neizmanto šo testu atsevišķi, bet GGT līmeni visbiežāk pārbauda kopā ar sārmainās fosfatāzes (ALP) asins analīzi. ALP atrodas aknās un kaulos.

Lielākā daļa zāļu NATAS pētījumu koncentrējas uz klasiskajiem patoloģiju ceļiem, kas norāda uz aknu lipīdu uzkrāšanos, iekaisumu vai fibrozi. Pētījumi ir parādījuši, ka veģetatīvā jeb autonomā nervu sistēma, kas inervē aknas, spēlē izšķirošu lomu aknu lipīdu homeostāzes, iekaisuma un fibrozes regulēšanā. Turklāt arvien vairāk pierādījumu liecina, ka neotropie faktori var modulēt visus NATAS posmus. Gan veģetatīvā nervu sistēma, gan neotropie faktori NATAS pacientiem un peļu modeļiem ir izmainīti. Zīdītāju aknas ir bagātas ar holīnesterāzēm. Ir divas galvenās holīnesterāzes, acetilholīnesterāze (AChE), kas pēcsinaptiski pabeidz parasimpātiskās nervu sistēmas mediatora acetilholīna (ACh) darbību, un butirilholīnesterāze (BuChE), kam nav skaidras fizioloģiskas funkcijas. Cilvēkiem samazināta BuChE aktivitāte serumā ir saistīta ar hroniskām aknu slimībām, tostarp cirozi. AChE līmenis cilvēka serumā ir daudz zemāks par BuChE līmeni, tāpēc lielākā daļā pētījumu nosaka BuChE līmeni serumā kā aknu funkciju, savukārt AChE nav saņēmusi lielu uzmanību. Holīnesterāzes aktivitātes fizioloģiskā nozīme aknās un serumā līdz šim pilnībā nav noskaidrota. AChE var darboties hepatocītos un citās epitēlija šūnās, lai inaktivētu asinsritē cirkulējošo ACh. Tomēr AChE var būt iesaistīta arī dažos starpšūnu un intracelulāros regulēšanas mehānismos, piemēram, šūnu augšanas un šūnu adhēzijas regulēšanā.

Zināšanas par to, kā pareizi analizēt aknu enzīmus, ir būtiskas aknu slimību diagnostikā, uzraudzībā un ārstēšanā. Lai gan ir viegli pieejami dažādi laboratorijas un attēlveidošanas testi, iegūtas zināšanas par aknu enzīmu modeļiem varētu palīdzēt novērst nevajadzīgus izmeklējumus un vajadzības gadījumā paātrināt iejaukšanos, piemēram, aknu biopsiju. Turpmākie pētījumi varētu vēl vairāk definēt aknu enzīmu lomu diagnostikas algoritmos vai

norādīt uz nepieciešamību turpināt slimības izmeklēšanu, izmantojot sarežģītus biomarkierus un jaunas attēlveidošanas metodes.

Pašlaik nav apstiprinātas terapijas NATAS ārstēšanai, kā arī nav pietiekoši izpētīts, kā dažādas zāļu vielas ietekmē aknu enzīmu līmeņus NATAS pacientiem serumā, bet vēl mazāk ir izpētīts kā zāles ietekmē enzīmu aktivitāti aknu šūnās. Šim nolūkam tiek izmantoti *in vitro* testi un dažādas cilvēku aknu šūnu līnijas.

Maģistra darba mērķis ir pētīt silimarīna un dažādu zāļu ietekmi uz aknu enzīmu AST, ALP, AChE un ALAT aktivitāti cilvēku aknu šūnu līnijas HepG2 taukainās aknas modelī.

Darba uzdevumi:

1. Pētīt dažāda farmakoloģiskā darbības mehānisma zāļu ietekmi uz AST līmeni HepG2 šūnu taukainas aknas modelī laika gaitā, izmantojot kinētisko mērījumu veidu.
2. Noskaidrot dažādu vielu efektus uz ALP aktivitāti HepG2 šūnu taukainas aknas *in vitro* modelī.
3. Pētīt dažādu vielu efektus uz ALAT un AChE aktivitāti HepG2 šūnu taukainas aknas modelī.

Pētījums veikts LU Medicīnas fakultātes Zinātņu mājas laboratorijā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Taukaino aknu slimība

Aknu slimības ir galvenais mirstības cēlonis visā pasaulē un veido plašu slimību klāstu ar dažādu vai nezināmu etioloģiju (Seto & Mandell, 2021). NATAS ir progresējošas aknu slimības spektrs, kas ietver steatozi, steatohepatītu (SH), fibrozi, cirozi un hepatocelulāru karcinomu (Haigh *et al.*, 2022). Hroniska aknu slimība tiek raksturota kā hronisks aknu iekaisuma stāvoklis, kas ilgst vairāk nekā 6 mēnešus (Borrello & Mann, 2022). Hroniskas aknu slimības gadījumā, ja to neārstē, beigu stadija parasti ir neatgriezeniska fibroze, reģenerācijas mezgliņu veidošanās, aknu parenhīmas bojājums un aknu cirozes attīstība. Hroniskām aknu slimībām ir dažādi cēloņi, kas ietver toksīnus, ilgstošu pārmērīgu alkohola lietošanu, infekciju, autoimūnās slimības, ģenētiskos un vielmaiņas traucējumus. NATAS ir stāvoklis, kas ietver plašu aknu slimību spektru, sākot no vienkāršas steatozes, kurā lipīdu pilieni uzkrājas hepatocītu citoplazmā, līdz ne-alkohola steatohepatītam (NASH), kam raksturīga steatoze, iekaisums un hepatocītu šūnu balonēšana, kas bieži saistīta ar fibrozi un nav izskaidrojama ar citiem faktoriem (Fernández *et al.*, 2022).

Sākotnējās aknu steatozes stadijas ietver triglicerīdu (TG) uzkrāšanos aknās. TG sintēzei aknas izmanto vairākus taukskābju (TS) avotus, bet lielāko daļu parasti iegūst no brīvo TS pastiprinātas plūsmas, kas rodas no taukaudu TG pārmērīgas hidrolīzes, ko insulīna rezistences apstākļos izraisa nenomākta hormonu jutīga lipāze (Duell *et al.*, 2022). Steatoze parasti ir makrovezikulāra. Makrovezikulārās steatozes gadījumā lipīdu vakuola gandrīz aizpilda visu hepatocītu, nospiežot kodolu uz sāniem. Galu galā šīs šūnas var izskatīties kā adipocīti. Saikne starp steatozi un SH nav skaidra (Bedossa, 2017).

SH attīstība ir sarežģīts process un nav pilnībā izprotams. SH attīstība ir divpakāpju process. Pirmais solis šajā procesā ir tauku uzkrāšanās aknās, kas palielina insulīna rezistenci. Otrais šī procesa solis ir šūnu un molekulārās izmaiņas, kas saistītas ar oksidatīvo stresu un TS oksidēšanos aknās dažādu faktoru dēļ (citokīnu bojājums, hiperinsulinēmija, dzelzs vai lipīdu peroksidācija, ekstracelulārās matricas izmaiņas, enerģijas homeostāze un imūnsistēmas funkcijas izmaiņas) (Pouwels *et al.*, 2022).

Aknu fibroze ietver aknu parenhīmas aizstāšanu ar pārmērīgu ekstracelulāro matricu, kā daļu no atbildes reakcijas uz hronisku aknu vai žultsvadu bojājumu. Fibrilārā kolagēna (t.i., kolagēna I, kolagēna III un fibronektīna) un ekstracelulārās matricas proteīnu (piemēram, ar hondroitīna sulfātu bagātu proteoglikānu) nogulsnešanās izraisa aknu mikroarhitektonikas izmaiņas. Šīs strukturālās izmaiņas kavē plazmas divvirzienu plūsmu starp sinusoidālo lūmenu

un hepatocītiem, izraisot turpmāku aknu darbības traucējumu (Ozdogan & Arikan, 2022). Ekstracelulāro šūnu matricas proteīnu, īpaši 1. tipa kolagēna, uzkrāšanās izkropļo aknu arhitektoniku, veidojot šķiedru brūci, kam seko šūnu sfērisko apgabalu paplašināšanās, ko sauc par mezgliņiem, un pēc tam audu sacietēšana (Awdan & Asaad, 2021).

Aknu slimībai turpinoties, fibrozes un neoangiogēnēzes dēļ rodas izteiktākas arhitektonikas izmaiņas, kas izraisa cirozes attīstību. Ciroze izpaužas kā difūza parādība, kad savienojošās šķiedru starpsienas pilnībā ierobežo reģenerējošās aknu parenhīmas strukturāli patoloģiskas mezglu zonas. Cirozes patofizioloģiskās sekas galvenokārt ir atkarīgas no saistīto asinsvadu izmaiņu smaguma pakāpes (Borrello & Mann, 2022). Ciroze ir pēdējais aknu slimības attīstības ceļš. Cirozei ir raksturīga pakāpeniska aknu šūnu bojāeja un saistaudu ieaugšana, rezultātā izraisot hepatocelulāro disfunkciju, hepatocelulāro karcinomu un līdz ar to arī aknu mazspēju (Grønkjær & Lauridsen, 2021).

1.2. Patofizioloģiskie mehānismi

Sākotnējā NATAS patofizioloģijas teorija balstījās uz divām hipotēzēm. Pirmajā hipotēzē bija aprakstīta aknu TG uzkrāšanās, kas padara aknas jutīgas pret bojājumiem, ko pēc otras hipotēzes apgalvojuma izraisa, piemēram, iekaisuma citokīni un adipokīni, mitohondriju disfunkcija un oksidatīvais stress, kas savukārt izraisa NASH un fibrozi. Arī paaugstināts brīvo TS līmenis aknās ir novērots insulīna rezistences un aptaukošanās gadījumā. Tomēr šī koncepcija ir mainīta, jo arvien vairāk tiek saprasts, ka brīvajām TS ir tieša loma aknu bojājumu izraisīšanā (Seto & Mandell, 2021). Brīvās TS var veicināt arī lipīdu uzkrāšanos aknās, esterificējot glicerīnu vai izmantojot β -oksidāciju, lai veidotu TG. Brīvās TS var izraisīt iekaisumu, veicināt oksidatīvā stresa rašanos, tāpēc aknu TG veidošanās varētu kalpot kā aizsargmehānisms, lai neitralizētu neesterificēto brīvo TS kaitīgo ietekmi (Kwaifa *et al.*, 2023).

Ir labi zināma oksidatīvā stresa un mitohondriju disfunkcijas ietekme uz NATAS un NASH progresēšanu (Wang *et al.*, 2017). Mitohondriji galvenokārt ir atbildīgi par superoksīda anjonu veidošanos. Mitohondriji ir svarīgi vielmaiņas un signālu centri, kas darbojas, lai uzturētu aknu šūnu homeostāzi, elastību un šūnu izdzīvošanu. Disfunkcionāla elektronu transportēšana un mitohondriju dinamika pasliktina lipīdu metabolismu un izraisa TS patēriņa un tauku uzkrāšanās regulēšanas pazemināšanos, un tas izraisa turpmāku mitohondriju reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS – reactive oxygen species) un superoksīda ražošanas pieaugumu (Ma *et al.*, 2022). Normālas mitohondriju homeostāzes apstākļos šūna var likvidēt ROS. Tomēr NATAS gadījumā palielināta mitohondriju TS oksidēšanās un trikarbonskābju cikla aktivitāte pastāvīgi nodrošina elektronu transporta ķēdes reducējošos ekvivalentus. Šī ilgstoša disfunkcija elpošanas kompleksā veicina superoksīda anjona $O_2^{\bullet-}$ veidošanos. Turklāt mitohondriju dezoksiribonukleīnskābe (DNS) ir ļoti jutīga pret ROS. Tās ir pakļautas bojājumiem un mutācijām, kā rezultātā oksidatīvā stresa apstākļos rodas elpošanas ķēdes defekti un samazinās mitohondriju biogēnēze. Kodola DNS oksidatīvie bojājumi pasliktina mitohondriju darbību un kavē kodolā kodētu mitohondriju gēnu transkripciju (Hong *et al.*, 2021). Veselīgas aknās β -oksidācija notiek mitohondrijos, bet NATAS gadījumā ir palielināta mitohondriju TS oksidēšanās. Turklāt paātrināta β -oksidācija izraisa ROS veidošanos un var izraisīt mitohondriju disfunkciju. Faktiski mitohondriji ir galvenais ROS ģenerācijas avots šūnās (Bovi *et al.*, 2021). Augsta ROS koncentrācija pastiprina šūnu makromolekulu, piemēram, DNS, proteīnu un lipīdu modifikācijas, kas var izraisīt bojātu makromolekulu nogulsnešanos un pēc tam izraisīt aknu bojājumu. Mehānisms, ar kura palīdzību ROS veicina NATAS attīstību, var būt saistīts ar redoks signalizāciju un oksidatīvu biomolekulāro bojājumu (Kwaifa *et al.*, 2023).

Endoplazmatiskā tīkla (ET) stress ir vēl viens veids, kas saistīts ar NATAS un NASH patofizioloģiju. Stresa apstākļos, nepareizi salocītie proteīni uzkrājas ET lūmenā, aktivizējot specifisku signalizācijas ceļu, ko sauc par nesalocītu proteīna reakciju (NPR), lai atjaunotu ET homeostāzi. NPR regulē trīs transmembrānas stresa segmenti: proteīnkināzei RNS līdzīgā ET kināze, aktivizējošs transkripcijas faktors-6 un inozitolam nepieciešams signalizācijas proteīns-1. Kumulatīvā reakcija uz šiem signalizācijas ceļiem bloķē translācijas uzsākšanu, lai samazinātu ET slodzi (Masarone *et al.*, 2018). Ir konstatēts, ka NPR stimulē c-Jun N-terminālā kināzi (Buzzetti *et al.*, 2016), kas izraisa spēcīgu iekaisumu un šūnu nāvi, palielinot proapoptotisko faktoru Bax and Bak ekspresiju no Bcl-2 ģimenes, lai veicinātu no mitohondriju atkarīgo šūnu nāvi (Ali & Zhang, 2018). Ja NPR nespēj atjaunot ET homeostāzi, ET stresa reakcija var būt aizkavēta, un hepatocītu apoptozi var izraisīt ET un mitohondriju stresa reakcijas vai citi neatkarīgi ceļi. ROS un oksidatīvais stress traucē ET darbībai, un Ca^{2+} izdalīšanās no ET. Ca^{2+} pārpalikums izraisa ārējās mitohondriju membrānas caurlaidību, kas savukārt palielina mitohondriju ROS izdalīšanos (Wang *et al.*, 2020). Oksidatīvais stress inducē regulējošo elementu saistošo proteīnu-1c aktivāciju un lipīdu uzkrāšanos. Tādējādi oksidatīvais stress un ET savstarpēji atkarīgi stimulē TG un holesterīna sintēzi un uzkrāšanos *de novo*, un kavē lipoproteīnu sekrēciju (Fujii *et al.*, 2018).

Insulīna rezistencei ir būtiska nozīme NATAS attīstībā, jo tā izraisa aknu lipogēneses palielināšanos un taukaudu lipolīzes inhibīciju, kam seko palielināta TS plūsma aknās (Caturano *et al.*, 2021). Insulīna rezistence izraisa samazinātu glikozes piegādi audos, kas izraisa perifēro lipolīzi un palielina brīvo TS daudzumu asinsritē. Pārmērīgs ogļhidrātu patēriņš un samazināta glikozes uzņemšana insulīna rezistentos muskuļos un taukaudos palielina hepatocītu iedarbību uz glikozes līmeni asinīs. Tā kā muskuļiem un taukaudiem attīstās samazināta jutība pret insulīnu, aizkuņģa dziedzerā beta šūnas sekretē paaugstinātu insulīna līmeni, lai uzturētu glikozes līmeņa homeostāzi asinīs. Aknas saglabā lielāku jutību pret insulīnu nekā taukaudi vai skeleta-muskuļu audi. Insulīns veicina brīvo TS un ogļhidrātu uzņemšanu aknās. Abus pārvērš TG un uzglabā aknu hepatocīti (Robinson & Shah, 2020). Insulīna rezistenci izraisa vairāki faktori, piemēram, interleikīns-6 un audzēja nekrozes faktors- α . Insulīna receptoru substrāta-1 serīna fosforilēšana ir viens no galvenajiem aspektiem, kas traucē insulīna signālceļus, izmantojot, piemēram, c-Jun N-terminālā kināzi-1 vai κ B kināzes- β inhibitoru (Yu *et al.*, 2016). Insulīna receptoru substrāti tiek fosforilēti, kad tie saistās ar receptoriem, kas pārraida insulīna signālu. Tajā pašā laikā tiek kavēta brīvo TS beta oksidācija, kas vēl vairāk veicina lipīdu uzkrāšanos aknās (Caturano *et al.*, 2021). Turklāt cilvēkiem ar NATAS un insulīna rezistenci ir samazināta jutība pret insulīnu ne tikai muskuļu līmenī, bet arī taukaudos un aknās, kas izraisa sarežģītākus lipīdu un glikozes vielmaiņas traucējumus (Li &

Wang, 2020). Divām svarīgām enzīmu sistēmām, acetil-CoA karboksilāzei un TS sintāzei, ir būtiska loma aknu TS sintēzē. Insulīns un glikoze var regulēt abus enzīmus (Caturano *et al.*, 2021). Paaugstināta glikozes koncentrācija aktivizē ogļhidrātu atbildes elementu saistošo proteīnu un sterīnu regulējošo elementu saistošo proteīnu-1c, lai regulētu acetil-CoA karboksilāzes un TS sintāzes ekspresiju, tādējādi veicinot *de novo* lipoģenēzi hepatocītos (Guo *et al.*, 2022). Hepatocītos lipīdu uzkrāšanās palielinās, un TG tiek izdalīti ļoti zema blīvuma lipoproteīnu veidā. Uzkrātie lipīdi tiek transportēti uz taukaudiem, samazinot adipocītu spēju uzglabāt lipīdus. Lipotoksicitāte pasliktina insulīna signālu pārraidi, izraisa oksidatīvus bojājumus un veicina iekaisumu un fibrozi (Chen *et al.*, 2017).

1.3. Diagnostika

Aknu funkciju testi

Riska faktori, piemēram, diabēts, metabolais sindroms un aptaukošanās rada lielāku risku pacientiem, kuri ir pakļauti NATAS attīstībai. Jāizmanto neinvazīvas metodes, lai noteiktu, vai pacientam ir NATAS risks, un jānosūta pacientus pie gastroenterologa vai hepatologa (Kelly & Wattacheril, 2019). NATAS bieži vien ir asimptomātiska pirms tās pārejas uz SH, kas var klīniski izpausties ar nespecifiskiem simptomiem: neskaidras sāpes labajā augšējā kvadrantā, nogurums (Wong *et al.*, 2019). Pašreizējās NATAS diagnostikas metodes ietver ultraskaņas diagnostiku, datortomogrāfiju, magnētiskās rezonanses attēlveidošanu, aknu biopsiju un laboratorijas testus. Lai gan ultraskaņai ir augsts mērenas un smagas aknu steatozes noteikšanas līmenis, vieglas aknu steatozes gadījumā tās jutīgums un specifiskums ir zems. Tādējādi ultraskaņu nevar izmantot, lai diagnosticētu SH vai fibrozi (Bril *et al.*, 2015). Datortomogrāfiju var izmantot arī, lai diagnosticētu NATAS ar tādu pašu jutīguma līmeni un specifiskumu kā ultrasonogrāfijai. Tomēr tas ir dārgi un ir saistīts ar starojuma iedarbību, kas ierobežo tā klīnisko pielietojumu (Hyodo *et al.*, 2017). Magnētiskā rezonanse ir visjutīgākā noteikšanas metode un tā var noteikt aptuveni 5% hepatocītu steatozes. Tomēr tā precizitāti var ietekmēt fibroze un smaga steatoze (Lee & Kim, 2019). Aknu biopsija ir “zelta standarts” NATAS diagnostikai, un to var izmantot, lai precīzi novērtētu aknu šūnu iekaisumu, aknu fibrozi un aknu steatozi. Tikmēr laboratoriskās pārbaudes var laicīgi prognozēt NATAS, ja asins analīzēs konstatēts paaugstināts aknu enzīmu līmenis un novērtēt kardiovaskulāro un citu bīstamu notikumu risku (Chalasanani *et al.*, 2018).

ALAT

ALAT ir transamināžu enzīms, kas agrāk bija pazīstams kā seruma glutamāta piruvāta transamināze. ALAT izraisa aminogrupas pārnesšanu no alanīna uz alfa-ketoglutarātu alanīna ciklā, hepatocītos veidojot piruvātu un glutamātu, kas ir svarīgi enerģijas ražošanai (Claus *et al.*, 2021). ALAT pastāv kā divas izoformas, kas ir relatīvi labi saglabātas ar līdzīgu audu sadalījumu: ALAT1 galvenokārt lokalizējas nierēs, aknās, taukos un sirdī, bet ALAT2 galvenokārt lokalizējas skeleta muskuļos un taukos. Lai gan pastāv imūntesti specifiskām ALAT izoformām, līdz šim tie vēl nav pierādījuši uzlabotu specifiskumu. Tā vietā kopējo seruma ALAT aktivitāti visbiežāk mēra kā hepatocelulāro bojājumu marķieri neklīniskos toksicitātes pētījumos (Kalas *et al.*, 2021). ALAT atrodas serumā un orgānu audos (īpaši aknās) un bieži lietots kā hepatocelulāro bojājumu marķieris. ALAT līmenis serumā ir paaugstināts šūnu nekrozes apstākļos, un tiek uzskatīts par NATAS indikatoru, ko definē kā aknu steatozi ar

tauku saturu vairāk nekā 5% no kopējā aknu svara (Shen *et al.*, 2018). ALAT parasti izmanto, lai pārbaudītu un noteiktu aknu darbības traucējumus un novērtētu to novirzes pakāpi. Īpaši infiltrācija aknās bojā normālu aknu šūnu darbību, izraisot aknu enzīmu izdalīšanos un paaugstināšanos asinīs (Visaria *et al.*, 2020). Aknās tas atrodas citozolā, kur tas katalizē aminoskābju metabolismu. ALAT līmeņa izmaiņas var būt patoloģiskas. Paaugstināšanās var liecināt par tiešu bojājumu vai iekaisumu, savukārt samazināšanās var atspoguļot sintētiskās spējas samazināšanos. ALAT ir iesaistīts glikozes-alanīna ciklā, kas rada substrātus glikoneoģenēzei un proteīnu sintēzei, tādējādi ALAT līmeņa paaugstināšanās normas robežās var atbilst palielinātai aknu funkcionalitātei (Smith *et al.*, 2013). Normālais ALAT diapazons vīriešiem ir no 29-33 IU/L un 19-25 IU/L sievietēm (Kalas *et al.*, 2021).

AST

AST, kas pazīstama arī kā glutamīn-oksaloetiķskābes transamināze, ir plaši izmantots bioķīmisks marķieris, lai noteiktu aknu un skeleta muskuļu bojājumu un iekaisuma pakāpi (Lee *et al.*, 2022). AST ir enzīms, kas tāpat kā ALAT ir atrodams aknās. AST normālais diapazons ir < 35 IU/L (Rohani *et al.*, 2020). AST galvenokārt atrodas aknās un sirdī, tomēr tas atrodas arī skeleta muskuļos, smadzenēs, aizkuņģa dziedzerī, eritrocītos, plaušās un nierēs. Ir divi līdzīgi AST izoenzīmi, kas lokalizēti citoplazmā un mitohondrijās. AST katalizē aminogrupas pārvešanu uz α -ketoglutārskābi, lai iegūtu glutārskābi. AST palielinās 12 h pēc aknu bojājuma, un maksimālais līmenis tiek novērots 24–48 h (Kobayashi *et al.*). AST veicina aminoskābju metabolismu, bet vissvarīgākā AST fizioloģiskā funkcija ir NAD⁺/NADH attiecības uzturēšana šūnās. AST ir būtisks partneris malāta-aspartāta transporta sistēmai, kas oksidē NADH citozolā, un samazina NAD⁺ mitohondriālajā matricā, lai atvieglotu attiecīgi glikolīzi un elektronu transportu (Lee *et al.*, 2022). AST ir nepieciešams intracelulārā Ca²⁺ līmeņa regulēšanai, saglabājot mitohondriju struktūras integritāti, kas savukārt ietekmē apoptozes potenciālu (Lee *et al.*, 2022).

ALP

ALP ir ar membrānu saistīts enzīms, kas katalizē fosfāta izdalīšanos, šķeļot fosfāta estera saiti (Levitt *et al.*, 2022). ALP var būt prognostiski nozīmīgs pacientiem ar NATAS (Ali *et al.*, 2021). Sārmainās fosfatāzes ir šūnu membrānas metaloenzīmi, un tie tiek sintezēti zarnās, aknās, kaulos, placentā un proksimālajos nieru kanāliņos. ALP aktivitāte galvenokārt ir atkarīga no aknām (Ray *et al.*, 2017). Parasti ALP ir piestiprināti pie plazmas membrānas ārējās virsmas un katalizē fosfātu esteru hidrolīzi no dažādiem substrātiem sārmainā vidē, veidojot organisko radikāļu un neorganisko fosfātu no tādām molekulām kā nukleotīdi, olbaltumvielas un alkaloīdi

(Rader, 2017). ALP aktivitāti parasti mēra, lai noteiktu tās aktivitātes pieaugumu. Paaugstināta ALP aktivitāte rodas grūtniecības, bērnības, Pedžeta slimības, un dažādu citu kaulu slimību gadījumā. Ļoti mazāka uzmanība ir pievērsta klīniskiem stāvokļiem, kas saistīti ar zemu vai samazinātu ALP aktivitāti cilvēkiem. Zemu ALP aktivitāti var izraisīt dažādi iemesli, piemēram, hipofosfatāzija, sirds ķirurģija un kardiopulmonālais apvedceļš, C un B12 vitamīna deficīts, un magnija deficīts (Ray *et al.*, 2017). Cinks un magnijs ir svarīgi šī fermenta līdzfaktori. Divvērtīgie joni, piemēram, Mg^{2+} , Co^{2+} un Mn^{2+} , ir ALP aktivatori, un Zn^{2+} ir metāla jonu sastāvdaļa. Aknās ALP ir citozoliska un atrodas hepatocītu kanālu membrānā. Lielākā daļa ALP (vairāk nekā 80%) tiek atbrīvota no aknām un kauliem, kā arī nelielos daudzumos no zarnām. Ir vairākas klīniskas metodes ALP līmeņa noteikšanai. Testi principā balstās uz fermenta spēju hidrolizēt fosfātu esterus. Visplašāk izmantotajā starptautiskajā metodē par substrātu kalpo p-nitrofenola fosfāts, bet kā buferis tiek izmantots aminospirts (Lowe *et al.*, 2022).

GGT

GGT ir klīniskajā praksē plaši izmantots diagnostikas tests aknu darbības funkciju noteikšanai (Park *et al.*, 2015). GGT tiek uzskatīta par aknu funkcionālo testu kopš sešdesmitajiem gadiem (Brennan *et al.*, 2022). GGT parasti izmanto, lai novērtētu hepatocītu bojājumus, un GGT ir ļoti saistīta ar NATAS sastopamību. Turklāt pētījumi liecina, ka paaugstināts GGT līmenis ir saistīts ar smagāku NATAS histoloģisko spektru, piemēram, ST un fibrozi (Li *et al.*, 2022). GGT ir enzīms, kas saistās ar plazmas membrānu un tiek ekspresēts nierēs, aknās, liesā, aizkuņģa dziedzerī, tievajās zarnās. GGT aknās galvenokārt atrodas aknu šūnu kapilārā pusē un žultsvada epitēlija šūnu membrānā (Oni *et al.*, 2020). GGT ir jutīgs aknu šūnu bojājumu un oksidatīvā stresa marķieris (Li *et al.*, 2018). GGT katalizē pirmo soli glutaciona ekstracelulārajā degradācijā (Kim *et al.*, 2018). GGT galvenā loma ir metabolizēt L-glutationu, kas var pārvērst aminoskābes par L-glutaciona prekursoru un veicināt dažu endogēnu vielu, piemēram, leukotriēna, prostaglandīnu un eksogēnas vielas saistīšanos ar L-glutationu, tādējādi paātrinot šūnu metabolismu un eksoogēnu vielu izdalīšanos. Turklāt GGT piedalās ROS ražošanā, izraisot DNS bojājumus un regulējot šūnu proliferāciju un apoptozi ar prooksidācijas palīdzību (Xing *et al.*, 2022).

AChE

Pēdējo 40 gadu laikā vairāki holīnesterāžu pētījumi ir izraisījuši straujo intereses pieaugumu, lai izpētītu to funkcijas, struktūras un fizioloģiskās lomas veselības un slimību jomā. Rezultātā iegūtie atklājumi norāda uz holīnesterāžu būtisku lomu gan nervu sistēmā, gan

citās ķermeņa sistēmās, un ne-neironālas funkcijas, piemēram, apoptozes un iekaisuma regulēšana. Šī milzīgā interese ļauj daudz dziļāk izprast AChE struktūru un funkcijas, piemēram šūnu un molekulārajā bioloģijā, ģenētikā un epiģenētikā (Tsim & Soreq, 2013). AChE ir holīnērgisks enzīms, kas galvenokārt atrodams postsinaptiskos neiromuskulāros savienojumos, īpaši muskuļos un nervos. AChE hidrolizē ACh holīnā un acetātā pēc ACh receptoru aktivācijas postsinaptiskajā membrānā (Lionetto *et al.*, 2013). AChE galvenā loma ir pārtraukt neironu transmisiju un signālu pārraidi starp sinapsēm, lai novērstu ACh izkliedi un receptoru aktivāciju (Trang., 2023). Tas ir nepieciešams normālai centrālās un perifērās nervu sistēmas darbībai (Lionetto *et al.*, 2013). AChE aktivitātes testu var izmantot ārstēšanas efektivitātes pārbaudei, piemēram, Alcheimera slimības terapijai (Pohanka *et al.*, 2011). Holīnesterāzes aktivitāte serumā ir paaugstināta NATAS gadījumā, jo parasimpātiskās nervu sistēmas aktivitāte mazina ļoti zema blīvuma lipoproteīna TG sekrēciju un palielina TG uzkrāšanos aknās. Parasimpātiskā neurotransmitera AChE inhibīcija var nedaudz ietekmēt aknu lipīdu metabolismu (Yokota *et al.*, 2014). ACh ir iesaistīts dažādās šūnu bioloģiskās darbības, piemēram, šūnu proliferācijā, šūnu diferenciācijā, šūnu migrācijā un šūnu imūnreakcijā. Nesenā Wang *et al.* pētījumā tika novērota, ka ACh uzkrāšanās audzēja mikrovidē tieši vai netieši veicina audzēja augšanu. AChE var noārdīt ACh un samazināt ļaundabīgo aknu vēža attīstības risku, tāpēc AChE ir identificēts kā prognostisks aknu vēža marķieris (Wang *et al.*, 2021). Tā kā ACh ir pretiekaisuma molekula, tad, paaugstinoties AChE koncentrācijai, samazinās ACh līmenis. Tas izraisa ACh izraisītu pretiekaisuma darbību samazināšanos. Tādējādi paaugstināta AChE koncentrācija plazmā, leukocītu, sarkano asins šūnu, trombocītu un citu audu netieši atspoguļo samazinātu ACh koncentrāciju un tādējādi palielina lokālo un sistēmisko iekaisumu. Tādēļ ir pamatoti domāt, ka AChE aktivitāte palielinās visos iekaisuma apstākļos pat tad, ja IL-6, TNF- α un citu iekaisuma marķieru koncentrācija plazmā un audos nav ievērojami paaugstināta. AChE aktivitātes palielināšanās plazmā, leukocītos (tostarp makrofāgos un T šūnās), trombocītos un citos audos veido uzticamu, unikālu un specifisku marķieri akūta, hroniska un sistēmiska iekaisuma noteikšanai (Das, 2012).

Bilirubīns

Bilirubīns ir oranži dzeltens žults pigments, kas rodas dažādu hēmu saturošu olbaltumvielu sadalīšanās rezultātā, īpaši hemoglobīna katabolisma rezultātā. Hēms tiek sadalīts biliverdīnā, kas tiek pārveidots par nekonjugētu vai netiešu bilirubīnu. Bilirubīns ir ūdenī nešķīstošs un nonāk asinsritē saistīts ar albumīnu. Visi aknu bojājumi izraisa hepatocītu šūnu skaita samazināšanos, kas var izraisīt hiperbilirubinēmiju. Bilirubīns ir vispāratzīts marķieris, ko regulāri iekļauj bioķīmiskajos testos pacientiem ar aknu darbības traucējumiem

vai kādu citu slimību. Tomēr bilirubīns nav jutīgs vai specifisks aknu darbības marķieris, tāpēc precīzai diagnostikai ir nepieciešama rūpīga testa rezultātu interpretācija (Ruiz *et al.*, 2021). Normāla bilirubīna koncentrācija ir robežās no 0,30 līdz 1,20 mg/dL. Paaugstināts bilirubīna līmenis var liecināt par dzelti, hepatītu, cirozi, Gilberta sindromu, un citām nopietnām slimībām. Ja bilirubīna līmeni uzrauga ciešā korelācijā ar citiem aknu enzīmu testiem, tas var būt noderīgi, lai novērtētu, vai paaugstinātu bilirubīna līmeni var saistīt ar hemolīzi vai citiem nehemolītiskiem aknu darbības traucējumiem (Young *et al.*, 2022). Bilirubīns ir svarīgs antioksidants un citoprotektīvs līdzeklis fizioloģiskos apstākļos, un tam ir svarīga nozīme oksidatīvā stresa novēršanā, jo tas var efektīvi nomākt ūdeņraža peroksīda brīvos radikāļus, inhibējot seruma zema blīvuma lipoproteīna holesterīna peroksidāciju (Shu *et al.*, 2022). Zema bilirubīna koncentrācija ir saistīta ar labvēlīgu antioksidantu aktivitāti, un augsts cirkulējošā bilirubīna līmenis ir saistīts ar nopietnu toksicitāti (Ma *et al.*, 2022). Lai gan bilirubīns ir vispārāzīts aknu darbības marķieris, tas ne vienmēr identificē bojājumu šajā orgānā. Tāpēc, lai noteiktu precīzu diagnozi, bilirubīna koncentrācijas izmaiņas jānovērtē saistībā ar pacienta anamnēzi, izmaiņu pakāpi un vienlaicīgu bioķīmisko izmaiņu modeli (Ruiz *et al.*, 2021).

Albumīns

Cilvēka seruma albumīns ir proteīns, un tas ir visizplatītākais proteīns cilvēka asins plazmā ar koncentrāciju aptuveni 35–52 g/L. Viena no svarīgākajām albumīna fizioloģiskajām funkcijām ir endogēno un eksogēno savienojumu transportēšana. Tas ietver savienojuma saistīšanu, transportēšanu plazmā un savienojuma izdalīšanos mērķa audos (Paar *et al.*, 2021). Albumīns ir daudzfunkcionāls proteīns, kam ir nozīme antioksidācija un pretiekaisuma darbība, endotēlija stabilizācija, prettromboze un kapilāru caurlaidības regulēšana (Sun *et al.*, 2019). Sakarā ar samazinātu aknu spēju veikt proteīnu sintēzi, pacientiem ar aknu cirozi un ascītu parasti ir pazemināts seruma albumīna līmenis (hipoalbuminēmija). Turklāt aknu ciroze ne tikai samazina albumīna līmeni, bet arī izraisa izteiktas izmaiņas tā molekulārajā integritātē. Šīs izmaiņas korelē ar cirozes smagumu un pasliktina vairākas albumīna funkcijas. Pacientiem ar dekompensētu cirozi un pacientiem ar akūtu hronisku aknu mazspēju albumīna saistīšanās efektivitāte ar daudziem tā ligandiem ir ievērojami samazināta (Grüingreiff *et al.*, 2021). Ir ziņots, ka albumīna saistīšanās funkcija ir agrīns aknu bojājuma indikators hepatīta un aknu cirozes gadījumā. Tomēr tā loma NATAS pacientiem nav zināma (Sun *et al.*, 2020).

1.4. Taukaino aknu slimības ārstēšanas iespējas

Svara zudums, diētas un fiziskās aktivitātes

Aptaukošanās ir svarīgs riska faktors NATAS un NASH attīstībā, tādējādi svara zudums ir pirmās izvēles ārstēšanas iespēja šim slimības procesam. Vairāki pētījumi ir parādījuši svara zaudēšanas pozitīvo ietekmi uz NATAS uzlabošanu. Šie pētījumi parādīja aknu histoloģijas uzlabošanu. Nepieciešamais svara zuduma apjoms NATAS ārstēšanā vēl nav noteikts, taču pierādījumi liecina, ka histoloģijas uzlabošanai ir nepieciešams svara zudums par 5% NATAS vai 7–10% NASH gadījumā (Ganguli *et al.*, 2019). Tika konstatēts, ka diētas un fiziskās aktivitātes kombinācija ir visefektīvākā NATAS uzlabošanā. Apvienojot vingrinājumus ar kaloriju ierobežojumu, var veiksmīgi ietekmēt NATAS, palielinot enerģijas patēriņu, samazinot lipīdu pārslodzi un uzlabojot vielmaiņas homeostāzi. Randomizētā kontrolētā pētījumā vingrinājumu kombinācija ar diētu vēl vairāk samazināja intrahepatisko tauku saturu. Tāpat pētījumā ziņoja, ka vingrinājumi un uztura paradumu maiņa var uzlabot glikozes metabolismu NATAS pacientiem (Rong *et al.*, 2023). Visiem pacientiem ar NATAS jāizvairās no alkohola lietošanas (pat mērenas) un, ja iespējams, no hepatotoksisku zāļu lietošanas. Arī jāiesaka izvairīties no cigarešu smēķēšanas un fruktozi saturošiem dzērieniem un pārtikas produktiem. Vingrinājumi uzlabo aknu un sistēmisko insulīna jutību, tādējādi uzlabojot insulīna darbību un samazinot *de novo* lipogēzi. Vingrinājumiem ir arī tieša ietekme uz glikēmijas kontroli un lipīdu plūsmu, palielinot ļoti zema blīvuma lipoproteīnu klīrensu, tādējādi veicinot aknu tauku satura samazināšanos (Mantovani & Dalbeni, 2021).

Svara samazināšana ar ķirurģiskiem pasākumiem

Bariatriskās operācijas tiek veiktas, lai samazinātu svaru pacientiem ar aptaukošanos. Sakarā ar saistību starp aptaukošanos un NATAS attīstību pētnieki pēta šāda veida operācijas NATAS ārstēšanā. Ir zināms, ka no hepatocītiem iegūto ekstracelulāro pūslīšu līmenis atspoguļo aknu fibrozes un steatozes stāvokli. Šī marķiera samazināšanās tiek novērota pēc svara zaudēšanas operācijām, kas var atspoguļot NATAS stāvokļa uzlabošanu (Kosmalski *et al.*, 2023). Bariatriskā ķirurģija sastāv no ķirurģiskām procedūrām, kas izraisa svara zudumu, ierobežojot barības daudzumu kuņģī un veicinot barības vielu malabsorbciju. Visā pasaulē visizplatītākās bariatriskās ķirurģijas procedūras ir laparoskopiska piedurknes gastrektomija. Bariatriskā ķirurģija spēj uzlabot insulīna rezistenci, aptaukošanos, hipertensiju, dislipidēmiju. Svarīgi, ka bariatriskā ķirurģija var ievērojami uzlabot visas NATAS histoloģiskās pazīmes, tostarp fibrozi (Mantovani & Dalbeni, 2021).

Farmakoloģiskās ārstēšanas iespējas

Pamatnostādnēs ieteiktās farmakoloģiskās ārstēšanas iespējas NATAS pacientiem ir ierobežotas, un pašlaik Eiropas un Amerikas Aknu pētījumu asociācija atsevišķiem pacientiem iesaka tikai E vitamīnu un pioglitazonu. Neatkarīgi no E vitamīna un pioglitazona pēdējos gados ir publicēti vairāki pētījumi, kas pēta dažādus medikamentu veidus NATAS ārstēšanai, un tie ir parādījuši daudzsoļus rezultātus. Tomēr neviens vēl nav iekļūvis valsts vai starptautiskās vadlīnijās (Paternostro & Trauner, 2022).

E vitamīns

E vitamīna sastāvā ir astoņi tokoferoli un α -tokoferols ir visaktīvākais. Tā klātbūtne šūnu membrānu fosfolipīdu divslānī ļauj novērst šūnu sastāvdaļu neenzimātisko oksidāciju ar brīvajiem radikāļiem. E vitamīns var arī inhibēt profibrotisku aktivitāti un samazināt kodolfaktora- κ B mediētos iekaisuma ceļus aknās. Preklīniskie *in vitro* un *in vivo* pētījumi ir parādījuši, ka divos fibrozes modeļos E vitamīns var uzlabot aknu bojājumus, bloķējot gan apoptotiskos ceļus, gan mitohondriju toksicitāti (Hardy *et al.*, 2015). Turklāt E vitamīns mijiedarbojas ar citiem šūnu komponentiem un var palīdzēt veicināt antioksidantu vidi. E vitamīns pastiprina arī citu antioksidantu enzīmu, piemēram, katalāzes un glutaciona peroksidāzes darbību. Turklāt E vitamīnam ir spēja nomākt peroksidāciju un kavēt transformējošā augšanas faktora-beta ekspresiju, kas ir saistīta ar aknu fibrozi un hepatocītu apoptozi, aktivizējot aknu zvaigžņu šūnas (Perumpail *et al.*, 2018). E vitamīns ir novērtēts vairākos NATAS eksperimentālos modeļos. Pelēm ar NASH α -tokoferols mazināja izraisītu aknu bojājumu un nomāca izraisītu oksidatīvo stresu un ar iekaisumu saistītas patoloģijas, piemēram, steatozi un nekrozes iekaisumu. Pētījums, kurā tika izmantots SH modelis, parādīja, ka E vitamīns atjauno glutaciona līmeni aknās. Turklāt α -tokoferols aktivizē adiponektīna promotoru, izmantojot PPAR reaģējošu elementu. Šis atklājums var būt saistīts ar mehānismu, ar kura palīdzību E vitamīns uzlabo jutību pret insulīnu. E vitamīns uzlabo lipotoksicitātes izraisītu aknu steatozi, nomācot aknu lipīdu uzkrāšanos un peroksidāciju. Tomēr E vitamīns ir kontrindicēts pacientiem ar cukura diabētu, kas ierobežo tā lietderību (Nagashimada & Ota, 2019).

Pioglitazons

No insulīna sensibilizējošajiem līdzekļiem, ko izmanto NASH ārstēšanai, tiazolidīndioni ir pētīti visvairāk un uzrādījuši vislabvēlīgākos rezultātus. Tiazolidīndioni, piemēram, pioglitazons palielina TS oksidāciju un samazina TS veidošanos aknās. Jutība pret insulīnu uzlabojas gan perifēriski, gan aknās (Lam & Younossi, 2019). Pioglitazonam ir vājš PPAR α

agonisms, kas var izskaidrot labvēlīgo ietekmi uz NATAS salīdzinājumā ar citiem PPAR γ agonistiem (Lange *et al.*, 2022). Vairāki pētījumi un metaanalīzes ir konsekventi pierādījuši aknu asins analīžu un aknu biopsijas pazīmju uzlabošanos pēc pioglitazona 30–45 mg/dienā devas ievadīšanas, salīdzinot ar placebo (Francque *et al.*, 2021). Arun *et al.* pētījumā pioglitazonu salīdzināja ar placebo un E vitamīnu. Pioglitazons ievērojami samazināja aknu steatozi un aknu šūnu bojājumus un iekaisumu (Sanyal *et al.*, 2010). Pioglitazons (45 mg/dienā) bija īpaši efektīvs NASH ārstēšanā pacientiem ar prediabētu vai 2. tipa cukura diabētu. Attiecībā uz blakusparādībām pioglitazona terapija izraisa zināmu ķermeņa svara pieaugumu, šķidrumsa aizturi un kaulu zudumu (Cusi *et al.*, 2016).

Daudzsološās zāles

Statīni

Statīni ir ieteicami kā pirmās līnijas terapija sirds un asinsvadu slimību primārai profilaksei. Ārsti bieži ir nobažījušies par paaugstinātu transamināžu līmeni pacientiem, kuri lieto statīnus (Dyson & Day, 2014). Tomēr statīni ir droši pacientiem ar aknu slimībām, un daudzie pētījumi faktiski parādīja, ka statīni uzlabo aknu enzīmus un kardiovaskulāros rezultātus pacientiem ar paaugstinātiem aknu funkcionāliem testiem NATAS dēļ (Athyros *et al.*, 2010). Lai gan perspektīvie pētījumi, kas novērtē statīnu drošību un efektivitāti, ir ļoti nepieciešami apstiprināšanai, pašreizējā dogma ir tāda, ka pacienti ar NATAS ir jāārstē ar statīniem paaugstināta kardiovaskulārā riska dēļ (Bril & Cusi, 2017). Interese par antihiperlipidēmisko līdzekļu lietošanu NATAS gadījumā ir saistīta ar dislipidēmijas lomu metaboliskajā sindromā un tās saistību ar NATAS. Statīni konkurētspējīgi inhibē aknu hidroksimetilglutarilkoenzīma A reduktāzi, tādējādi samazinot holesterīna veidošanos un samazinot holesterīna līmeni serumā. Statīnu lietošana pacientiem ar hronisku aknu slimību ir radījusi bažas par iespējamu hepatotoksicitāti, taču lielākā daļa piekrīt, ka nozīmīgs hepatotoksicitātes risks biežums ir ārkārtīgi reti sastopams un statīnu lietošana aknu slimības gadījumā ir droša (Ganguli *et al.*, 2019). Izmēģinājuma pētījums ar atorvastatīna terapiju parādīja ievērojamu aminotransferāzes un lipīdu līmeņa pazemināšanos serumā pacientiem ar NATAS. Tomēr šajā pētījumā netika novērtēti histoloģiskie rezultāti (Domínguez *et al.*, 2006).

Silimarīns

Silimarīns gadsimtiem ilgi ir droši izmantots kā dabīgs augu izcelsmes līdzeklis aknu darbības traucējumu ārstēšanai (Gillesen., 2020). Silimarīns ir polifenola flavonoīds, kas ekstrahēts, izmantojot 95% etanolu, no piena mārdadžu sēklām (Mitra, 2018). Silimarīna

hepatoprotektīvās un antioksidanta īpašības ir saistītas ar fenola grupu (Hashem *et al.*, 2021), kas atrodas silimarīnā un mijiedarbojas ar ROS, kas rodas metabolisma laikā aknās, veidojot stabilu, netoksisku savienojumu (Gillissen *et al.*, 2022). Ir pierādīts, ka silimarīna antioksidanta īpašības atjauno NAD⁺ homeostāzi, sirtuīna-1 aktivitāti un AMP aktivētās proteīnkināzes- α ceļu, lai uzlabotu poli-(ADP-ribozes)-polimerāzes funkciju (vissvarīgākie regulējošie ceļi, kas saistīti ar oksidatīvo stresu). Turklāt silimarīna antioksidanta spējas uzlabo aknu lipīdu homeostāzi, samazinot *de novo* lipoģenēzi, samazinot peroksisomu proliferatora aktivēto receptoru- γ , acetil-CoA karboksilāzes un TS sintāzes darbību (Tighe *et al.*, 2020). Silimarīna antifibrotiskā aktivitāte galvenokārt ir saistīta ar tā spēju inhibēt aknu zvaigžņu šūnu pārvēršanos miofibroblastos, inhibējot fibrogēnos ceļus, piemēram, tos, kas saistīti ar citoskeleta veidošanos, profibrogēno kolagēnu un elektronu pārnesei ķēdēm. Konkrēti, silimarīns samazina TGF- β 1 mRNS, inhibē kodola transkripcijas faktoru NF-kB un attiecīgi samazina iekaisuma citokīnus aknu parenhīmā, kā arī novērš aknu zvaigžņu šūnu stimulāciju (Bahmani *et al.*, 2015). Silimarīna antihepatotoksiskais mehānisms ir saistīts ar tā stabilizējošu iedarbību uz hepatocītu šūnu membrānām (Wang *et al.*, 2018), novēršot toksisku ķīmisku vielu iekļūšanu šajās šūnās. Silimarīns saistās ar receptoriem, kas atrodas uz šīm membrānām, kavējot toksīnu saistīšanos šajās vietās, samazinot zāļu izraisītos hepatocelulāros bojājumus (Salamone *et al.*, 2012). Ir ziņots, ka ārstēšana ar silimarīnu efektīvi samazina paaugstinātu aknu enzīmu līmeni dažādās pacientu grupās, tostarp pacientiem ar NATAS, NASH vai pacientiem, kuri tiek ārstēti ar potenciāli hepatotoksiskām zālēm (Hashem *et al.*, 2021). Pacientiem, kuri tika ārstēti ar silimarīnu, tika ziņots par statistiski nozīmīgu ALAT un AST līmeņa pazemināšanos metaanalīzē, ko veica Avelar *et al.* (Avelar *et al.*, 2017) Silimarīna terapeitisko iedarbību ierobežo tā zemā šķīdība ūdenī un vājā uzsūkšanās zarnās. Silimarīns ir viegli noārdāms, jo tas ir jutīgs pret vides faktoriem, piemēram, gaismu, siltumu un skābekli (Robert *et al.*, 2021).

Metformīns

Metformīnu ieviesa klīniskajā praksē 1950. gados, un to plaši izmanto kā pirmās izvēles līdzekli pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu. Metformīna kā pretdiabēta līdzekļa efektivitāte ir izskaidrojama ar tā spēju pazemināt glikozes līmeni asinīs, samazinot glikoneoģenēzi aknās, stimulējot glikozes uzņemšanu muskuļos un palielinot TS oksidāciju taukaudos (Mazza *et al.*, 2012). Tā kā metformīns ietver vairākus molekulārus glikozes metabolisma un pretiekaisuma iedarbības mehānismus, metformīns ir viens no interesantākajiem medikamentiem NATAS progresēšanas iespējamai ārstēšanai vai kontrolei. Daudzi pētnieki ir veikuši virkni eksperimentu ar dzīvniekiem un klīniskus pētījumus par metformīna efektivitāti NATAS

ārstēšanā (Huang *et al.*, 2022). Ir pierādīts, ka aknās metformīns inhibē mitohondriju elpošanas ķēdes kompleksu I un aktivizē AMP aktivēto proteīnkināzi – procesus, kas saistīti ar tā spēju inhibēt aknu lipoģenēzi un glikoneoģenēzi, palielinot aknu jutību pret insulīnu. Šie atklājumi ir mudinājuši pētīt metformīnu kā NATAS farmakoloģisko ārstēšanu (Hakkak *et al.*, 2021). Glikozes līmeni pazeminošās iedarbības dēļ metformīns, iespējams, zināmā mērā atbrīvo hepatocītus no substrāta pārslodzes, kas ir SH patoģenēzes cēlonis, un ir saistīts ar oksidatīvā stresa rašanos. Metformīna glikozes līmeni pazeminošā iedarbība galvenokārt ir saistīta ar tā hepatocītu glikoneoģenēzes inhibīciju. Ir pierādīts, ka metformīns regulē glikoneoģenēzi, regulējot hepatocītu redoks stāvokli. Tas veicina samazinātu citozola daudzumu, lai gan šis efekts varētu būt mitohondriju elpošanas kompleksa I inhibīcijas blakusprodukts. Metformīna izmainītais hepatocītu redoks stāvoklis var mazināt oksidatīvo stresu, novēršot NATAS progresēšanu (Zhang *et al.*, 2021).

1.5. *In vitro* aknu pētniecības metodes

Cilvēka aknu šūnu līnijas

Cilvēka šūnu līnijas ir iegūtas no izdalītiem audzēja audiem (piemēram, HepG2, HepaRG vai HuH7 hepatomas šūnu līnijām) vai radītas, ģenētiski manipulējot ar primārajām aknu šūnām (Xu., 2021). Šūnu līniju galvenās priekšrocības ir to neierobežotais augšanas potenciāls un stabils fenotips visā kultivēšanas laikā. Tomēr to audzēja fenotipa dēļ aknu šūnu līnijas parasti tiek mainītas noteiktās vielmaiņas funkcijās (Ramboer *et al.*, 2014).

Viena no visplašāk izmantotajām aknu šūnu līnijām cilvēka NATAS modelēšanai ir HepG2 šūnu līnija, kas iegūta no hepatocelulārās karcinomas. HepG2 šūnas ekspresē un izdala dažādus galvenos aknu plazmas proteīnus, tostarp albumīnu, un uzrāda vairākas hepatocītu specifiskas reakcijas uz vides stimuliem, padarot šūnas piemērotas hepatocītu funkciju modelēšanai *in vitro*. HepG2 šūnām, kas apstrādātas ar dažādām oleīnskābes un palmitīnskābes attiecībām, attīstās dažādi steatozes fenotipi, lielāka daļa oleīnskābes izraisa labdabīgu hronisku steatozi, bet lielāka palmitīnskābes daļa izraisa nozīmīgāku toksisku un apoptotisku iedarbību šūnās (Wang *et al.*, 2022).

Primārie cilvēka hepatocīti

Primārie cilvēka hepatocīti tiek uzskatīti par tuvākajiem *in vitro* modeļiem cilvēka aknām. Hepatocīti tiek iegūti, sadalot aknu audus, un tiek saglabāti kultūrai specifiskās aknu funkcijās: glikogēna sintēzē, lipīdu metabolisms, urīnvielas un albumīna ražošanā kā arī membrānu transportproteīnu funkcionālā ekspresija. Tāpēc primārie cilvēka hepatocīti ir ierosināti kā *in vitro* modelis dažādām hepatoloģijas jomām, piemēram, farmakoloģiskiem un toksikoloģiskiem pētījumiem un aknu slimību modelēšanai, tostarp NATAS. Tomēr to plašo izmantošanu kavē ierobežotā aknu audu pieejamība, lielā starpdonoru atšķirība, un progresējošs hepatocītu funkcionalitātes zudums kultivēšanas laikā (Pelechá *et al.*, 2022). Pētnieki zāļu mijiedarbības, zāļu metabolisma un zāļu toksicitātes pētījumos, jo īpaši dod priekšroku primārajiem cilvēka hepatocītiem, jo to sekrēcijas īpašības un vielmaiņas enzīmu aktivitātes ir salīdzināmas ar *in vivo* hepatocītu īpašībām, un tās var droši atspoguļot *in vivo* aknu īpašības. Tomēr to funkcionālo īpašību stabila izpausme ir ļoti atkarīga no mikrovides signālu regulēšanas, kas nozīmē, ka primāriem cilvēka hepatocītiem divdimensiju (2D) vidē ātri samazinās šūnu aktivitāte un notiek šūnu membrānas polaritātes zudumu un fenotipiskas izmaiņas (Ma *et al.*, 2023)

2D šūnu kultūras modeļi

Monokultūras

Visbiežāk izmantotais šūnu kultūras veids ir 2D modelis. Steatozi var izraisīt, pievienojot šūnu barotnei brīvās TS, īpaši oleīnskābi vai palmitīnskābi (Aoudjehane *et al.*, 2020). Hepatocītu indukcija ar brīvajām TS izraisa TG uzkrāšanos to citoplazmā, kas galu galā izraisa ER stresu, iekaisumu un šūnu nāvi, kas visas ir galvenās NASH pazīmes (Lebeaupin *et al.*, 2018). Hepatocītu 2D monokultūra ļauj pētīt visus galvenos vielmaiņas ceļus, proti, ogļhidrātus, lipīdus un aminoskābes (Green *et al.*, 2015). Tas ir piemērots arī preklīniskai zāļu pārbaudei, lai novērtētu zāļu efektivitāti un šūnu toleranci (Boeckmans *et al.*, 2020).

Kopkultūras

2D kopkultūras modeļi tiek izmantoti, lai pētītu savstarpējo mijiedarbību starp hepatocītiem un neparenhīmas šūnām *in vitro*. Vienā vidē tiek audzēti dažādi šūnu veidi, un steatozi var izraisīt pievienojot barotnei brīvās TS. Viens no īpaši interesējošiem modeļiem ir hepatocītu kopkultūra ar aknu zvaigžņu šūnām, kas ir galvenie fibrozes efektori NATAS gadījumā (Giraudi *et al.*, 2015). Primāro hepatocītu kopkultūra ar Kupfera vai endotēlija šūnām ir spēcīgs instruments, lai novērtētu mehānismus, ar kuriem brīvās TS izraisa iekaisuma procesus *in vitro* (Suurmond *et al.*, 2019). Tomēr kopkultūru ir diezgan grūti īstenot, jo, piemēram, ir nepieciešama augšanas barotnes optimizācija, lai izvēlētos barotni, kas vislabāk uztur dažādas šūnu populācijas. Cilvēka šūnas ir arī slikti pieejamas, radot vēl vienu sarežģījumu kopkultūras modeļiem. Visu šo iemeslu dēļ šie modeļi literatūrā ir reti sastopami (Müller & Sturla, 2019).

Aknu sferoīdi un organoīdi

Pēdējos gados pētījumi ir vērsti uz trīsdimensiju (3D) šūnu modeļu izstrādi, ko var iegūt gan no pacientu biopsijām, gan no komerciāli pieejamām 2D šūnu līnijām. Salīdzinot ar parastajām 2D šūnu kultūrām, 3D sistēmas nodrošina precīzāku *in vivo* procesu un mikrovides saglabāšanu, kurā audzējs attīstās, ļaujot novērtēt vairākus bioloģiskos aspektus, ieskaitot proliferāciju, morfoloģiju un šūnu-mikrovides mijiedarbību. Vienu no pirmajām atklātajām 3D sistēmām attēlo sferoīds, trīsdimensiju šūnu agregāts ar sfērisku formu, kas bagātināts ar cilmes šūnu līdzīgu populāciju. Sferoīdus var ražot no primārajām kultūrām vai šūnu līnijām, kas kultivētas kā vienas vai vairāku šūnu suspensijas (De Siervi & Turato, 2023). Sferoīdu kultūra tiek uzskatīta par vislabāko 3D kultivēšanas modeli (Calitz *et al.*, 2018).

Organoīdi ir jauni pētniecības instrumenti, kas tiek definēti kā mākslīgi audzētas šūnu masas, kas atgādina miniatūrus orgānus. Aknu organoīdus iegūst, izolējot no aknu cilmes šūnu nišām, lai veidotu nelielas pašorganizējošas 3D struktūras, kas imitē daudzas dabiskas aknu funkcijas (Wu *et al.*, 2019).

Lai izveidotu cilvēka aknu organoīdus, cilvēka pluripotentās cilmes šūnas tiek diferencētas epitēlija un mezenhimālās līnijās, veidojot sferoīdus. Iegūtie cilvēka aknu organoīdi ir pašorganizētas šūnu kopas, kas ietver aknu epitēlija šūnas (holangiocītus un hepatocītus) un hepatocītu neparenhīmas šūnas (zvaigžņu, cilmes un Kupfera šūnas) (Ouchi *et al.*, 2019). Kad šie cilvēka aknu organoīdi tiek pakļauti brīvo TS iedarbībai, hepatocītos attīstās steatoze un balonēšana, Kupfera šūnas izdala pro-iekaisuma citokīnus (Kostrzewski *et al.*, 2017). Tādējādi cilvēka aknu organoīdi šķiet daudzsoļi instrumenti patofizioloģiskajiem pētījumiem NATAS gadījumā. Salīdzinot ar 2D šūnu kultūru, organoīdu 3D raksturs var vairāk atspoguļot dabiskos fizioloģiskos procesus, tostarp cilmes šūnu diferenciāciju, šūnu kustību un šūnu mijiedarbību. Turklāt organoīdi var tikt plaši kultivēti, kā arī saglabāt genomikas stabilitāti, padarot iespējamu ilgtermiņa uzglabāšanu un augstas caurlaidības skrīningu (Kim *et al.*, 2020).

3D šūnu kultūras modeļi

3D šūnu kultūra kolagēna gēla

1989. gadā Dunn *et al.* pirmo reizi ziņoja par žurku primāro hepatocītu kultūru starp divām kolagēna gēla slāņiem, un parādīja, ka tā labāk imitē *in vivo* aknu mikrovidi salīdzinājumā ar vienslāņa kultūru uz kolagēna gēla. Hepatocīti šajā kultūrā *in vivo* var uzturēt aknu specifiskās funkcijas, piemēram, albumīna sekrēciju, urīnvielas sekrēciju, CYP aktivitāti, un tiek atzīti par zelta standartu primāro hepatocītu kultivēšanai *in vitro* (Panwar *et al.*, 2021). Nesen tika izstrādāts sarežģīts 3D modelis, kurā hepatocīti tiek kultivēti kopā ar aknu sinusoidālajām endotēlija šūnām kolagēna gēlos, lai imitētu aknu lobulāro arhitektoniku (Bale *et al.*, 2014). Tomēr šajā modelī šūnu un šūnu mijiedarbību var paslēpt vai bloķēt kolagēna biežuma dēļ (Janorkar *et al.*, 2011).

Griezumu slāņu modelis

Iekaisums ir galvenā iezīme, lai atšķirtu SH no vienkāršas steatozes. Tādējādi cilvēka precīzi izgrieztas aknu slāņi, kas saglabā aknās infiltrējošās imūnās šūnas, piemēram, limfocītus un makrofāģus, ļauj pētīt izmaiņas, kas novērotas dažādos NATAS posmos, un pārbaudīt jaunu savienojumu terapeitisko efektivitāti (Parthasarathy *et al.*, 2020). Aknu steatozi var izraisīt,

pievienojot brīvās TS aknu slāņu barotnei, kā rezultātā aktivizējas iekaisums un fibroģenēze neparenhīmas šūnās. Šis modelis ir arī labi piemērots, lai saprastu, vai intrahepatisko lipīdu uzkrāšanos var modulēt, izmantojot epigēnētiskas manipulācijas (Palma *et al.*, 2019).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Pētāmās vielas

2.1. tabula

Pētāmās vielas

Nosaukums	Kataloga numurs	Ražotājs	Ražotājvalsts
Atorvastatīns	344423-98-9	Sigma-Aldrich	ASV
Celekoksibs	169590-42-5	Sigma-Aldrich	ASV
Diklofenaks	15307-86-5	Sigma-Aldrich	ASV
Metformīns	1115-70-4	Sigma-Aldrich	ASV
Neostigmīns	114-80-7	Sigma-Aldrich	ASV
Nimesulīds	51803-78-2	Sigma-Aldrich	ASV
Silimarīns	65666-07-1	Sigma-Aldrich	ASV
Simvastatīns	79902-63-9	Sigma-Aldrich	ASV
HepG2 šūnu līnija	HB-8065	ATCC	ASV

2.2. Reaģentu komerciāli pieejamie komplekti

AST aktivitātes komerciālais komplekts, kataloga Nr. MAK055-1KT (Sigma-Aldrich, ASV):

- Testa buferis (25 ml)
- Enzīmu maisījums (liofilizēts, 1 flakons)
- Izstrādātājs (liofilizēts, 1 flakons)
- Substrāts (liofilizēts, 1 flakons)
- Glutamāta standarts (0,1 M tilpums 0,1 ml)
- Pozitīvā kontrole (liofilizēta, 1 flakons)

ALP komerciālais komplekts, kataloga Nr. MAK447-1KT (Sigma-Aldrich, ASV):

- Pārbaudes buferšķīdums (pH 10,5 tilpums 50 ml)
- Mg acetāts (0,2 M tilpums 1,5 ml)
- pNPP šķīdums (1 M tilpums 600 µL)
- Kalibrators (Tartrazīns tilpums 10 ml)

ACh/AChE komerciālais komplekts, kataloga Nr. A12217 (Thermo-Scientific, Vācija):

- *Amplex Red* reaģents (MW = 257), pieci flakoni, katrs satur 1 mg

- Bezūdens dimetilsulfoksīds (DMSO tilpums 1,3 ml)
- Mārrutku peroksidāze (200 vienības)
- Ūdeņraža peroksīds (H₂O₂), 500 μL stabilizēta ~ 3% šķīduma
- 5X reakcijas buferis (28 ml 250 mM)
- Holīna oksidāze no *Alcaligenes sp.* (12 vienības)
- ACh hlorīds (MW = 181,7), (~ 100 mg)
- AChE no elektriska zuša (60 vienības)

ALAT komerciālais komplekts, kataloga Nr. MAK052 (Sigma-Aldrich, ASV):

- ALAT testa buferis (25 ml)
- Fluorescējošais peroksidāzes substrāts (DMSO tilpums 0,2 ml)
- ALAT enzīmu maisījums (1 vī)
- ALAT Substrāts (1 vī)
- Piruvāta standarts (100 nmol/μL 0,1 ml)
- ALAT pozitīvā kontrole (1 vī)

2.3. Laboratorijas materiāli un iekārtas

2.2. tabula

Laboratorijas materiāli

Nosaukums	Kataloga numurs	Ražotājs	Ražotājvalsts
Mehāniskās pipetes (0,5-10 μL, 2 –20 μL, 20 –200 μL, 100 –1000 μL)	LH-725663	Sartorius	Vācija
96 Lauciņu mikro- plates	83.3925	Sarstedt	Vācija
Pipešu dozators	F110120	Gilson	ASV
Pipešu uzgaļi (0,1-10 μL)	07-360-2015	Sartorius	Vācija

Pipešu uzgaļi (0,1-20 µL)	07-361-2015	Sartorius	Vācija
Pipešu uzgaļi (1-200 µL)	07-862-0080	Sartorius	Vācija
Pipešu uzgaļi (100-1000 µL)	07-368-2005	Sartorius	Vācija
Multikanālu pipetes	BOE 9608300	Boeco	Vācija
Ependorfa mēģenes	72.706.400	Sarstedt	Vācija
Centrifūgēšanas sto- briņi (50 mL)	62.547.004	Sarstedt	Vācija
Šūnu kultivēšanas flakons (T-75-75 cm ²)	83.3911.002	Sarstedt	Vācija
Seroloģiskās pipetes (10mL)	86.1254.001	Sarstedt	Vācija
Flomāsteri rakstīšanai uz plast- masas	NC1544798	Sardstedt	Vācija
Pipešu dozators	F110120	Gilson	ASV

2.3. tabula

Laboratorijas iekārtas

Nosaukums	Kataloga numurs	Ražotājs	Ražotājvalsts
Analītiskie svāri	BXX 22	Boeco	Vācija

Vortex V-1 plus	BS-010203-AAG	Biosan	Latvija
Mikroplašu lasītājs Tecan Microplate Reader Infinite M200,	INF-FPLEX	Tecan Trading AG	Šveice

2.4. HepG2 šūnu stimulēšana ar izvēles zālēm un supernatanta iegūšana

Eksperimentos pētītās 8 vielas – silimarīns, metformīns, diklofenaks, nimesulīds, neostigmīns un celekoksibs koncentrācijā – 6,5 μM, 12,5 μM, 25 μM, 50 μM un 100 μM, bet atorvastatīns un simvastatīns koncentrācijā 6,5 μM, 12,5 μM, 25 μM un 50 μM tika pievienotas šūnu inkubatorā augošām HepG2 šūnām, kas bija izsētas 20000 šūnu vienā mikroplates lauciņā. Koncentrācijas tika izvēlētas atbilstoši iepriekš veiktajiem vielu ietekmes uz šūnu dzīvotspēju pētījumiem, kuros parādīja, ka statīniem maksimālā koncentrācija, kas neietekmē šūnu skaitu ir 50 μM. Pēc 24 h no šūnām ar pipeti tika atsūkta barotne jeb supernatants un tajā mērītas enzīmu aktivitātes.

2.5. AST aktivitātes mērīšana

AST darbības novērtēšanas metode nodrošina vienkāršu un tiešu mērīšanas procedūru AST aktivitātes noteikšanai dažādos paraugos. Aminogrupas pārvešana no aspartāta uz α-ke-toglutarātu izraisa glutamāta veidošanos, kā rezultātā tiek iegūts kolorimetriskais (450 nm) produkts, kas ir proporcionāls AST fermentatīvai aktivitātei.

Ļaut testa buferšķīdumam sasilt līdz istabas temperatūrai. Enzīmu maisījumu (AST En-
zyme Mix) atšķaidīt ar 220 μL H₂O. Labi samaisīt ar pipeti (nevirpuļot). Veidotāju izšķīdina
820 μL dejonizēta ūdenī (dH₂O). Labi samaisīt ar pipeti (nevirpuļot). Substrātu (AST Substrate)
izšķīdina 1,1 ml testa buferšķīduma. Labi samaisīt ar pipeti (nevirpuļot). Pozitīvā kontrole (AST
Positive Control): Atšķaidīt ar 100 μL dH₂O. Labi samaisīt ar pipeti (nevirpuļot).

Glutamāta standarti kolorimetriskai noteikšanai:

Atšķaida 10 μL 0,1 M glutamāta standarta šķīduma ar 990 μL AST reakcijas
buferšķīduma, lai iegūtu 1 mM standarta šķīduma. Pievieno 0, 2, 4, 6, 8, un 10 μL 1 mM
standarta šķīduma 96 (x2) lauciņu platēm, lai iegūtu atšķirīgas koncentrācijas standartlīkni.
Papildina lauciņu plates iedobes līdz 50 μL ar AST reakcijas buferšķīdumu.

Galvenais reakcijas maisījums

Reāģenti	Tilpums
AST reakcijas buferšķīdums	80 μL
AST veidotājs	8 μL
AST enzīmu maisījums	2 μL
AST substrāts	10 μL

Katrā lauciņa iemēra 50 μL HepG2 šūnu supernatanta katrai vielai un katrai koncentrācijai triplikātos. Katrai lauciņu plates iedobei pievieno 100 μL galvenā reakcijas maisījuma. Labi samaisa, izmantojot pipeti. Plati ievieto mikroplašu lasītājā, uzturot 37 °C temperatūru. Pēc 2-3 minūtēm veic sākotnējo mērījumu. Izmēra absorbciju pie 450 nm laikā, ko pieņem par 0 min. Turpina inkubēt plati 37 °C temperatūrā, veicot mērījumus ik pēc 5 minūtēm. Mēra ar mikroplašu lasītāju (*Tecan Microplate Reader Infinite M200*).

2.6. ALP aktivitātes mērīšana

Metodē izmanto p-nitrofenilfosfātu, kas tiek hidrolizēts ar ALP palīdzību un pārvēršas dzeltenā produktā (maksimālā absorbcija pie 405 nm). Absorbcija ir tieši proporcionāla fermentu aktivitātei.

Iemēra 30 μL parauga un 20 μL buferšķīduma piemērotās caurspīdīgās mikroplates lauciņos. Kopējais tilpums paredzēts 200 μL, tāpēc pie paraugiem iemēra klāt 150 μL darba reaģenta. Atsevišķi 2 lauciņos iemēra 200 μL attīrīta ūdens un citos 2 lauciņos 200 μL kalibratora. Platē samaisa reaģentus un paraugus.

Mērījumi:

Nolasa optisko blīvumu (OD) pie 405 nm uzreiz (T = 0 minūtes) un atkal pēc 4 minūtēm (T = 4 minūtes) ar plates lasītāju.

ALP aprēķināšana paraugos:

$$\begin{aligned}
 \text{ALP (IU/L or } \mu\text{mol/(L}\cdot\text{min))} &= \\
 &= \frac{(OD_{T_4} - OD_{T_0}) \times 1000 \times \text{RxnVol}}{\epsilon_{\text{PNP}} \times L \times \text{SmplVol} \times T} \\
 &= \frac{(OD_{T_4} - OD_{T_0}) \times 1000 \times \text{RxnVol}}{18.75 \times 1.51 \times (OD_{\text{Cal}} - OD_{\text{Blank}}) \times \text{SmplVol} \times T} \\
 &= \frac{(OD_{T_4} - OD_{T_0}) \times \text{RxnVol} \times 35.3}{(OD_{\text{Cal}} - OD_{\text{Blank}}) \times \text{SmplVol} \times T}
 \end{aligned}$$

kur,

OD_{T4} = OD vērtība pie 405 nm pēc 4 minūtēm

OD_{T0} = OD vērtība pie 405 nm pēc 0 minūtēm

OD_{Cal} = OD vērtība pie 405 nm kalibratoram

OD_{Blank} = OD vērtība pie 405 nm ūdenim

RxnVol = reakcijas gala tilpums (200 μ L)

T = reakcijas laiks 10 minutes

SmplVol = izmantotā parauga daudzums reakcijā (30 μ L)

1000 = pārvēršana no mmol/L uz μ mol/L.

ϵ_{PNP} = absorbcijas koeficients priekš p-nitrofenola ($18,75 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

L = gaismas ceļš (cm).

2.7. AChE aktivitātes mērīšana

Metodē ir paredzētas vairākas reakcijas. Pirmkārt, AChE pārvērš ACh substrātu par holīnu. Holīnu savukārt oksidē holīna oksidāze par betaīnu un H_2O_2 . H_2O_2 , mērrutku peroksidāzes klātbūtnē reaģē ar *Amplex Red* reaģentu, lai radītu ļoti fluorescējošu savienojumu - rezorufīnu.

- Sagatavot ~ 20 mM *Amplex Red* reaģenta standartšķīduma: *Amplex Red* reaģenta flakonu un DMSO sasilda līdz istabas temperatūrai.
- Tieši pirms lietošanas *Amplex Red* flakona saturu izšķīdina 200 μ L DMSO.
- Mērcilindrā sagatavo 1X reakcijas buferšķīdumu, pievienojot 10 ml 5X reakcijas buferšķīduma 40 ml dH_2O , un pieliek klāt 1 ml sagatavota mērrutku peroksidāzes standartšķīduma. Visu vorteksē.
- Ependorfa mēģenē 23 μ L 3,0% H_2O_2 atšķaida ar 977 μ L dH_2O .
- 600 μ L 1X reakcijas buferšķīduma pievieno pie 20 U/ml holīna oksidāzes standartšķīduma.
- Uz analītiskajiem svariem nosver 5 mg ACh hlorīda un izšķīdina 275 μ L dH_2O . Visu vorteksē.
- 100 U/ml AChE flakonu izšķīdina 600 μ L 1X reakcijas buferšķīdumā.
- AChE saturošos šūnu supernatantu paraugu 20 μ L atšķaida ar 80 μ L 1X reakcijas buferšķīduma.
- Sagatavo pozitīvo kontroli, atšķaidot 100 U/ml AChE šķīdumu 1X reakcijas buferšķīdumā, lai iegūtu 0,2 U/ml AChE šķīdumu. Izmanto 1X reakcijas buferšķīdumu bez AChE kā negatīvu kontroli. Katrai reakcijai tiks izmantots 100 μ L tilpums.
- Sagatavo otru pozitīvo kontroli, atšķaidot 20 mM H_2O_2 darba šķīduma 10 μ M 1X reakcijas buferšķīdumā

- Sagatavo 400 μM *Amplex Red* reaģenta šķīduma. Pievieno 200 μL mērrutku peroksidāzes šķīduma, 200 μL holīna oksidāzes šķīduma un 20 μL ACh šķīduma, un pievieno 1X reakcijas buferšķīduma līdz 20 ml atzīmei mērcilindrā.
- Ar multikanālu pipetes palīdzību pievieno 100 μL *Amplex Red* reaģenta/HRP/holīna oksidāzes/ACh šķīduma katrā mikroplates iedobē, kurā ir paraugi un kontroles.

2.8. ALAT aktivitātes mērīšana

ALAT galvenokārt atrodams aknās un serumā. Aknu šūnu bojājums bieži izraisa ALAT līmeņa paaugstināšanos, un ALAT līmeni var izmantot kā aknu bojājumu marķieri.

ALAT testa buferi un fluorescējošo peroksidāzes substrātu jāsasilda līdz istabas temperatūrai. ALAT enzīmu maisījumu izšķīdina 220 μL ūdenī. Labi samaisa ar pipeti. ALAT substrātu izšķīdina 1,1 ml ALAT testa buferšķīduma. Labi samaisa ar pipeti. ALAT pozitīvā kontroli izšķīdina 100 μL ūdenī. Labi samaisa ar pipeti, ja uzglabā vēlākiem eksperimentiem, tad sadala alikvotās daļās.

Piruvāta standarti kolorimetriskai noteikšanai:

Atšķaida 10 μL 100 nmol/ μL piruvāta standarta šķīduma ar 990 μL ALAT testa bufera, lai iegūtu 1 nmol/ μL standarta šķīduma. Pievieno 0, 2, 4, 6, 8 un 10 μL 1 nmol/ μL standarta šķīduma 96 (x2) lauciņu platēm, lai iegūtu atšķirīgas koncentrācijas standartlīkni. Papildina lauciņu plates iedobes līdz 20 μL ar ALAT testa buferšķīdumu.

Paraugus atšķaida ALAT reakcijas buferšķīdumā. Sagatavo analīzes paraugus un pievieno 20 μL buferšķīduma 96 (x2) lauciņu platēm. Supernatantus var arī iepriekš neatšķaidot tieši iemērīt iedobēs. Ar pipeti iemēra 20 μL supernatantus 96 (x2) lauciņu plates iedobēs. Papildina lauciņu plates iedobes līdz 20 μL ar ALAT testa buferšķīdumu, ja supernatanti nav iepriekš sagatavoti vajadzīgajā atšķaidījumā.

Piruvāta standarti kolorimetriskai noteikšanai:

2.5. tabula

Galvenais reakcijas maisījums

Komponenti	Tilpums
ALAT testa buferis	86 μL
Fluorescējošais peroksidāzes substrāts	2 μL
ALAT enzīmu maisījums	2 μL
ALAT substrāts	10 μL

Katrai lauciņu plates iedobei pievieno 100 μL galvenā reakcijas maisījuma. Labi samaisa, izmantojot pipeti. Inkubē plati pie 37 $^{\circ}\text{C}$. Pēc 2 minūtēm var veikt sākotnējo mērījumu. Izmēra

absorbciju pie 570 nm sākotnējā laikā. Turpina inkubēt plati 37 °C temperatūrā, veicot mērījumus ik pēc 5 minūtēm.

Mērījumi:

Nolasa OD pie 405 nm uzreiz (T = 0 minūtes) un atkal pēc 4 minūtēm (T = 4 minūtes) ar plates lasītājā.

ALAT aktivitātes aprēķināšana:

$$\text{ALT Activity} = \frac{\text{B} \times \text{Sample Dilution Factor}}{(T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}) \times V}$$

B = piruvāta daudzums (nmol), kas ģenerēts starp T sākuma un T galīgo vērtību.

T_{Sākotnējais} = pirmā lasījuma laiks minūtēs.

T_{fināls} = priekšpēdējās nolasīšanas laiks minūtēs.

V = parauga tilpums (mL), kas pievienots iedobei.

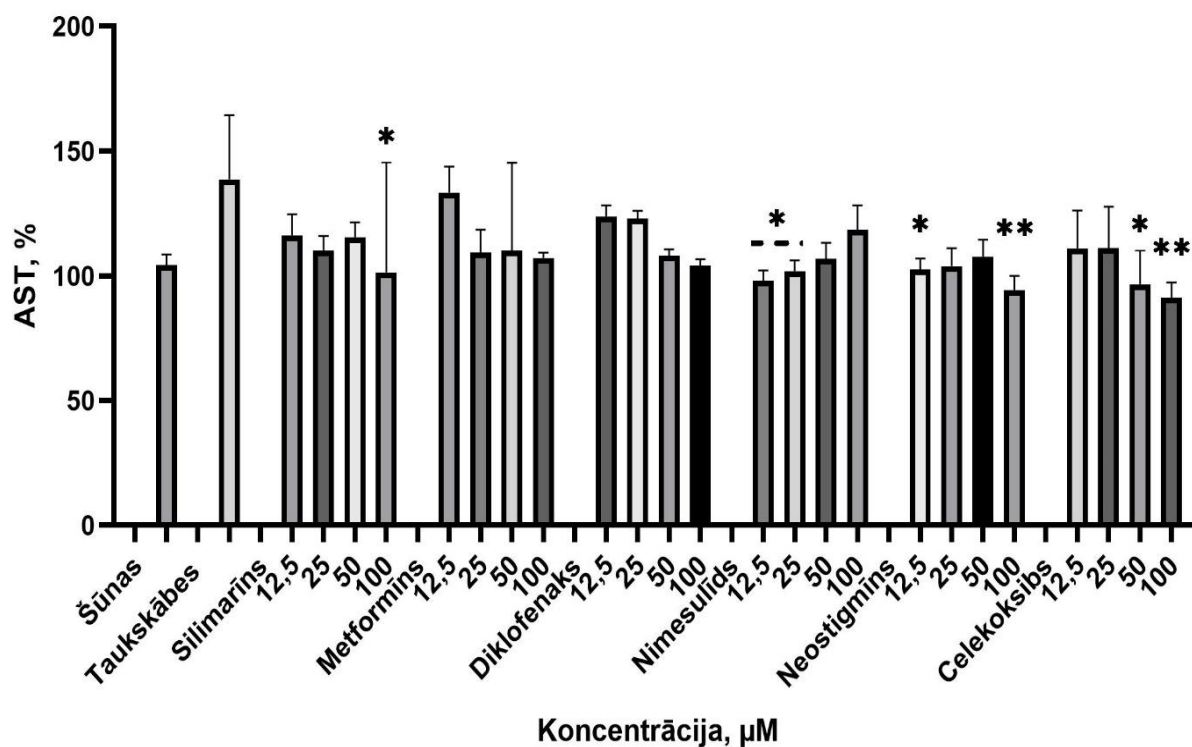
2.9. Datu statistiskā analīze

Iegūtie dati tika apstrādāti „*GraphPad Prism*” datorprogrammā. Datu statistiskā analīze tika veikta izmantojot *one-way ANOVA*, *Dunnett's multiple comparisons* testu. Datu būtiskumu apzīmē ar p-vērtībām, pie 95% ticamības intervāla.

3. REZULTĀTI

3.1. Vielu efekti uz AST aktivitāti

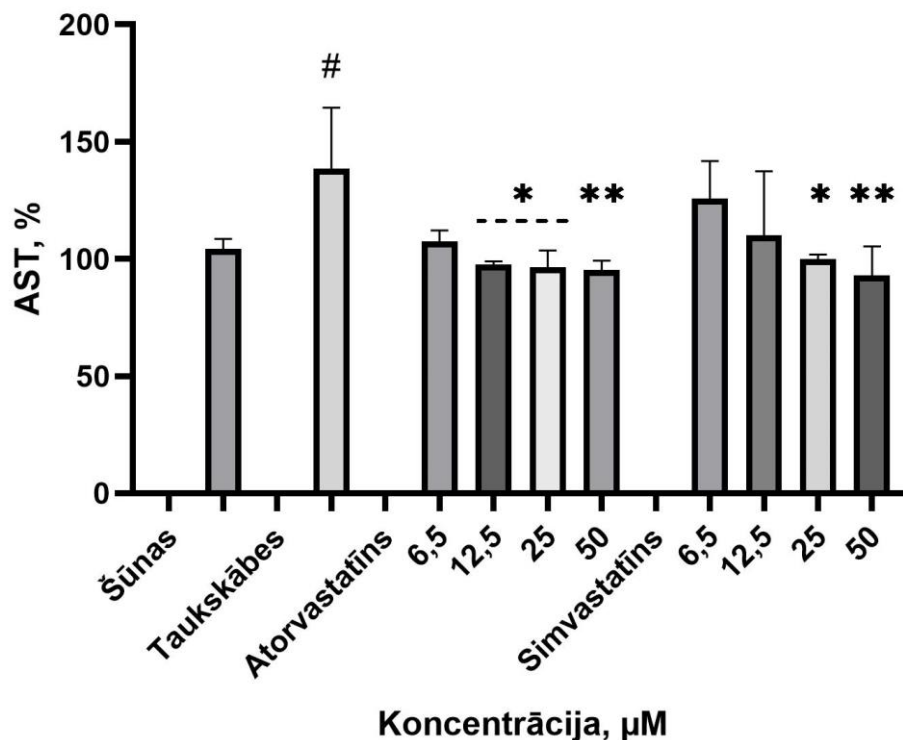
Silimarīns, metformīns, diklofenaks, nimesulīds, neostigmīns un celekoksibs koncentrācijā – 6,5 μM, 12,5 μM, 25 μM, 50 μM un 100 μM, bet atorvastatīns un simvastatīns koncentrācijā 6,5 μM, 12,5 μM, 25 μM un 50 μM tika pievienoti augošām HepG2 šūnām uz 24 h. Pēc 24 h no šūnām ar pipeti tika atsūkta barotne jeb supernatants un tajā mērīta AST aktivitāte. Enzimātiskā reakcija tika novērota 0, 5, 30 un 60 min. Par 0 min pieņemts laiks, kad mērījumi veikti uzreiz pēc enzimātiskās reakcijas maisījuma pievienošanas. Grafikos attēlots vielu AST inhibīcijas efekts % dažādos laika periodos, sākot ar 0 min.



3.1. att. Pētīto vielu ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 0 minūtēm. Statistiskā analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, salīdzinot ar TS efektu.

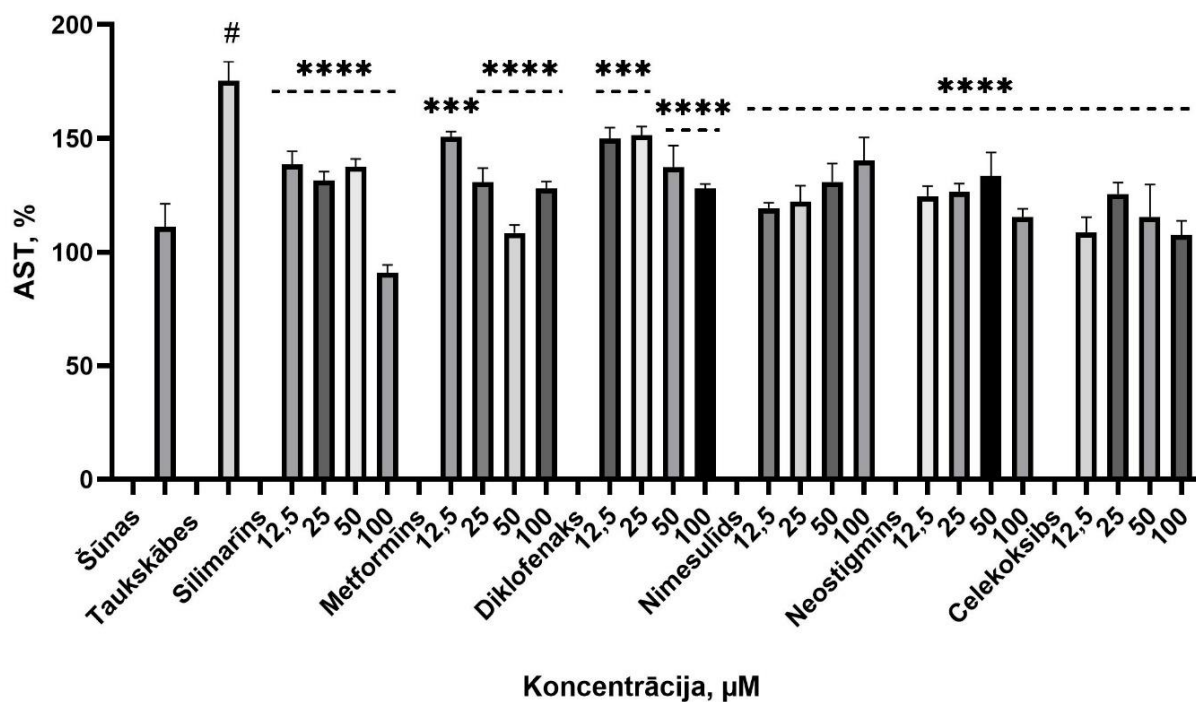
AST aktivitāte šūnu supernatantā bez vielu pievienošanas tika pieņemta par 100%. TS efekti salīdzināti ar kontroli un ir statistiski nozīmīgi atšķirīgi visos mērījumu laikos. Grafikā 0 min TS efekti pret kontroli nav attēloti ar simboliem. Rezultāti parāda, ka enzīma aktivitātes izmaiņas notiek ļoti ātri. TS izraisa AST pieaugumu. Bet AST inhibīcija parādās uzreiz, tiklīdz inhibitors un enzīms ir savienoti reakcijā pēc 0 min. Dažām vielām jau tika novērota no

koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti. Statistiski ticami visaugstāko AST inhibīcijas spēju uzrādīja silimarīns koncentrācijā 100 μM , nimesulīds koncentrācijās 12,5 μM un 25 μM , neostigmīns koncentrācijās 12,5 μM un 100 μM , celekoksibs koncentrācijās 50 μM un 100 μM .



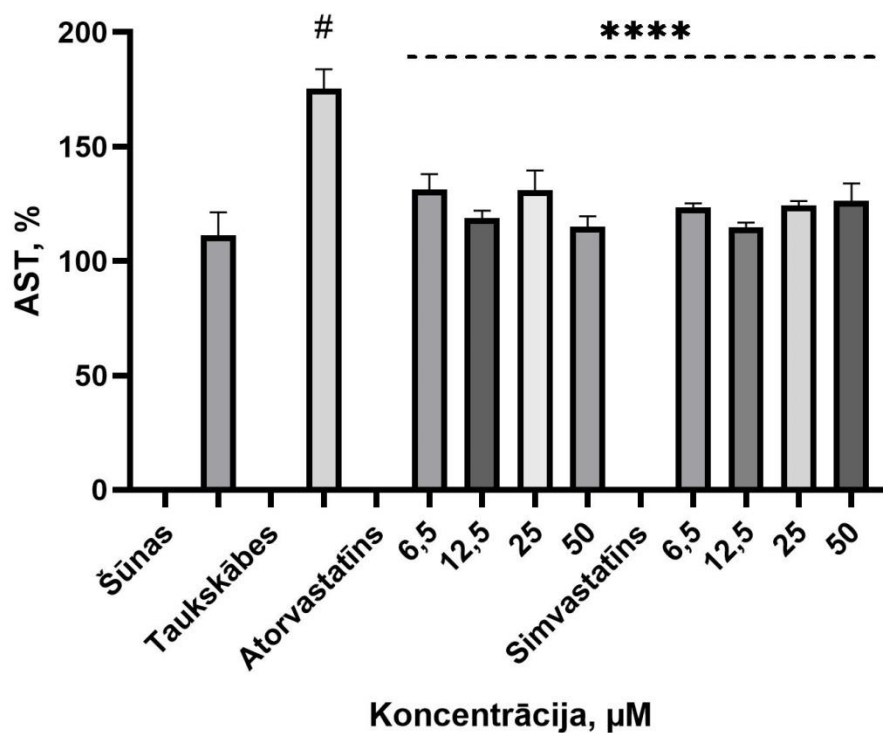
3.2. att. Atorvastatīna un simvastatīna ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 0 minūtēm. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība $\leq 0,05$ pret kontroli.

Attēlā 3.2. redzama statistiski ticama no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti gan atorvastatīnam, gan simvastatīnam. Atorvastatīnam, diapazonā no 12,5 μM līdz 50 μM , un simvastatīnam, diapazonā no 25 μM līdz 50 μM inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar TS efektu. Pētījumā izmantotās mazākās koncentrācijas (6,5 μM atorvastatīnam un 6,5 μM un 12,5 μM simvastatīnam) neuzrādīja statistiski ticamu atšķirību.



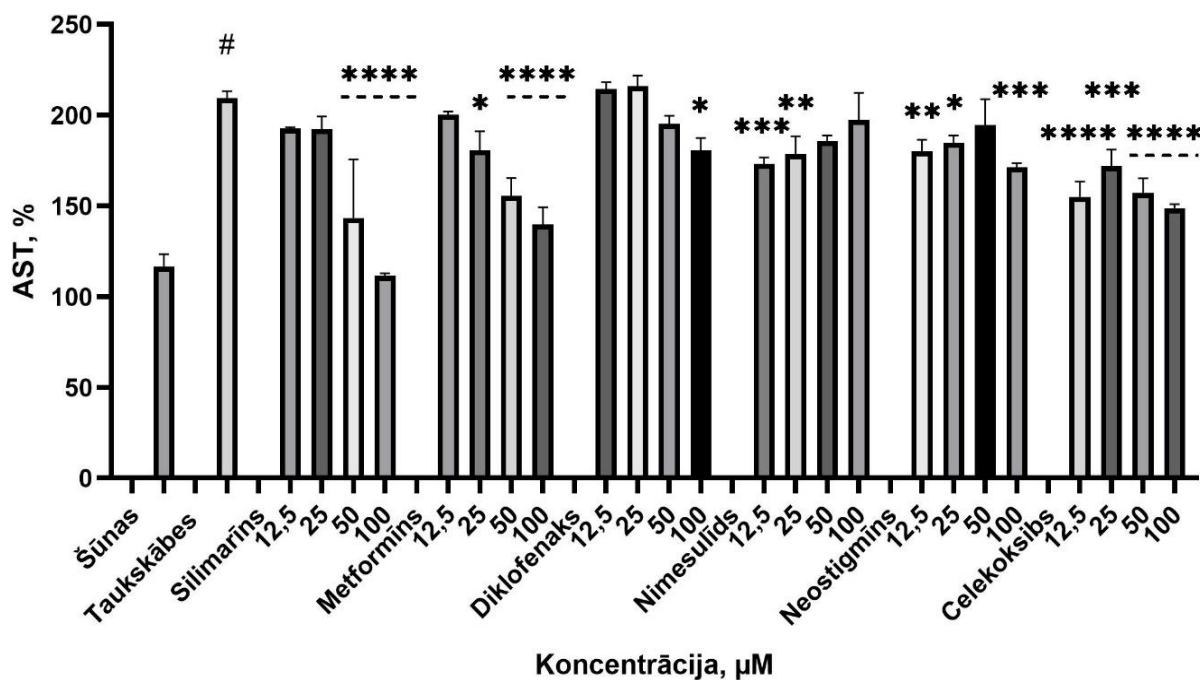
3.3. att. Pētīto vielu ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 5 minūtēm. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, ***p-vērtība = 0,0002, ****p-vērtība = 0,0001, #p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība ≤ 0,05 pret kontroli.

Pēc 5 min visas vielas uzrāda AST inhibīciju. Visaugstāko AST inhibīcijas spēju no pētāmajām vielām uzrādīja silimarīns koncentrācijā 100 µM, bet visas vielas jau koncentrācijā 12,5 µM samazina enzīma aktivitāti. Tomēr nav labi izteikta koncentrācijas un efekta attiecība. Piemēram, metformīnam 50 µM efekts ir lielāks nekā 100 µM.



3.4. att. Pētīto statīnu ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 5 min. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. ****p-vērtība = 0,0001, #p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība $\leq 0,05$ pret kontroli.

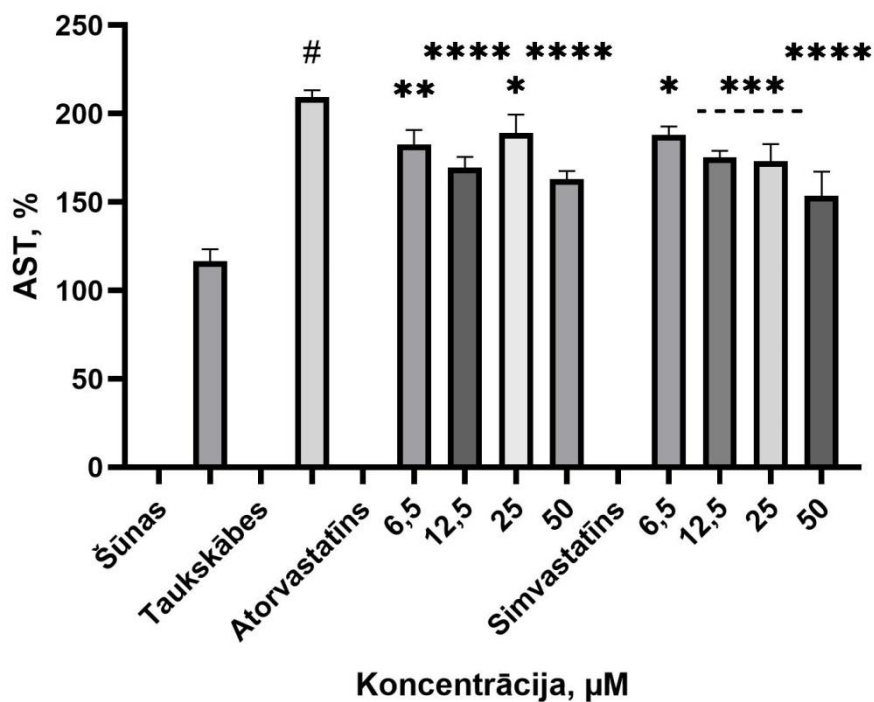
Atorvastatīnam un simvastatīnam netika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti. Statīni uzrādīja statistiski ticamu inhibējošu darbību pēc 5 min visā koncentrāciju diapazonā. Iespējams, ka statīniem vajadzētu samazināt koncentrāciju, lai redzētu efekta sākumu.



3.5. att. Pētīto vielu ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 30 minūtēm. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, ***p-vērtība = 0,0002, ****p-vērtība = 0,0001, #p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība ≤ 0,05 pret kontroli.

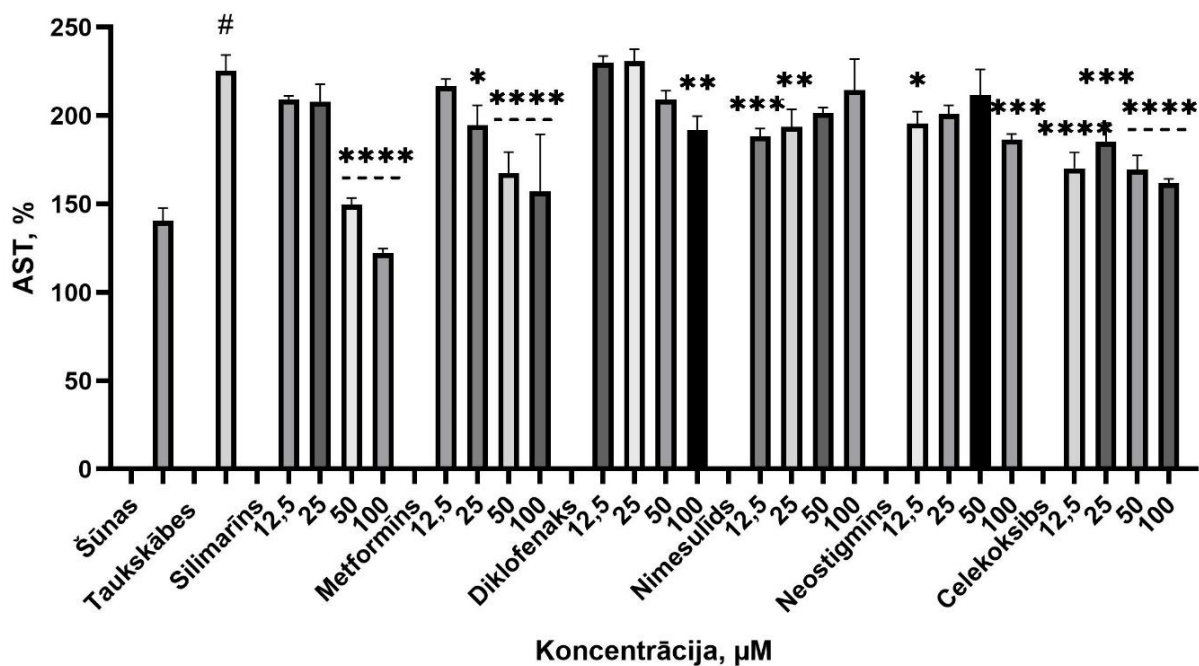
Pēc 30 min redzams, ka enzimatiskā reakcija attīstās un TS efekts sasniedz aptuveni 200% pret kontroli, kas pieņemta par 100%. Attiecīgi laika gaitā mainās arī vielu efekti.

Tika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti arī pēc 30 min inkubēšanas, izņemot silimarīnu (koncentrācijās 12,5 µM un 25 µM), diklofenaku (koncentrācijās 12,5 µM, 25 µM un 50 µM), metformīnu (koncentrācijā 12,5 µM), nimesulīdu (koncentrācijās 50 µM un 100 µM), neostigmīnu (koncentrācijā 50 µM), kas statistiski ticami neietekmē AST aktivitāti. Nimesulīdam visā periodā 100 µM koncentrācija mazāk ietekmē AST aktivitāti kā mazāka koncentrācija.



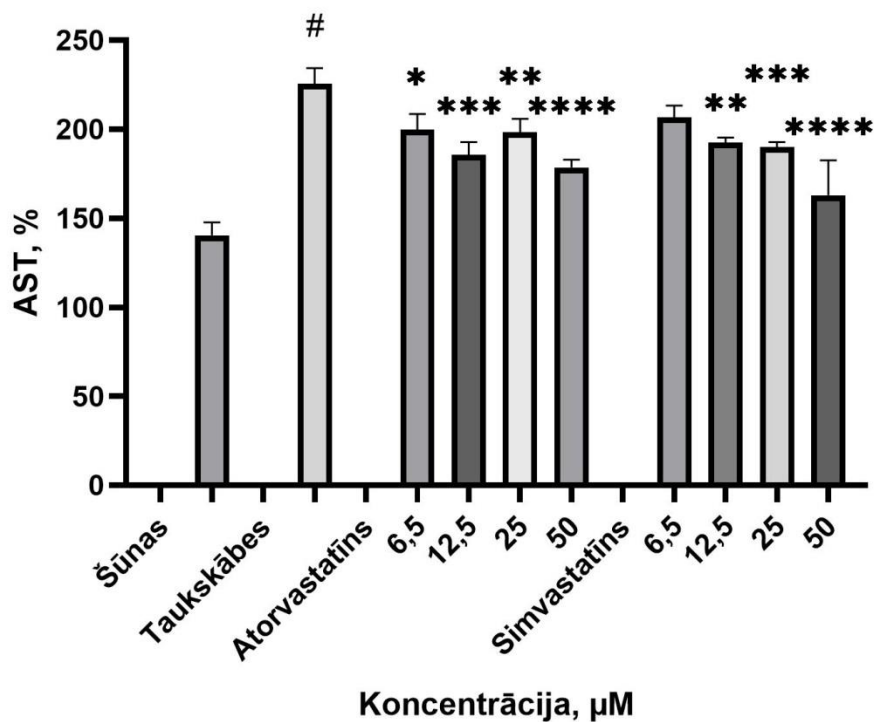
3.6. att. Pētīto statīnu ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 30 minūtēm. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, ***p-vērtība = 0,0002, ****p-vērtība = 0,0001, #p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība \leq 0,05 pret kontroli.

Statīniem saglabājas AST inhibīcija visās koncentrācijā, bet īpaši simvastatīnam iezīmējas no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti pēc 30 min.



3.7. att. Pētīto vielu ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 60 minūtēm. Statistiskā analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Duneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, ***p-vērtība = 0,0002, ****p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība ≤ 0,05 pret kontroli.

Pēc 60 min TS AST pieaugums sasniedz apmēram 220% un enzimatiskā reakcija palēninās, ņemot vērā substrāta un enzīma attiecību reakcijas maisījumā. Novērojām, ka vielu efekti praktiski neatšķiras no mērījumiem pēc 30 min. Tika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti, izņemot silimarīnu koncentrācijās 12,5 μM un 25 μM, diklofenaku koncentrācijās 12,5 μM, 25 μM un 50 μM, metformīnu koncentrācijā 12,5 μM, nimesulīdu koncentrācijās 50 μM un 100 μM, neostigmīnu koncentrācijās 25 μM un 50 μM, kas statistiski ticami neietekmē AST aktivitāti.

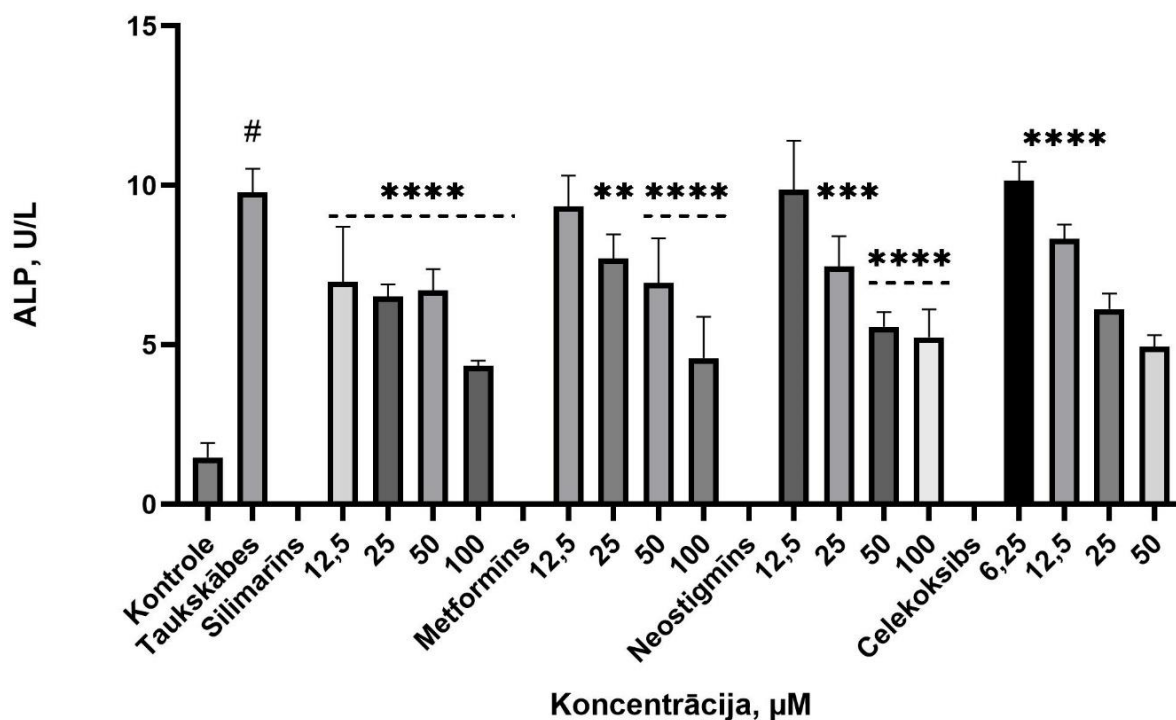


3.8. att. Pētīto statīnu ietekme uz AST aktivitāti HepG2 šūnās pēc 60 minūtēm. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Dana vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, ***p-vērtība = 0,0002, ****p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība ≤ 0,05 pret kontroli.

Statīniem AST inhibīcija tika novērota jau 0 min un tā saglabājas visā 60 min periodā. Atorvastatīnam nav izteikta efekta un koncentrācijas sakarība, bet simvastatīnam tika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti arī pēc 60 min. Tomēr simvastatīnam izmantotā mazākā koncentrācija 6,5 μM pēc 60 min vairs neuzrādīja statistiski ticamu atšķirību. Visaugstāko AST inhibīcijas spēju uzrādīja simvastatīns koncentrācijā 50 μM.

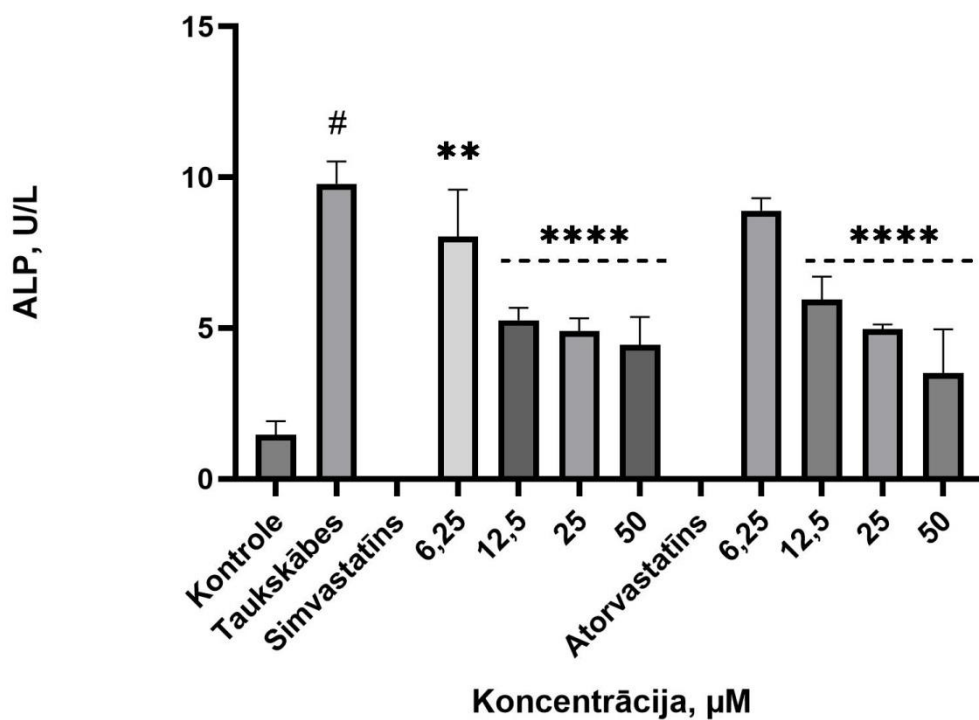
3.2. Vielu efekti uz ALP aktivitāti

Sešām vielām – silimarīnam, metformīnam, neostigmīnam koncentrācijā – 6,5 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM un 100 μM , bet celekoksībam, atorvastaīnam un simvastaīnam koncentrācijā 6,5 μM , 12,5 μM , 25 μM un 50 μM tika pētīti ALP aktivitāti ietekmējošie efekti. ALP aktivitāte tika mērīta supernatantos. Enzimātiskā reakcija tika novērota pēc 10 min.



3.9. att. Pētīto vielu ietekme uz ALP aktivitāti HepG2 šūnās. Statistiskā analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, ***p-vērtība = 0,0002, ****p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība $\leq 0,05$ pret kontroli.

Attēlā 3.9. redzams, ka TS izraisa apmēram pieckāršu ALP aktivitātes pieaugumu, salīdzinot ar kontroli, bet vielas uzrāda no koncentrācijas atkarīgu ALP inhibīcijas efektu. Statistiski ticami visaugstāko ALP inhibīcijas spēju no pētāmajām vielām uzrādīja silimarīns un celekoksībs, jo ALP inhibīciju novērojām jau 12,5 μM koncentrācijā, bet neostigmīnam un metformīnam ALP inhibīcija ir, sākot no 25 μM .

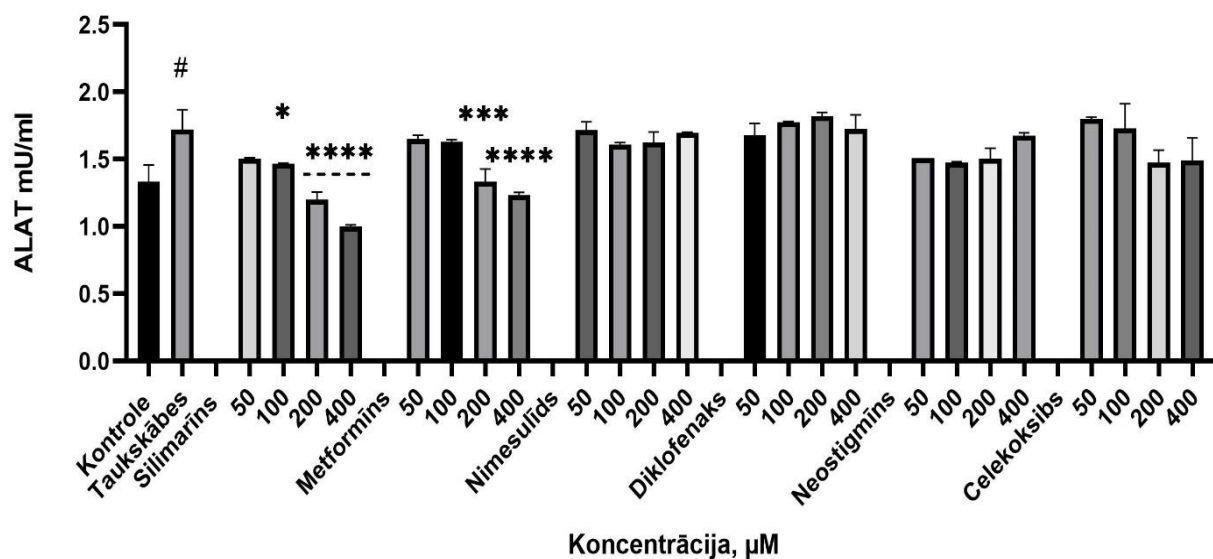


3.10. att. Pētīto statīnu ietekme uz ALP aktivitāti HepG2 šūnās. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. **p-vērtība = 0,0021, ****p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība ≤ 0,05 pret kontroli.

Tika novērota statistiski ticama no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt ALP aktivitāti gan atorvastatīnam, gan simvastatīnam. Atorvastatīnam, diapazonā no 6,25 μM līdz 50 μM, un simvastatīnam, diapazonā no 12,5 μM līdz 50 μM inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar TS efektu, izņemot atorvastatīnu koncentrācijā 6,25 μM.

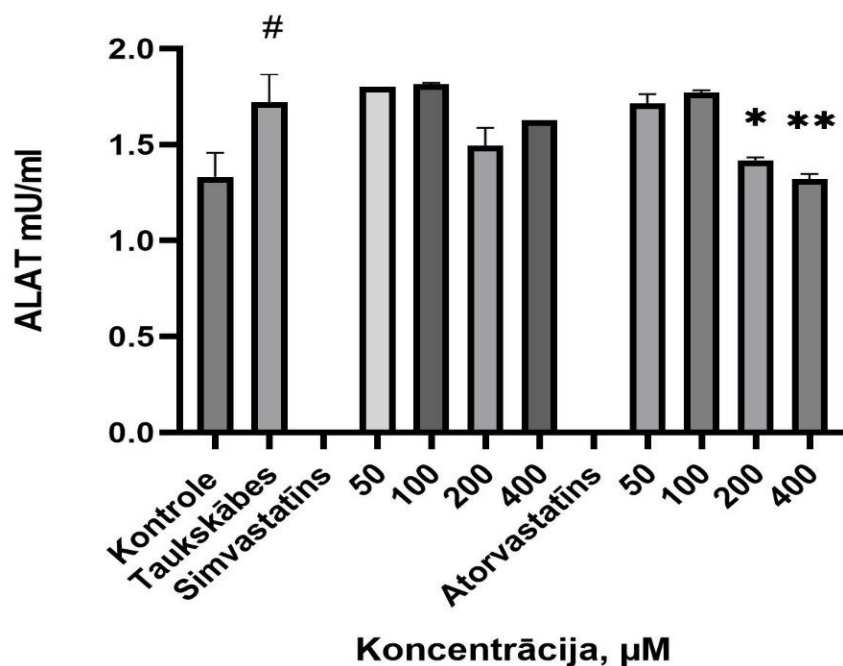
3.3. Vielu efekti uz ALAT aktivitāti

Astoņas vielas – silimarīns, metformīns, diklofenaks, nimesulīds un neostigmīns, celekoksibs, atorvastatīns un simvastatīns koncentrācijā – 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM tika pievienotas šūnu inkubatorā augošām HepG2 šūnām. Pēc 24 h no šūnām ar pipeti tika atsūkta barotne jeb supernatants un tajā mērīta ALAT aktivitāte. Enzimātiskā reakcija tika novērota 4 min pēc pēdējā reaģenta pievienošanas.



3.11. att. Pētīto vielu ietekme uz ALAT aktivitāti HepG2 šūnās. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, ***p-vērtība = 0,0002, ****p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība $\leq 0,05$ pret kontroli.

Attēlā 3.11. redzams, ka statistiski ticami visaugstāko ALAT inhibīcijas spēju no pētāmajām vielām uzrādīja silimarīns un metformīns, jo ALAT inhibīciju novērojām jau 50 μM koncentrācijā. Silimarīns uzrādīja visaugstāko ALAT inhibīcijas spēju.

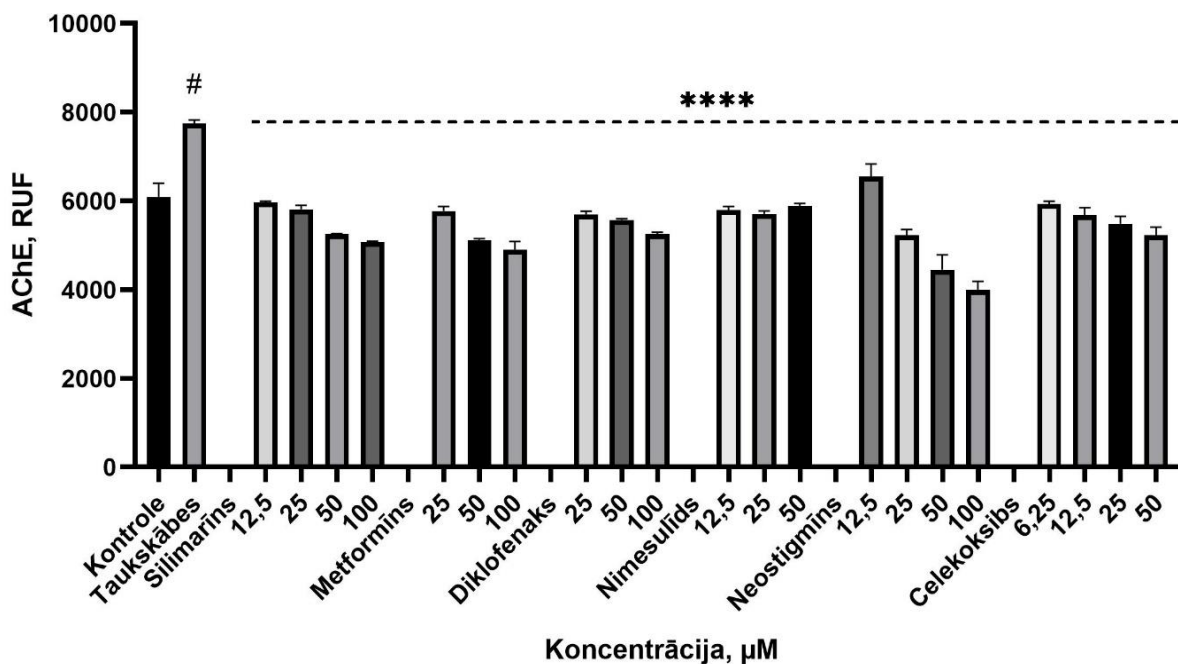


3.12. att. Pētīto statīnu ietekme uz ALAT aktivitāti HepG2 šūnās. Statistikas analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. *p-vērtība = 0,0332, **p-vērtība = 0,0021, ***p-vērtība = 0,0002, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība $\leq 0,05$ pret kontroli.

Attēlā 3.12. redzama statistiski ticama no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt ALAT aktivitāti tikai atorvastatīnam. Atorvastatīnam, diapazonā no 200 μM līdz 400 μM inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar TS efektu. Pētījumā izmantotās mazākās koncentrācijas 50 μM un 100 μM atorvastatīnam neuzrādīja statistiski ticamu atšķirību.

3.4. Vielu efekti uz AChE aktivitāti

HepG2 supernatantos tika mērīta AChE aktivitāte pēc 24 h šūnu inkubēšanas pētāmo vielu klātbūtnē. AChE tika mērīta atbilstoši metodes darba gaitai 30 min pēc pēdējā reaģenta pievienošanas. AChE darbības novērtēšanas rezultāti norādīja uz to, ka dažādām vielām piemīt spēja inhibēt AChE aktivitāti.



3.13. att. Pētīto vielu ietekme uz AChE aktivitāti HepG2 šūnās relatīvās fluorescences vienībās (RUF). Statistiskā analīze veikta ar vienvirziena ANOVA, Daneta vairākiem salīdzinājumiem (*one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons*) testu. ****p-vērtība = 0,0001, salīdzinot ar TS efektu. #p-vērtība ≤ 0,05 pret kontroli.

Pētītās vielas visās koncentrācijās samazināja AChE līmeni, salīdzinot ar TS efektu. Tomēr no koncentrācijas atkarīgs efekts bija neostigmīnam, silimarīnam, metformīnam un celekoksībam. Diklofenakam un nimesulīdam novērojām AChE pazeminājumu, bet nebija izteikta koncentrācijas un efekta sakarība. Zināmais AChE inhibitors neostigmīns uzrādīja visaugstāko AChE inhibīcijas spēju.

4. DISKUSIJA

HepG2 šūnas ir plaši izmantotas, lai modelētu NATAS *in vitro*. Vairākos pētījumos ir izmantotas arī HepG2 šūnas, lai novērtētu NATAS ārstēšanu un profilaksi (Cominguez *et al.*, 2021). Iepriekš minēto šūnu kultūru vidū HepG2 šūnu līnija ir ieguvusi popularitāti, pateicoties tās plašajam pielietojumam zinātniskajos pētījumos (Arzumanian *et al.*, 2021). HepG2 šūnu līniju galvenās priekšrocības ir to neierobežotais augšanas potenciāls un stabils fenotips visā kultivēšanas laikā. Tādējādi šo modeļu izmantošana atvieglo standartizētus protokolus un pētījumus (Soret *et al.*, 2021).

Palmitīnskābe un oleīnskābe ir visizplatītākās garo ķēžu TS cilvēka organismā, un pašlaik tās ir visbiežāk izmantotās TS NATAS modelēšanā, taču TS ir slikti šķīstošas. Lai to labāk izšķīdinātu barotnē, tiek izmantots BSA un TS ar attiecību 5:1, lai pēc izšķīdināšanas barotnē to atšķaidītu līdz vajadzīgajai koncentrācijai. Palmitīnskābes un oleīnskābes koncentrācijas attiecība 1:2 ir vismazāk toksiska hepatocītiem, tāpēc daudzos pētījumos šī attiecība tiek izmantota. HepG2 šūnas apstrādā ar oleīnskābi un palmitīnskābi koncentrācijās 0,2 mmol/L un 0,1 mmol/L, lai izveidotu taukaino aknu modeli (Khan *et al.*, 2022).

Eynaudi *et al.* 2021. gadā pētījumā, lai novērtētu, vai oleīnskābe vai palmitīnskābe ietekmē lipīdu pilienu morfoloģiju, HepG2 hepatocīti tika apstrādāti ar oleīnskābi vai palmitīnskābi no 0 līdz 24 stundām. Oleīnskābe stimulēja lielu un spilgtu lipīdu pilienu parādīšanos hepatocītos, galvenokārt HepG2 šūnu centrālajā reģionā, palmitīnskābe izraisīja vienmērīgi sadalītu mazāku pilienu parādīšanos. Oleīnskābe visos analizētajos laikos ievērojami palielināja lipīdu pilienu skaitu šūnā, sasniedzot ~30 reizes pieaugumu jau 2 stundas pēc apstrādes. Apstrāde ar palmitīnskābi izraisīja lēnāku lipīdu pilienu skaita palielināšanos šūnā. Atšķirībā no oleīnskābes palmitīnskābe nemainīja lipīdu pilienu tilpumu, kas liecina par lēnu jaunu lipīdu pilienu kodolu veidošanos bez augšanas fāzes (Eynaudi *et al.*, 2021). Vairāki pētījumi liecina, ka mononepiesātinātā TS oleīnskābe ir mazāk toksiska nekā piesātinātā TS palmitīnskābe. Vēl vairāk, oleīnskābe var novērst palmitīnskābes izraisītu toksicitāti hepatocītos. Lielāka oleīnskābes spēja esterificēties līdz TG un uzkrāties lipīdu pilienos, iespējams, izskaidro tās samazināto lipotoksicitāti salīdzinājumā ar palmitīnskābi. Turklāt oleīnskābe, kā ziņots, uzlabo palmitīnskābes izraisītu toksicitāti hepatocītos, lai gan nav skaidrs, vai oleīnskābes veicināšana palmitīnskābes novirzīšanai uz TG ir galvenais aizsardzības mehānisms (Chen *et al.*, 2018).

Ricchi *et al.* 2009. gadā pētījumā, *in vitro* steatoģenēzes modeli salīdzināšanas nolūkos, trīs dažādas hepatocītu līnijas tika pakļautas augstām TS devām. Tika pētīta oleīnskābes, palmitīnskābes vai to kombinācijas ievadīšanas ietekme uz TG uzkrāšanos, šūnu izdzīvošanu,

TS sastāvu, gēnu ekspresiju un insulīna signalizāciju. Dati parādīja, ka, lai gan steatozes pakāpe šūnās, kas apstrādātas ar oleīnskābi, bija smagāka nekā tām, kas pakļautas palmitīnskābei, tika konstatēta abu TS pretēja ietekme uz šūnu apoptozi. Lielāks steatozes apjoms, kas novērots pēc oleīnskābes iedarbības, bija saistīts ar ievērojamu PPAR γ un SREBP-1 aktivāciju. Turpretī palmitīnskābes iedarbība bija saistīta ar PPAR α aktivāciju. Turklāt palmitīnskābe, bet ne oleīnskābe, traucēja insulīna signālu pārraidi. Neskatoties uz augstāku steatozes pakāpi, ko izraisa inkubācija ar abām TS kopā, apoptozes ātrums un insulīna signālu traucējumi bija zemāki nekā šūnās, kas apstrādātas tikai ar palmitīnskābi, norādot uz oleīnskābes aizsargājošo iedarbību (Ricchi *et al.*, 2009).

4.1. Dažādu vielu efekti uz AST, ALP, ALAT aktivitāti HepG2 šūnas taukainas aknas modelī

Galvenā aknu slimību skrīninga metode ir asins marķieru paneļa analīze, ko dēvē par aknu funkcionālo testu. Šāds panelis parasti ietver tādus aknu enzīmus, piemēram, ALAT un AST - hepatocītu bojājumu marķierus. Bilirubīnu, parenhīmas aknu slimības vai žultsceļu obstrukcijas marķieri, un ALP, kas var būt žults ceļu slimības un holestāzes marķieris (Macpherson *et al.*, 2020).

Mūsu darbā silimarīns, metformīns, diklofenaks, nimesulīds, neostigmīns, celekoksībs, atorvastatīns un simvastatīns tika pievienoti augošām HepG2 šūnām uz 24 h. Pēc 24 h no šūnām ar pipeti tika atsūkta barotne jeb supernatants un tajā mērītas enzīmu aktivitātes. AST enzimatiskā reakcija tika novērota pēc 0, 5, 30 un 60 min. ALP enzimatiskā reakcija tika novērota pēc 10 min. ALAT enzimatiskā reakcija tika novērota 4 min pēc pēdējā reaģenta pievienošanas, bet AChE tika mērīta 30 min pēc pēdējā reaģenta pievienošanas.

Silimarīns ir izmantots kā aizsargājošs līdzeklis akūtu un hronisku aknu slimību ārstēšanai. Turklāt tas atbalsta aknu šūnas, veicot daudzfaktoru darbību, tostarp saistoties ar šūnu membrānām, lai nomāktu toksīnu iekļūšanu aknu šūnās, palielinot superoksīda dismutāzes aktivitāti, paaugstinot glutaciona līmeni audos, inhibējot lipīdu peroksidāciju un uzlabojot hepatocītu proteīnu sintēzi (Madrigal-Santillán *et al.*, 2014). Mūsu pētījumā tika pārbaudīta dažādu silimarīna koncentrāciju ietekme uz AST, ALP, ALAT. Silimarīns statistiski ticami visaugstāko AST, ALP inhibīcijas spēju uzrādīja koncentrācijā 100 μ M, bet ALAT inhibīcijas spēju uzrādīja koncentrāciju diapazonā no 100 μ M līdz 400 μ M, parādot, ka silimarīns izraisa no koncentrācijas atkarīgu efektu.

Cacciapuoti *et al.* pētījumā tika novērota viegla vai mērena ALAT un AST līmeņa paaugstināšanās, kas ir visizplatītākā anomālija, kas konstatēta pacientiem ar NATAS. Pētījumā

ALAT un AST līmenis serumā ievērojami samazinājās pēc diētas un silimarīna terapijas. AST un ALAT samazināšanos pēc apstrādes ar silimarīnu, šķiet, izraisa silimarīna antioksidanta iedarbība, kas arī spēj aizsargāt aknas pret toksīniem. Pētījumā tika pierādīts, ka silimarīns samazina AST un ALAT augsto līmeni serumā, iespējams, hepatocītu membrānas struktūras stabilizēšanas rezultāta, tādējādi novēršot toksīnu iekļūšanu šūnās (Cacciapuoti *et al.*, 2013).

Nesenā Mirzaei *et al.* 2021. gadā pētījuma atklājumi liecina, ka 140 mg silimarīna saņemšana trīs reizes dienā 14 dienas var ievērojami samazināt aknu enzīmu, tostarp ALAT, AST un ALP līmeni salīdzinājumā ar placebo. Pētījumu rezultāti norādīja uz silimarīna aizsargājošo iedarbību pret aknu bojājumiem (Mirzaei *et al.*, 2021).

Stellavato *et al. in vitro* pētījumā parādīts, ka apstrāde ar oleīnskābes un linolskābes maisījumu izraisīja lipīdu pilienu uzkrāšanos gandrīz visās HepG2 šūnās. Turklāt testi parādīja, ka lipīdu pilienu daudzums ir vēl mazāks, ja šūnas tiek apstrādātas ar silimarīnu 0,005 mg/ml, salīdzinot ar kontroli. Arī eksperimenti, kas veikti ar normālām cilvēka aknu šūnām, parādīja, ka apstrāde ar oleīnskābes un linolskābes maisījumu izraisīja lipīdu pilienu uzkrāšanos, bet silimarīns samazināja intracelulāro tauku saturu. Jo īpaši *Oil Red O* krāsošanas kvantitatīvā noteikšana attiecībā uz atsevišķiem savienojumiem parādīja, ka silimarīns koncentrācijā 0,001 mg/ml būtiski samazināja lipīdu uzkrāšanos par aptuveni 50–70% (Stellavato *et al.*, 2018).

Epidemioloģiskie pētījumi liecina, ka metformīns būtiski uzlabo hepatocītu dzīvotspēju taukainās aknās, tostarp NATAS un NASH, kā arī hepatokarcinomu gadījumā (Noto *et al.*, 2012). Iespējamie metformīna mehānismi NATAS ārstēšanā ietver uzlabotu rezistenci pret insulīnu, palielinātu TS oksidāciju, palielinātu glikozes uzņemšanu muskuļos, samazinātu lipīdu sintēzi un samazinātu glikozes veidošanos aknās (Zhu *et al.*, 2018). Aknās metformīns uztur glutationu samazinātā stāvoklī. Aknu mitohondriju glutaciona uzturēšana samazinātā stāvoklī ir būtiska šūnu izdzīvošanai (Nazer *et al.*, 2018). Tomēr precīzi mehānismi, kas ir metformīna labvēlīgās ietekmes pamatā, joprojām nav skaidri (Zhu *et al.*, 2018).

Mūsu pētījumā tika pārbaudīta dažādu metformīna koncentrāciju ietekme uz AST, ALP, ALAT. Tikai pēc 5 min metformīns uzrāda statistiski ticami AST inhibīciju, un jau koncentrācijā 12,5 μM samazina enzīma aktivitāti. Tomēr nav labi izteikta koncentrācijas un efekta attiecība. Piemēram, metformīnam 50 μM efekts ir lielāks nekā 100 μM (*attēls. 3.3*). Tika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti arī pēc 30 min inkubēšanas, izņemot metformīnu koncentrācijā 12,5 μM (*attēls. 3.5*). Pēc 60 min novērojām, ka metformīna efekti praktiski neatšķiras no mērījumiem pēc 30 min (*attēls. 3.7*). ALP inhibīciju novērojām sākot no 25 μM koncentrācijā (*attēls. 3.9*). Attēlā 3.11. redzams, ka statistiski ticami visaugstāko ALAT inhibīcijas spēju no pētāmajām vielām uzrādīja metformīns, jo ALAT inhibīciju novērojām jau 50 μM koncentrācijā. Metformīna iedarbība,

iespējams, izpaužas, kavējot JNK aktivāciju, kā arī stimulējot hipooksigenāzes-1 ekspresiju, kā rezultātā tiek nodrošināta aknu aizsardzība pret oksidatīvā stresa izraisītiem bojājumiem.

Saravi *et al.* pētījumā peles saņēma metformīnu (100 un 200 mg/kg, p.o.) 21 dienu. Lai novērtētu acetaminofēna izraisīto oksidatīvo stresu, tika mērīts malondialdehīda aknu audu līmenis, membrānas lipīdu peroksidācijas galaprodukts un superoksīda dismutāzes un glutaciona aktivitātes. Tika veikta histoloģiskā analīze un seruma ALAT, AST un ALP mērījumi. Pētījumā novēroja, ka metformīns normalizē antioksidantu nelīdzsvarotību, samazina ALAT, AST un ALP paaugstināšanos plazmā. Tas nozīmē, ka metformīns, iespējams, samazina kodola DNS bojājumus un sekojošo šūnu nāvi peles aknās pēc acetaminofēna pārdozēšanas. Turklāt metformīns devā 200 mg/kg, atšķirībā no mazākām devām, ievērojami samazināja aknu audu malondialdehīda līmeni pelēm, samazinot acetaminofēna izraisītos lipīdu peroksidācijas bojājumus aknās (Saravi *et al.*, 2016).

Geng *et al.* pētījumā metformīns (1,0 mmol/L) inhibēja palmitāta (0,5 mmol/L) izraisītu nekrotisku šūnu nāvi HepG2 šūnās. Šajā pētījumā tika parādīts, ka metformīns aizsargā hepatocītus no palmitāta izraisītas šūnu nāves. Metformīns daļēji inhibēja mitohondriju elpošanu, atjaunoja mitohondriju membrānas potenciālu, samazināja ROS veidošanos un inducēja SOD2 ekspresiju. Tāpēc ir iespējams, ka metformīns aizsargā pret palmitāta izraisītu šūnu nāvi, daļēji inhibējot mitohondriju kompleksu-I, tādējādi atjaunojot mitohondriju funkciju. Metformīna aizsargājošā iedarbība tika novērota gan hepatomas šūnu līnijā HepG2, gan primārajos žurku hepatocītos (Geng *et al.*, 2020).

Mūsu pētījumā tika pārbaudīta dažādu diklofenaka koncentrāciju ietekme uz AST, ALAT. Tikai pēc 5 min diklofenaks uzrāda statistiski ticami AST inhibīciju, un jau koncentrācijā 12,5 μM samazina enzīma aktivitāti (*attēls. 3.3.*). Pēc 30 min diklofenakam koncentrācijā 100 μM inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar TS efektu. Pētījumā izmantotās mazākās koncentrācijas (12,5 μM, 25 μM un 50 μM) neuzrādīja statistiski ticamu atšķirību (*attēls. 3.5.*). Pēc 60 min novērojām, ka diklofenaka efekti praktiski neatšķiras no mērījumiem pēc 30 min (*attēls. 3.7.*). Attēlā 3.11. redzams, ka tomēr diklofenaks neuzrādīja statistiski ticamu ALAT inhibīcijas spēju visas koncentrācijas.

Hassan *et al.* pētījumā parādīts, ka diklofenaka lietošana būtiski paaugstināja seruma enzīmu ALAT, AST, ALP un GGT aktivitātes, bilirubīna līmeni un proinflammatorisko citokīnu TNF-α un IL-17 līmeni. Šīs izmaiņas atspoguļo hepatocītu bojājumus un nekrozi, žults aknu disfunkciju, oksidatīvā stresa palielināšanos, antioksidantu aizsardzības sistēmas nomākšanu un iekaisuma un apoptozes palielināšanos (Hassan *et al.*, 2021). Arī citā Mostafa pētījumā diklofenaka ievadīšana (50 mg/kg/dienā) 7 dienas izraisīja ievērojamu aknu enzīmu līmeņa paaugstināšanos (ALT un AST). Šis atklājums liecina, ka diklofenaka ievadīšana

izraisīja nopietnus aknu membrānas bojājumus. Pētījumā žurkām, kurām injicēja diklofenaku, ievērojami samazinājās COX-2 proteīna ekspresija un aknu prostaglandīna-E2 līmenis. Var secināt, ka diklofenaka izraisīta hepatotoksicitāte varētu būt saistīta ar prostaglandīna-E2 līmeņa samazināšanos, ko sākotnēji izraisīja COX-2 proteīna ekspresijas samazināšanās (Mostafa *et al.*, 2020).

Mehānisms, ar kuru diklofenaks izraisa aknu bojājumus, ir saprotams tikai daļēji. Tiek uzskatīts, ka mitohondriju toksicitāte un reaktīvo metabolītu, piemēram, benzohinona-imīna starpproduktu veidošanās izraisa hepatotoksicitāti (Owumi & Dim., 2019). Diklofenaks izraisot oksidatīvo stresu, var kritiski iztukšot intracelulāros glutationa krājumus, un izraisīt citotoksicitāti un (Selvaraj *et al.*, 2023) var izraisīt mitohondriju caurlaidības poru veidošanos, taču mehānisms daļēji ietver elpošanas ķēdē ietilpstošo tiešu enzīmu inhibīciju un oksidatīvās fosforilācijas. Diklofenaks arī inhibē mitohondriju brīvo TS β -oksidāciju neatkarīgi no to inhibējošās iedarbības uz mitohondriju elpošanas ķēdi, tieši inhibējot galvenos šajā procesā iesaistītos mitohondriju enzīmus (Bessone *et al.*, 2018). Pētījumi liecina, ka šo zāļu hepatotoksiskā iedarbība ir nozīmīga, un pacientiem ar aknu slimību minimāla deva jāievada piesardzīgi. Tomēr ir pierādīts, ka diklofenaka izraisīts aknu bojājums lielākajai daļai pacientu ir atgriezenisks (Soleimanpour *et al.*, 2016).

Statistiski ticami visaugstāko AST inhibīcijas spēju uzrādīja celekoksibs koncentrācijās 50 μM un 100 μM (*attēls. 3.1.*). Pēc 5 min celekoksibs, jau koncentrācijā 12,5 μM samazina enzīma aktivitāti (*attēls. 3.3.*). Celekoksibam tika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti arī pēc 30 min inkubēšanas (*attēls. 3.5.*). Pēc 60 min novērojām, ka celekoksiba efekti praktiski neatšķiras no AST mērījumiem pēc 30 min (*attēls. 3.7.*). Celekoksibs statistiski ticami uzrāda no koncentrācijas atkarīgu ALP inhibīcijas efektu tikai 12,5 μM koncentrācijā (*attēls. 3.9.*).

Nesenā Zhu *et al.* pētījumā tika novērots, ka COX-2 inhibitors, celekoksibs, mazina aknu steatozi un iekaisuma reakciju NATAS peles modelī. Šis pētījums ir pirmais tiešais apstiprinājums tam, ka celekoksibs ir efektīvs ar lipoģenēzi saistītās NATAS gadījumā, nomācot no onkogēna homologa atkarīgu aknu *de novo* lipoģenēzi. Pētījumā ir sniegti pārliecinošie pierādījumi tam, ka celekoksibs samazina lipoģenēzes izraisītu aknu steatozi, ko papildina hepatocelulāro iekaisuma reakciju (TNF- α , IL-6 un IL-1 β) nomākšana. Kopumā šis pētījums norāda, ka celekoksibs nomāc *de novo* lipoģenēzi un mazina aknu steatozi, inaktivējot onkogēna homologa signālu pārraidi (Zhu *et al.*, 2022).

Ekor *et al.* pētījumā celekoksibs spēja būtiski mainīt ALAT līmeni līdz normālam līmenim. Paaugstināts ALAT līmenis, tiek konstatēts hepatocelulāro traucējumu gadījumā. Celekoksibs (5 un 10 mg/kg) ievērojami mainīja šo efektu, un tas varētu norādīt uz celekoksiba

uzlabojošo vai aizsargājošo iedarbību pret aknu disfunkciju, kas saistīta ar hiperlipidēmiju (Ekor *et al.*, 2021). Pēdējo desmit gadu laikā ir pierādīts, ka COX-2 ekspresija akūtu un hronisku aknu slimību gadījumā ir paaugstināta. Plaši pētījumi liecina, ka COX-2 aktivitātes inhibīcija uzlabo NASH smagumu, nomācot nekanonisko Wnt signālu ceļu, kavējot kodolfaktora- κ B aktivāciju, ET stresu un hepatocelulārās apoptozes veicināšanu. Tomēr molekulārās detaļas, ar kurām COX-2 inhibīcija uzlabo NASH, nav pilnībā noskaidrota (Zhu *et al.*, 2022).

Nimesulīdam piemīt pretsāpju, pretiekaisuma un pret drudža iedarbība, jo tas spēcīgi inhibē COX-2 enzīmus. Nimesulīda izraisītās hepatotoksicitātes mehānisms joprojām nav zināms. Ir ierosināts, ka tas varētu būt saistīts ar reaktīva metabolīta veidošanos (Zhang *et al.*, 2022). Klīniski nimesulīda izraisītu aknu bojājumu galvenokārt raksturo divi modeļi: hepatocelulārā nekroze un holestāze. Metaboliskā aktivācija var būt saistīta ar nimesulīda hepatotoksicitāti. Pētījumi ir parādījuši, ka nimesulīda oksidatīvā un reducējošā aktivācija neizraisa toksicitāti primārajos cilvēka un žurkas hepatocītos. Sākotnējās zāles mitohondriju toksicitātei var būt izšķiroša nozīme nimesulīda izraisītā žurku hepatocelulārajā toksicitātē. Līdz šim nimesulīda izraisītās holestāzes mehānisms joprojām nav skaidrs (Zhou *et al.*, 2017). Nimesulīda toksicitāte šūnu līmenī vēl nav skaidra. Molekulārā līmenī nimesulīda nitroaromātiskās grupas reducējošā bioaktivācija izraisa oksidatīvo stresu un var izraisīt aktīvo metabolītu kovalentu saistīšanos ar šūnu proteīniem. Terapeitiskās nimesulīda devas atvieno oksidatīvo-fosforilāciju un palielina šūnu membrānas caurlaidību (Bessone *et al.*, 2010).

Mūsu darbā tika pārbaudīta dažādu simvastatīnu un atorvastatīnu koncentrāciju ietekme uz AST, ALP un ALAT. Atorvastatīnam, diapazonā no 12,5 μ M līdz 50 μ M, un simvastatīnam, diapazonā no 25 μ M līdz 50 μ M AST inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar TS efektu (*attēls. 3.2.*) Pēc 5 min atorvastatīnam un simvastatīnam netika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti. Statīni uzrādīja statistiski ticamu inhibējošu darbību visā koncentrāciju diapazonā (*attēls. 3.4.*). Pēc 30 min statīniem saglabājas AST inhibīcija visās koncentrācijās, bet īpaši simvastatīnam iezīmējas no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti (*attēls. 3.6.*). Pēc 60 min novērojām, ka atorvastatīnam nav izteikta efekta un koncentrācijas sakarība, bet simvastatīnam tika novērota no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt AST aktivitāti arī pēc 60 min. Visaugstāko AST inhibīcijas spēju uzrādīja simvastatīns koncentrācijā 50 μ M (*attēls. 3.8.*). Atorvastatīnam, diapazonā no 6,25 μ M līdz 50 μ M, un simvastatīnam, diapazonā no 12,5 μ M līdz 50 μ M ALP inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar TS efektu (*attēls. 3.10.*). Attēlā 3.12. redzama statistiski ticama no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt ALAT aktivitāti tikai atorvastatīnam. Atorvastatīnam, diapazonā no 200 μ M līdz 400 μ M inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar TS efektu.

Statīniem ir vispāratzīta loma sirds un asinsvadu slimība primārajā un sekundārajā profilaksē, un tie ir droši pacientiem ar hronisku aknu slimību, piemēram, NATAS, tostarp pacientiem ar vieglu sākotnējo transamināžu līmeņa paaugstināšanos. Tāpat ir pierādījumi, ka statīni var vājināt NASH un samazināt aknu fibrozes risku. Lai gan pētījumu dati liecina, ka statīnus var droši lietot pacientiem ar NATAS, šiem pacientiem statīnus joprojām izraksta par maz, jo pastāv bažas par hepatotoksicitāti. Tomēr jāņem vērā, ka statīni ir kontrindicēti pacientiem ar dekompensētu cirozi vai akūtu aknu mazspēju (Martin *et al.*, 2022). Dažādos pētījumos ar dzīvniekiem tika konstatēts, ka statīni vairākos veidos uzlabo aknu lipotoksicitāti, oksidatīvo stresu, iekaisuma reakcijas un fibrozi, kas saistīta ar NASH. Statīni izraisa šo aizsargiedarbību, atjaunojot peroksisomālā proliferatora aktivētā receptora alfa gēnu ekspresijas līmeni un tādējādi atjaunojot mitohondriālo un peroksisomālo TS oksidāciju. Ārstēšana ar statīniem arī palielināja paraoksonāzes-1 līmeni, kas ir antioksidants un antiaterogēns enzīms, kas tiek samazināts NATAS gadījumā (Ahsan *et al.*, 2020).

Vairāki pētījumi ir parādījuši simvastatīna drošības un efektivitātes rezultātus pacientiem ar NATAS un NASH. Abel *et al.* veica pētījumu ar nelielu NATAS pacientu grupu un atklāja, ka simvastatīns 20 mg dienā 6 mēnešus ievērojami samazināja AST, ALAT līmeni šiem pacientiem (Abel *et al.*, 2009).

Alkhatatbeh *et al.* pētījumā HepG2 šūnu pirmapstrāde ar zemām simvastatīna devām (4–10 μ M) spēja samazināt oleīnskābes izraisīto intracelulāro lipīdu uzkrāšanos par \sim 40%. Turpretim pirmapstrāde ar lielām simvastatīna devām (20 un 30 μ M) izraisīja HepG2 šūnu apoptozi, ko atklāja šūnu morfoloģijas izmaiņas (Alkhatatbeh *et al.*, 2016).

Atorvastatīns, lipīdu līmeni pazeminošs līdzeklis, ir pasaulē visbiežāk izrakstītais statīnu līdzeklis, un to lieto hiperholesterinēmijas vai jauktas dislipidēmijas ārstēšanai. Atorvastatīns veic savu aizsargājošo lomu, konkurētspējīgi inhibējot 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzīma A reduktāzi, kas, kā zināms, nomāc mevalonāta ceļu un pēc tam *de novo* aknu holesterīna sintēzi. Tomēr pētījumi, kas pēta atorvastatīnu spēju novērst NATAS, ir ierobežoti, un tā molekulārie mehānismi nav pilnībā izprotami (Zhang *et al.*, 2020).

Gomez-Dominguez *et al.* pētījumā 22 pacienti ar NATAS saņēma 10 - 80 mg atorvastatīna dienā 6 mēnešus un konstatēja ievērojamu aminotransferāzes un holesterīna līmeņa uzlabošanos. Seruma aminotransferāzes un lipīdu līmenis bija ievērojami samazināts visiem pacientiem, kuri saņēma atorvastatīnu. Tika konstatēts, ka terapija ar atorvastatīnu NATAS pacientiem ar hiperlipidēmiju ir efektīva un droša (Gómez-Domínguez *et al.*, 2006).

Citā pētījumā, kas tika veikts 27 ar biopsiju pierādītiem NASH pacientiem ar hiperlipidēmiju, Kiyici *et al.* atklāja daudzsološo atorvastatīna iedarbību, lietojot 10 mg dienā 6 mēnešus. Tika pierādīts, ka atorvastatīns samazina ALAT, GGT, ALP aktivitāti un ievērojami

samazina taukaino infiltrāciju aknās. Pētījumā netika novērots hepatotoksicitātes risks, lietojot atorvastatīna terapiju, kas izpaužas kā transamināžu līmeņa paaugstināšanās (Kiyici *et al.*, 2003).

4.2. Dažādu vielu efekti uz AChE aktivitāti HepG2 šūnas taukainas aknas modelī

Holīnesterāzes aktivitātes fizioloģiskā nozīme aknās un serumā līdz šim nav noskaidrota. AChE var darboties hepatocītos un citās epitēlija šūnās, lai inaktivētu asinsritē cirkulējošo ACh. Tomēr AChE var būt iesaistīts arī dažos starpšūnu un intracelulāros regulēšanas mehānismos (García-Ayllón *et al.*, 2006). Simpātiskie nervu signāli tiek pārraidīti uz katru orgānu, kas iesaistīts TG metabolismā. Tas palielina brīvo TS sekrēciju no baltajiem taukaudiem un veicina ļoti zema blīvuma lipoproteīnu TG veidošanos un sekrēciju no aknām, izraisot paaugstinātu TG līmeni asinīs. Tā kā parasimpātiskā aktivitāte samazina ļoti zema blīvuma lipoproteīna TG sekrēciju un palielina TG uzkrāšanos aknās, un holīnesterāzes aktivitāte serumā ir paaugstināta cilvēka NATAS gadījumā, AChE inhibitoriem var būt zināma ietekme uz aknu lipīdu metabolismu (Yokota *et al.*, 2014).

Mūsu darbā HepG2 supernatantos tika mērīta AChE aktivitāte pēc 24 h šūnu inkubēšanas pētāmo vielu klātbūtnē. AChE tika mērīta atbilstoši metodes darba gaitai 30 min pēc pēdējā reaģenta pievienošanas. AChE darbības novērtēšanas rezultāti norādīja uz to, ka dažādām vielām piemīt spēja inhibēt AChE aktivitāti, jo pētītās vielas visās koncentrācijās samazināja AChE līmeni, salīdzinot ar TS efektu. Tomēr no koncentrācijas atkarīgs efekts bija neostigmīnam, silimarīnam, metformīnam un celekoksībam. Diklofenakam un nimesulīdam novērojām AChE pazeminājumu, bet nebija izteikta koncentrācijas un efekta sakarība. Zināmais AChE inhibitors neostigmīns uzrādīja visaugstāko AChE inhibīcijas spēju (*attēls. 3.13.*).

Emad *et al.* pētījuma mērķis bija izpētīt nesteroido pretiekaisuma līdzekļu (NPL) neuroprotektīvo un uzlabojošo ietekmi uz atmiņas funkcijām, šūnu oksidatīvo stāvokli un antioksidantu enzīmu aktivitāti un AChE aktivitāti. Sinaptiskā plastiskums ir svarīga neuroķīmiska funkcija kognitīvos procesos. Uzlabotā atmiņas funkcija pēc NPL ievadīšanas žurkām, var būt saistīta ar COX-2 enzīmu inhibīciju, tādējādi novēršot prostaglandīnu sintēzi. Paaugstināta AChE aktivitāte izraisa ACh līmeņa pazemināšanos nervu sistēmā, izraisot atmiņas traucējumus. Tika konstatēts, ka NPL spēj inhibēt AChE. Šajā pētījumā paaugstināta AChE aktivitāte tika normalizēta žurkām, kuras tika ārstētas ar dometacīnu un diklofenaka nātriju. Tas parāda, ka NPL var uzlabot atmiņu, inhibējot AChE aktivitāti. Tāpēc tiek secināts, ka indometacīnam un diklofenaka nātrija sāls var būt inhibējošas funkcijas, kas ir līdzīgas

AChE inhibitoriem, kas var palielināt ACh līmeni, un uzlabot atmiņas veiktspēju (Emad *et al.*, 2017).

Gaur *et al.* pētījums izceļ celekoksiba un nimesulīda neuroprotektīvo iedarbību pret išēmijas reperfūzijas traumu izraisītu atmiņas disfunkciju, neuroiekaisumiem un oksidatīviem bojājumiem. Septiņas dienas ilgas ārstēšanas ar celekoksibu (3 un 10 mg/kg, p.o.), nimesulīdu (10 mg/kg, p.o.) un ibuprofēnu (30 mg/kg, p.o.) būtiski uzlaboja uzvedības izmaiņas un glutaciona aizsardzību un samazināja AChE aktivitāti un TNF- α līmeni, salīdzinot ar kontroles grupu. ACh, neurotransmitters, kas saistīts ar mācīšanos un atmiņu, ko noārda enzīms AChE, pārtraucot neurotransmitera fizioloģisko darbību. AChE aktivitātes pieaugums var izraisīt holīnerģiskās transmisijas samazināšanos, ko izraisa ACh līmeņa pazemināšanās hipokampā. COX inhibitori lielākas devas uzrādīja būtisku paaugstinātas AChE aktivitātes samazināšanos. AChE aktivitātes inhibīcija bija izteiktāka, ārstējot ar celekoksibu un nimesulīdu, salīdzinot ar ibuprofēnu, šī atšķirība var būt saistīta ar selektivitāti pret COX-2 enzīmu (Gaur & Kumar, 2012).

Nesenā pētījumā rezultāti norāda, ka metformīns visās koncentrācijās diapazonā no 25 μ M līdz 100 μ M samazināja AChE līmeni, salīdzinot ar TS efektu. Pētījuma mērķis bija novērtēt metformīna profilaktisko darbību Alcheimera slimības modeļos. Tika pārbaudīta metformīna (75 un 100 mg/kg) ietekme uz kognitīvajām funkcijām. Tika noteikta metformīna ietekme, iedarbojoties uz smadzeņu glikozes transportu un neironu metabolismu. Un tika noteikta metformīna ietekme uz neuroiekaisumu, ACh esterāzes blīvumu un aktivitāti, kā arī uz sinaptisko plastiskumu. Rezultāti parādīja, ka metformīns mainīja streptozocīna izraisītos telpiskās mācīšanās/atmiņas veiktspējas traucējumus. Alcheimera slimības modeļa žurkām metformīns uzlaboja mikrogliozī un astrogliozī. Metformīns arī saglabāja hipokampu sinaptisko plastiskumu un normalizēja ACh šķelšanos garozas un hipokampu audos, kā arī inhibēja AChE aktivitāti *in vitro* (Pilipenko *et al.*, 2020).

Jaunākie pētījumi liecina, ka silimarīnam ir arī laba farmakoloģiskā aktivitāte nervu sistēmā, īpaši Alcheimera slimības ārstēšanai. Silimarīns var kontrolēt A β veidošanos, inhibējot A β prekursoru vielu (β -amiloīda prekursoru proteīnu), un tas var kavēt A β polimerizāciju. Silimarīns var arī palielināt ACh saturu nervu sistēmā, inhibējot holīnesterāzes aktivitāti. Tajā pašā laikā tam ir arī pretestība oksidatīvajam stresam un nervu sistēmas iekaisuma reakcijai. Silimarīnam ir laba inhibējoša iedarbība uz AChE un BChE. Tas var palielināt ACh saturu, kavējot AChE un BChE aktivitāti, tādējādi atvieglojot Alcheimera slimības stāvokli. Guo *et al.* pētījumā novēroja, ka pēc apstrādes ar silimarīnu AChE aktivitāte nervu sistēmā tika ievērojami samazināta, un holīnerģiskā aktivitāte palielinājās. Silimarīna iedarbība ir līdzīga Alcheimera slimības medikamentam donepezilam klīniskajam pielietojumam (Guo *et al.*, 2019).

Neostigmīnu izmanto kā anestēzijas līdzekli, lai novērstu nedepolarizējošo neiromuskulāro blokādi. Parasti neostigmīnu hidrolizē holīnesterāze un metabolizē aknu mikrosomu enzīmi (Eldufani & Blaise, 2019). Tas var atgriezeniski inhibēt AChE aktīvajā vietā, izmantojot serīna karboksilāciju, veicināt impulsu pārraidi starp neiromuskulāriem savienojumiem un uzlabot holīnērgisko iedarbību. Ārstēšana ar AChEI uzlabo ACh transportēšanu, kas potenciāli var novērst neuroiekaisumu. Eksperimenti ar dzīvniekiem ir parādījuši, ka AChEI neostigmīns var samazināt pēcoperācijas smadzeņu garozas un hipokampa iekaisuma reakciju un neurodeģenerāciju, samazinot AChE aktivitāti un līmeni (Zhu *et al.*, 2020). Aknu darbību modulē gan simpātiskie, gan parasimpātiskie nervi, līdz ar to aknu darbību var ietekmēt holīnērgisko nervu stimulēšana ar ACh, kas uzkrātas AChEI ievadīšanas laikā (Zhang *et al.*, 2016).

Steinebrunner *et al.* pētījumā tiek parādīts, ka neostigmīns samazina acetaminofēna hepatotoksisko iedarbību. Neostigmīns uzlaboja aknu darbību un pazemināja iekaisuma citokīnu TNF- α un IL-1 β līmeni. Neostigmīna aizsargājošā iedarbība, samazinot sistēmisko iekaisumu caur holīnērgisko ceļu, var būt atbildīga par uzlabotu dzīvildzi pēc acetaminofēna lietošanas. Aizsardzības efekta tendence tika novērota pat tad, kad pirmā neostigmīna deva tika aizkavēta par 1 stundu pēc intoksikācijas ar acetaminofēnu. Noslēgumā pētījumā atklājumi norāda uz holīnesterāzes inhibitora neostigmīna iespējamo ieguvumu acetaminofēna izraisītas akūtas aknu mazspējas gadījumā, modulējot nelīdzsvarotus pretiekaisuma ceļus (Steinebrunner *et al.*, 2014).

Ir nepieciešami turpmāki pētījumi, lai noteiktu precīzu holīnērgiskās sistēmas lomu NATAS gadījumā un novērtētu holīnesterāzes inhibitorus kā potenciālu terapeitisku iespēju NATAS skartajiem pacientiem.

5. SECINĀJUMI

1. Visām pētītajām vielām ir no koncentrācijas atkarīga spēja samazināt TS paaugstināto AST aktivitāti. Enzimātiskā reakcija sākas uzreiz, bet pēc 60 min sasniedz plato stāvokli. Silimarīns 50 un 100 μM koncentrācijā un metformīns 100 μM koncentrācijā normalizē AST līmeni.
2. Pētītās vielas samazina TS izraisīto ALP 5-7 reizes aktivitātes pieaugumu. Maksimālo efektu - 50% samazinājumu, salīdzinot ar TS efektu, statīni uzrāda 12,5 μM koncentrācijā, celekosibs 50 μM koncentrācijā, bet pārējās vielas 100 μM koncentrācijā.
3. TS paaugstināto ALAT līmeni samazina silimarīns, metformīns un atorvastatīns. Citas pētītās vielas neizmaina TS efektu. Statistiski ticami visaugstāko ALAT inhibīcijas spēju no pētāmajām vielām uzrādīja silimarīns un metformīns, jo tām ALAT inhibīciju novērojām sākot no 100 μM koncentrācijas, bet atorvastatīnam no 200 μM koncentrācijas.
4. Pētītās vielas visās koncentrācijās samazināja TS izraisīto AChE līmeņa paaugstinājumu līdz kontroles līmenim. Zināmais AChE inhibitors neostigmīns uzrādīja visaugstāko AChE inhibīcijas spēju.
5. Mūsu pētījuma rezultāti norāda uz dažādu farmakoloģiskā darbības mehānismu vielu spēju samazināt TS efektus uz aknu enzīmiem, kas atspoguļojas kā ALAT, AST, ALP un AChE paaugstināto līmeņu samazināšana vai normalizēšana. Pieļaujam, ka šīs vielas, vienlaicīgi ar TS pievienojot HepG2 šūnām, inhibē TS nonākšanu šūnā un lipogēnēzi.

6. PATEICĪBAS

Izsaku milzīgu pateicību LU Medicīnas fakultātes zinātniskā darba vadītajai Dr.habil.biol. Rutai Muceniecei par neatsveramu ieguldījumu un palīdzību pētījuma izveidē un par iespēju izstrādāt darbu viņas vadībā. Pateicība LU fonda un SIA Mikrotīkls projekta Nr. 2269 finansējumam.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Ali, A. H., Petroski, G. F., Diaz-Arias, A. A., Al Juboori, A., Wheeler, A. A., Ganga, R. R., Pitt, J. B., Spencer, N. M., Hammoud, G. M., Rector, R. S., Parks, E. J., & Ibdah, J. A. (2021). A model incorporating serum alkaline phosphatase for prediction of liver fibrosis in adults with obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Medicine*, 10(15). <https://doi.org/10.3390/jcm10153311>
2. Ali, A., & Zhang, K. (2018). Endoplasmic reticulum stress response in nonalcoholic fatty liver disease. *Environmental Disease*, 3(2), 31. https://doi.org/10.4103/ed.ed_11_18
3. Abel, T., Fehér, J., Dinya, E., Eldin, M. G., & Kovács, A. (2009). Safety and efficacy of combined ezetimibe/simvastatin treatment and simvastatin monotherapy in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 15(12), MS6-11. <http://europepmc.org/abstract/MED/19946244>
4. Ahsan, F., Oliveri, F., Goud, H. K., Mehkari, Z., Mohammed, L., Javed, M., Althwanay, A., & Rutkofsky, I. H. (2020). Pleiotropic Effects of Statins in the Light of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Cureus*, 12(9). <https://doi.org/10.7759/cureus.10446>
5. Alkhatatbeh, M. J., Lincz, L. F., & Thorne, R. F. (2016). Low simvastatin concentrations reduce oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells: An in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(4), 1487–1492. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3069>
6. Aoudjehane, L., Gautheron, J., Le Goff, W., Goumard, C., Gilaizeau, J., Nget, C. S., Savier, E., Atif, M., Lesnik, P., Morichon, R., Chrétien, Y., Calmus, Y., Scatton, O., Housset, C., & Conti, F. (2020). Novel defatting strategies reduce lipid accumulation in primary human culture models of liver steatosis. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 13(4). <https://doi.org/10.1242/dmm.042663>
7. Arzumian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
8. Athyros, V. G., Tziomalos, K., Gossios, T. D., Griva, T., Anagnostis, P., Kargiotis, K., Pagourelis, E. D., Theocharidou, E., Karagiannis, A., & Mikhailidis, D. P. (2010). Safety and efficacy of long-term statin treatment for cardiovascular events in patients

- with coronary heart disease and abnormal liver tests in the Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation (GREACE) Study: a post-hoc analysis. *The Lancet*, 376(9756), 1916–1922. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61272-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61272-X)
9. Au Young, B., Gutha Ravichandran, A., Patel, D., Dave, N., Shah, A., Wronko-Stevens, B., Bettencourt, F., Rajan, R., & Menon, N. (2022). A Low-Cost Paper-Based Device for the Colorimetric Quantification of Bilirubin in Serum Using Smartphone Technology. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.869086>
 10. Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian, S., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). *Silybum marianum*: Beyond Hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 20(4), 292–301. <https://doi.org/10.1177/2156587215571116>
 11. Bale, S. S., Golberg, I., Jindal, R., McCarty, W. J., Luitje, M., Hegde, M., Bhushan, A., Usta, O. B., & Yarmush, M. L. (2014). Long-Term Coculture Strategies for Primary Hepatocytes and Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21(4), 413–422. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0152>
 12. Bedossa, P. (2017). Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 37(S1), 85–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/liv.13301>
 13. Bessone, F., Colombato, L., Fassio, E., Reggiardo, M. V., Vorobioff, J., & Tanno, H. (2010). The Spectrum of Nimesulide-Induced-Hepatotoxicity. An Overview. In *Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Vol. 9)*.
 14. Bessone, F., Dirchwolf, M., Rodil, M. A., Razori, M. V., & Roma, M. G. (2018). Review article: drug-induced liver injury in the context of nonalcoholic fatty liver disease – a physiopathological and clinical integrated view. In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics (Vol. 48, Issue 9, pp. 892–913)*. <https://doi.org/10.1111/apt.14952>
 15. Boeckmans, J., Natale, A., Rombaut, M., Buyl, K., Rogiers, V., De Kock, J., Vanhaecke, T., & Rodrigues, R. M. (2020). Anti-nash drug development hitches a lift on ppar agonism. In *Cells (Vol. 9, Issue 1)*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells9010037>
 16. Borrello, M. T., & Mann, D. (2022). Chronic liver diseases: From development to novel pharmacological therapies: IUPHAR Review 37. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.15853>
 17. Brennan, P. N., Dillon, J. F., & Tapper, E. B. (2022). Gamma-Glutamyl Transferase (γ -GT) – an old dog with new tricks? In *Liver International (Vol. 42, Issue 1, pp. 9–15)*. <https://doi.org/10.1111/liv.15099>
 18. Bril, F., & Cusi, K. (2017). Management of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: A call to action. In *Diabetes Care (Vol. 40, Issue 3, pp. 419–430)*. American Diabetes Association Inc. <https://doi.org/10.2337/dc16-1787>

19. Bril, F., Ortiz-Lopez, C., Lomonaco, R., Orsak, B., Freckleton, M., Chintapalli, K., Hardies, J., Lai, S., Solano, F., Tio, F., & Cusi, K. (2015). Clinical value of liver ultrasound for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in overweight and obese patients. *Liver International*, 35(9), 2139–2146.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/liv.12840>
20. Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism - Clinical and Experimental*, 65(8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
21. Cacciapuoti, F., Scognamiglio, A., Palumbo, R., Forte, R., & Cacciapuoti, F. (2013). Silymarin in non alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 5(3), 109–113. <https://doi.org/10.4254/wjh.v5.i3.109>
22. Calitz, C., Hamman, J. H., Fey, S. J., Wrzesinski, K., & Gouws, C. (2018). Recent advances in three-dimensional cell culturing to assess liver function and dysfunction: from a drug biotransformation and toxicity perspective. In *Toxicology Mechanisms and Methods* (Vol. 28, Issue 5, pp. 369–385).
<https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1422580>
23. Caturano, A., Acierno, C., Nevola, R., Pafundi, P. C., Galiero, R., Rinaldi, L., Salvatore, T., Adinolfi, L. E., & Sasso, F. C. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease: From pathogenesis to clinical impact. In *Processes* (Vol. 9, Issue 1, pp. 1–18).
<https://doi.org/10.3390/pr9010135>
24. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S. A., Brunt, E. M., & Sanyal, A. J. (2018). The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 67(1), p 328-357. DOI: 10.1002/hep.29367
25. Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., Liu, J., Cheng, J., Lu, Y., & Chen, Y. (2018). Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sciences*, 203, 291–304.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.022>
26. Chen, Z., Yu, R., Xiong, Y., Du, F., & Zhu, S. (2017). A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0572-9>
27. Claus, M., Antoni, C., & Hofmann, B. (2021). Factors associated with elevated alanine aminotransferase in employees of a German chemical company: results of a large cross-sectional study. *BMC Gastroenterology*, 21(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01601-2>

28. Cominguez, D. C., Kang, Y.-M., Nugroho, A., & Kim, S. (2021). Clitorin, a Flavonoid Compound of Papaya, Ameliorates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Western Diet-induced Mice and Oleic Acid-induced HepG2 Cells. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-841938/v1>
29. Cusi, K., Orsak, B., Bril, F., Lomonaco, R., Hecht, J., Ortiz-Lopez, C., Tio, F., Hardies, J., Darland, C., Musi, N., Webb, A., & Portillo-Sanchez, P. (2016). Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine*, 165(5), 305–315. <https://doi.org/10.7326/M15-1774>
30. Das, U. N. (2012). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation (Vol. 11, Issue 3).
31. De Avelar CR, Pereira EM, de Farias Costa PR, de Jesus RP, de Oliveira LPM. (2017). Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol*; 23(27), 5004-5017. DOI: 10.3748/wjg.v23.i27.5004
32. Delli Bovi, A. P., Marciano, F., Mandato, C., Siano, M. A., Savoia, M., & Vajro, P. (2021). Oxidative Stress in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. An Updated Mini Review. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.595371>
33. De Siervi, S., & Turato, C. (2023). Liver Organoids as an In Vitro Model to Study Primary Liver Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ijms24054529>
34. Duell, P. B., Welty, F. K., Miller, M., Chait, A., Hammond, G., Ahmad, Z., Cohen, D. E., Horton, J. D., Pressman, G. S., Toth, P. P., & null, null. (2022). Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(6), 168–185. <https://doi.org/10.1161/ATV.000000000000153>
35. Dyson, J., & Day, C. (2014). Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases*, 32(5), 597–604. <https://doi.org/10.1159/000360511>
36. Ekor, M., Agyei, P. E. O., Obese, E., Biney, R. P., Henneh, I. T., Antwi-Adjei, M., Yahaya, E. S., Amoakohene, G., & Akakpo, P. K. (2021). Celecoxib exhibits therapeutic potential in experimental model of hyperlipidaemia. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247735>
37. El Awdan, S. A., & Asaad, G. F. (2021). Liver Fibrosis: Underlying Mechanisms and Innovative Therapeutic Approach. A Review Article. In *Biomedical and Pharmacology Journal* (Vol. 14, Issue 4, pp. 1841–1862). <https://doi.org/10.13005/bpj/2283>

38. Eldufani, J., & Blaise, G. (2019). The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. In *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* (Vol. 5, pp. 175–183).
<https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.03.004>
39. Emad, S., Qadeer, S., Sadaf, S., Batool, Z., Haider, S., & Perveen, T. (2017). Attenuation of stress induced memory deficits by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in rats: Role of antioxidant enzymes. *Pharmacological Reports*, 69(2), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.11.009>
40. Eynaudi, A., Díaz-Castro, F., Bórquez, J. C., Bravo-Sagua, R., Parra, V., & Troncoso, R. (2021). Differential Effects of Oleic and Palmitic Acids on Lipid Droplet-Mitochondria Interaction in the Hepatic Cell Line HepG2.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.775382>
41. Fernández, T., Viñuela, M., Vidal, C., & Barrera, F. (2022). Lifestyle changes in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis, 17(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263931>
42. Francque, S. M., Marchesini, G., Kautz, A., Walmsley, M., Dorner, R., Lazarus, J. V., Zelber-Sagi, S., Hallsworth, K., Busetto, L., Frühbeck, G., Dicker, D., Woodward, E., Korenjak, M., Willemse, J., Koek, G. H., Vinker, S., Ungan, M., Mendive, J. M., & Lionis, C. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease: A patient guideline. *JHEP Reports*, 3(5). <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100322>
43. Fujii J, Homma T, Kobayashi S, Seo HG. (2018). Mutual interaction between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of diseases specifically focusing on non-alcoholic fatty liver disease. *World J Biol Chem*. 9(1), 1-15
DOI: [10.4331/wjbc.v9.i1.1](https://doi.org/10.4331/wjbc.v9.i1.1)
44. Ganguli, S., DeLeeuw, P., & Satapathy, S. K. (2019). A Review Of Current And Upcoming Treatment Modalities In Non-Alcoholic Fatty Liver Disease And Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, Volume 11, 159–178.
<https://doi.org/10.2147/hmer.s188991>
45. García-Ayllón, M. S., Silveyra, M. X., Candela, A., Compañ, A., Clària, J., Jover, R., Pérez-Mateo, M., Felipo, V., Martínez, S., Galcerán, J., & Sáez-Valero, J. (2006). Changes in liver and plasma acetylcholinesterase in rats with cirrhosis induced by bile duct ligation. *Hepatology*, 43(3), 444–453. <https://doi.org/10.1002/hep.21071>
46. Gaur, V., & Kumar, A. (2012). Effect of nonselective and selective COX-2 inhibitors on memory dysfunction, glutathione system, and tumor necrosis factor alpha level

- against cerebral ischemia reperfusion injury. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(2), 218–224. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.589850>
47. Geng, Y., Hernández Villanueva, A., Oun, A., Buist-Homan, M., Blokzijl, H., Faber, K. N., Dolga, A., & Moshage, H. (2020). Protective effect of metformin against palmitate-induced hepatic cell death. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165621>
48. Gillessen, A., Angelico, F., Chen, J., Lu, L., Lucena, M. I., Fu, Q., Xie, Q., Andrade, R. J., Xie, W., Xu, X., Yu, Y., Mao, Y., & Nan, Y. (2022). Silymarin for Treating Toxic Liver Disease: International Consensus Recommendations. *Gastro Hep Advances*, 1(5), 882–893. <https://doi.org/10.1016/j.gastha.2022.05.006>
49. Gillessen Hartmut H-J Schmidt, A. (2020). Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11778396>
50. Giraudi, P. J., Barbero Becerra, V. J., Marin, V., Chavez-Tapia, N. C., Tiribelli, C., & Rosso, N. (2015). The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(1), 85–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.12.006>
51. Gómez-Domínguez, E., Gisbert, J. P., Moreno-Montegudo, J. A., García-Buey, L., & Moreno-Otero, R. (2006). A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemid, non-alcoholic fatty liver patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(11), 1643–1647. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02926.x>
52. Green, C. J., Johnson, D., Amin, H. D., Sivathondan, P., Silva, M. A., Mun Wang, L., Stevanato, L., McNeil, C. A., Miljan, E. A., Sinden, J. D., Morten, K. J., & Leanne Hodson, X. (2015). Characterization of lipid metabolism in a novel immortalized human hepatocyte cell line, 511–522. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00594.2014>
53. Grønkjær, L. L., & Lauridsen, M. M. (2021). Impact of liver disease on patients' quality of life: a mixed methods systematic review protocol. *JBIC Evidence Synthesis*, 19(6), pp. 1412-1417. DOI: 10.11124/JBIES-20-00185
54. Grüngreiff, K., Gottstein, T., Reinhold, D., & Blindauer, C. A. (2021). Albumin substitution in decompensated liver cirrhosis: Don't forget zinc. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/nu13114011>
55. Guerra Ruiz, A. R., Crespo, J., López Martínez, R. M., Iruzubieta, P., Casals Mercadal, G., Lalana Garcés, M., Lavin, B., & Morales Ruiz, M. (2021). Measurement and clinical usefulness of bilirubin in liver disease. In *Advances in Laboratory Medicine* (Vol. 2, Issue 3, pp. 352–361). <https://doi.org/10.1515/almed-2021-0047>

56. Guo, X., Yin, X., Liu, Z., & Wang, J. (2022). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 24).
<https://doi.org/10.3390/ijms232415489>
57. Guo, H., Cao, H., Cui, X., Zheng, W., Wang, S., Yu, J., & Chen, Z. (2019). Silymarin's inhibition and treatment effects for Alzheimer's disease. *Molecules*, 24(9).
<https://doi.org/10.3390/molecules24091748>
58. Haigh, L., Kirk, C., El Gendy, K., Gallacher, J., Errington, L., Mathers, J. C., & Anstee, Q. M. (2022). The effectiveness and acceptability of Mediterranean diet and calorie restriction in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 41(9), 1913–1931.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.06.037>
59. Hakkak, R., Rose, S., Spray, B., Kozaczek, M., & Korourian, S. (2021). Effects of obesity and 10 weeks metformin treatment on liver steatosis. *Biomedical Reports*, 14(6).
<https://doi.org/10.3892/br.2021.1425>
60. Hardy, T., Anstee, Q. M., & Day, C. P. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: New treatments. In *Current Opinion in Gastroenterology* (Vol. 31, Issue 3, pp. 175–183).
<https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000175>
61. Hassan, R. A., Hozayen, W. G., Abo Sree, H. T., Al-Muzafar, H. M., Amin, K. A., & Ahmed, O. M. (2021). Naringin and Hesperidin Counteract Diclofenac-Induced Hepatotoxicity in Male Wistar Rats via Their Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiapoptotic Activities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
<https://doi.org/10.1155/2021/9990091>
62. Hashem, A., Shastri, Y., Al Otaibi, M., Buchel, E., Saleh, H., Ahmad, R., Ahmed, H., Al Idris, F., Ahmed, S., Guda, M., & Gillessen, A. (2021). Expert opinion on the management of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the middle east with a focus on the use of silymarin. In *Gastroenterology Insights* (Vol. 12, Issue 2).
<https://doi.org/10.3390/GASTROENT12020014>
63. Hong, T., Chen, Y., Li, X., & Lu, Y. (2021). The Role and Mechanism of Oxidative Stress and Nuclear Receptors in the Development of NAFLD.
<https://doi.org/10.1155/2021/6889533>
64. Huang, Y., Wang, X., Yan, C., Li, C., Zhang, L., Zhang, L., Liang, E., Liu, T., & Mao, J. (2022). Effect of metformin on nonalcoholic fatty liver based on meta-analysis and network pharmacology. *Medicine (United States)*, 101(43).
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000031437>

65. Hyodo, T., Yada, N., Hori, M., Maenishi, O., Lamb, P., Sasaki, K., Onoda, M., Kudo, M., Mochizuki, T., & Murakami, T. (2017). Multimaterial Decomposition Algorithm for the Quantification of Liver Fat Content by Using Fast-Kilovolt-Peak Switching Dual-Energy CT: Clinical Evaluation. *Radiology*, 283(1), 108–118. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017160130>
66. Janorkar, A.V., Harris, L.M., Murphey, B.S. and Sowell, B.L. (2011), Use of three-dimensional spheroids of hepatocyte-derived reporter cells to study the effects of intracellular fat accumulation and subsequent cytokine exposure. *Biotechnol. Bioeng.*, 108: 1171-1180. <https://doi.org/10.1002/bit.2302>
67. Kalas MA, Chavez L, Leon M, Taweeseedt PT, Surani S. (2021). Abnormal liver enzymes: A review for clinicians. *World J Hepatol.* 13(11), 1688-1698 DOI: [10.4254/wjh.v13.i11.1688](https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i11.1688)
68. Kelly, N., & Wattacheril, J. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Evidence-Based Management and Early Recognition of Nonalcoholic Steatohepatitis. *The Journal for Nurse Practitioners*, 15(9), 622–626. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2019.06.008>
69. Khan, S. U., Munir., & Khan, U. (2022). Molecular developments in cell models of fatty liver disease. <https://doi.org/10.30493/DLS.2022.325915>
70. Kim, J. G., Chang, K., Choo, E. H., Lee, J. M., & Seung, K. B. (2018). Serum gamma-glutamyl transferase is a predictor of mortality in patients with acute myocardial infarction. *Medicine (United States)*, 97(29). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011393>
71. Kim, J., Koo, B. K., & Knoblich, J. A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 10, pp. 571–584). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0259-3>
72. Kiyici, M., Gulten, M., Gurel, S., Giray Nak, S., Dolar, E., Savci, G., Balaban Adim, S., Yerci, O., & Memik, F. (2003). Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. In *Can J Gastroenterol* (Vol. 17).
73. Kobayashi, A., Suzuki, Y., & Sugai, S. (2020). Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Journal of Toxicology*, 45(9), 515-537. doi: 10.2131/jts.45.515.
74. Kosmalski, M., Frankowski, R., Ziółkowska, S., Różycka-Kosmalska, M., & Pietras, T. (2023). What’s New in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/jcm12051852>

75. Kostrzewski, T., Cornforth, T., Snow, S. A., Ouro-Gnao, L., Rowe, C., Large, E. M., & Hughes, D. J. (2017). Three-dimensional perfused human in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(2), 204–215. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i2.204>
76. Kwaifa, I. K., Mainasara, A. S., Jidda, M. L., Amin, A. M., Abdullahi, G., Ladan, F., & Danyaro, M. (2023). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and the Significance of High-Density Lipoprotein as a Molecular Modifier. *Non-alcoholic Fatty Liver Disease*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108199>
77. Lam, B. P., & Younossi, Z. M. (2009). Treatment regimens for non-alcoholic fatty liver disease. DOI: 10.1016/S1665-2681(19)31827-7
78. Lange, N. F., Graf, V., Caussy, C., & Dufour, J. F. (2022). PPAR-Targeted Therapies in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Diabetic Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/ijms23084305>
79. Lebeaupin, C., Vallée, D., Hazari, Y., Hetz, C., Chevet, E., & Bailly-Maitre, B. (2018). Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. In *Journal of Hepatology* (Vol. 69, Issue 4, pp. 927–947). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.008>
80. Lee, B., Kim, J. Y., & Choi, Y. M. (2022). Effects of serum aspartate aminotransferase activity on levels of serum Ca^{2+} , Ca^{2+} channel genes, apoptotic factors, and meat quality characteristics of chicken pectoralis major muscle. *Poultry Science*, 101(12). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102214>
81. Lee, S. J., & Kim, S. U. (2019). Noninvasive monitoring of hepatic steatosis: controlled attenuation parameter and magnetic resonance imaging-proton density fat fraction in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 13(6), 523–530. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1608820>
82. Levitt, M. D., Hapak, S. M., & Levitt, D. G. (2022). Alkaline Phosphatase Pathophysiology with Emphasis on the Seldom-Discussed Role of Defective Elimination in Unexplained Elevations of Serum ALP – A Case Report and Literature Review. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 15, 41–49. <https://doi.org/10.2147/CEG.S345531>
83. Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/321213>
84. Li, D. D., Xu, T., Cheng, X. Q., Wu, W., Ye, Y. C., Guo, X. Z., Cheng, Q., Liu, Q., Liu, L., Zhu, G. J., Wu, J., & Qiu, L. (2018). Serum Gamma-Glutamyltransferase Levels are

- Associated with Cardiovascular Risk Factors in China: A Nationwide Population-Based Study. *Scientific Reports*, 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34913-7>
85. Li, Q., Han, Y., Hu, H., & Zhuge, Y. (2022). Gamma-glutamyl transferase to high-density lipoprotein cholesterol ratio has a non-linear association with non-alcoholic fatty liver disease: A secondary prospective cohort study in non-obese Chinese adults. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.995749>
86. Li, X., & Wang, H. (2020). Multiple organs involved in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell & Bioscience*, 10(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00507-y>
87. Macpherson, I., Nobes, J. H., Dow, E., Furrie, E., Miller, M. H., Robinson, E. M., & Dillon, J. F. (2020). Intelligent Liver Function Testing: Working Smarter to Improve Patient Outcomes in Liver Disease. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 5(5), 1090–1100. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa109>
88. Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Sumaya-Martínez, M. T., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M., Morales-González, Á., García-Luna Y González-Rubio, M., Aguilar-Faisal, J. L., & Morales-González, J. A. (2014). Review of natural products with hepatoprotective effects. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 20, Issue 40, pp. 14787–14804). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14787>
89. Mantovani, A., & Dalbeni, A. (2021). Treatments for nafld: State of art. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 5, pp. 1–27). <https://doi.org/10.3390/ijms22052350>
90. Margret Paar, Vera H. Fengler, Daniel J. Rosenberg, Angelika Krebs, Rudolf E. Stauber, Karl Oettl & Michal Hammel. (2021). Albumin in patients with liver disease shows an altered conformation. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02269-w>
91. Martin, A., Lang, S., Goeser, T., Demir, M., Steffen, H. M., & Kasper, P. (2022). Management of Dyslipidemia in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In *Current Atherosclerosis Reports* (Vol. 24, Issue 7, pp. 533–546). <https://doi.org/10.1007/s11883-022-010284>
92. Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., Federico, A., & Persico, M. (2018). Role of oxidative stress in pathophysiology of non-alcoholic fatty liver disease. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2018). <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>

93. Mazza, A., Fruci, B., Garinis, G. A., Giuliano, S., Malaguarnera, R., & Belfiore, A. (2012). The role of metformin in the management of NAFLD. In *Experimental Diabetes Research* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/716404>
94. Ma, X., Zheng, X., Liu, S., Zhuang, L., Wang, M., Wang, Y., Xin, Y., & Xuan, S. (2022). Relationship of circulating total bilirubin, UDP-glucuronosyltransferases 1A1 and the development of non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *BMC Gastroenterology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-021-02088-7>
95. Ma, Y., Hu, L., Tang, J., Guo, W., Feng, Y., Liu, Y., & Tang, F. (2023). Three-Dimensional Cell Co-Culture Liver Models and Their Applications in Pharmaceutical Research. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 24, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076248>
96. Ma, Y., Lee, G., Heo, S. Y., & Roh, Y. S. (2022). Oxidative stress is a key modulator in the development of nonalcoholic fatty liver disease. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/antiox11010091>
97. Mirzaei, E., Sabetian, G., Masjedi, M., Heidari, R., Mirjalili, M., Dehghanian, A., & Vazin, A. (2021). The effect of silymarin on liver enzymes and antioxidant status in trauma patients in the intensive care unit: A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial. *Clinical and Experimental Hepatology*, 7(2), 149–155. <https://doi.org/10.5114/ceh.2021.107067>
98. Mitra, R. (2018). Silymarin, A Promising Nature’s Remedy for Liver Diseases. *Journal of Complementary Medicine & Alternative Healthcare*, 7(1). <https://doi.org/10.19080/jcmah.2018.07.555704>
99. Mostafa, R. E., El-Marasy, S. A., Abdel Jaleel, G. A., & Bakeer, R. M. (2020). Protective effect of royal jelly against diclofenac-induced hepato-renal damage and gastrointestinal ulcerations in rats. *Heliyon*, 6(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03330>
100. Müller, F. A., & Sturla, S. J. (2019). Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Toxicology*, 16, 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.03.001>
101. Nagashimada, M., & Ota, T. (2019). Role of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease. (Vol. 71, Issue 4, pp. 516–522). <https://doi.org/10.1002/iub.1991>
102. Paar, M., Fengler, V. H., Rosenberg, D. J., Krebs, A., Stauber, R. E., Oettl, K., & Hammel, M. (2021).
103. Nazer, R. I., Abalhassan, M. F., & Alburikan, K. A. (2018). Liver enzyme trends in patients taking uninterrupted metformin before and after coronary surgery.

- Cardiovascular Diagnosis and Therapy, 8(4), 469–479.
<https://doi.org/10.21037/cdt.2018.05.04>
104. Noto, H., Goto, A., Tsujimoto, T., & Noda, M. (2012). Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: A systematic review and meta-analysis, 7(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033411>
105. Oni, E. T., Figueredo, V., Aneni, E., Veladar, E., McEvoy, J. W., Blaha, M. J., Blumenthal, R. S., Conceicao, R. D., Carvalho, J. A. M., Santos, R. D., & Nasir, K. (2020). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Modifies Serum Gamma-Glutamyl Transferase in Cigarette Smokers. *Journal of Clinical Medicine Research*, 12(8), 472–482.
<https://doi.org/10.14740/jocmr3932>
106. Ouchi, R., Togo, S., Kimura, M., Shinozawa, T., Koido, M., Koike, H., Thompson, W., Karns, R. A., Mayhew, C. N., McGrath, P. S., McCauley, H. A., Zhang, R. R., Lewis, K., Hakozaki, S., Ferguson, A., Saiki, N., Yoneyama, Y., Takeuchi, I., Mabuchi, Y., Takebe, T. (2019). Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metabolism*, 30(2).
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.007>
107. Ozdogan, E., & Arıkan, C. (2022). Liver fibrosis in children: a comprehensive review of mechanisms, diagnosis, and therapy. *Clin Exp Pediatr*, 66(3), 110–124.
<https://doi.org/10.3345/cep.2022.00367>
108. Owumi, S. E., & Dim, U. J. (2019). Biochemical alterations in diclofenac-treated rats: Effect of selenium on oxidative stress, inflammation, and hematological changes. *Toxicology Research and Application*, 3. <https://doi.org/10.1177/2397847319874359>
109. Paar, M., Fengler, V. H., Rosenberg, D. J., Krebs, A., Stauber, R. E., Oettl, K., & Hammel, M. (2021). Albumin in patients with liver disease shows an altered conformation. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02269-w>
110. Palma, E., Doornebal, E. J., & Chokshi, S. (2019). Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. In *Hepatology International* (Vol. 13, Issue 1, pp. 51–57). <https://doi.org/10.1007/s12072-018-9913-7>
111. Park, W. Y., Kim, S. H., Kim, Y. O., Jin, D. C., Song, H. C., Choi, E. J., Kim, Y. L., Kim, Y. S., Kang, S. W., Kim, N. H., Yang, C. W., Kim, Y. K., & Fourtounas, C. (2015). Serum gamma-glutamyltransferase levels predict mortality in patients with peritoneal dialysis. *Medicine (United States)*, 94(31).
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001249>

112. Panwar, A., Das, P., & Tan, L. P. (2021). 3d hepatic organoid-based advancements in liver tissue engineering. In *Bioengineering* (Vol. 8, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110185>
113. Parthasarathy, G., Revelo, X., & Malhi, H. (2020). Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. In *Hepatology Communications* (Vol. 4, Issue 4, pp. 478–492). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/hep4.1479>
114. Paternostro, R., & Trauner, M. (2022). Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease. In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 292, Issue 2, pp. 190–204). <https://doi.org/10.1111/joim.13531>
115. Pelechá, M., Villanueva-Bádenas, E., Timor-López, E., Donato, M. T., & Tolosa, L. (2022). Cell models and omics techniques for the study of nonalcoholic fatty liver disease: Focusing on stem cell-derived cell models. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/antiox11010086>
116. Perumpail, B., Li, A., John, N., Sallam, S., Shah, N., Kwong, W., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2018). The Role of Vitamin E in the Treatment of NAFLD. *Diseases*, 6(4), 86. <https://doi.org/10.3390/diseases6040086>
117. Pilipenko, V., Narbute, K., Pupure, J., Langrate, I. K., Muceniece, R., & Kluša, V. (2020). Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer’s disease. *European Journal of Pharmacology*, 881. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173290>
118. Pohanka, M., Hrabínova, M., Kuca, K., & Simonato, J. P. (2011). Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman’s method. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2631–2640. <https://doi.org/10.3390/ijms12042631>
119. Pouwels, S., Sakran, N., Graham, Y., Leal, A., Pintar, T., Yang, W., Kassir, R., Singhal, R., Mahawar, K., & Ramnarain, D. (2022). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. In *BMC Endocrine Disorders* (Vol. 22, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12902-022-00980-1>
120. Rader, B. A. (2017). Alkaline Phosphatase, an Unconventional Immune Protein. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00897>
121. Ramboer, E., De Craene, B., De Kock, J., Vanhaecke, T., Berx, G., Rogiers, V., & Vinken, M. (2014). Strategies for immortalization of primary hepatocytes. In *Journal of Hepatology* (Vol. 61, Issue 4, pp. 925–943). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.046>

122. Ramboer, E., Vanhaecke, T., Rogiers, V., & Vinken, M. (2015). Immortalized human hepatic cell lines for in vitro testing and research purposes. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (pp. 53–76). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_4
123. Ray, C. S., Singh, B., Jena, I., Behera, S., & Ray, S. (2017). Low alkaline phosphatase (ALP) in adult population an indicator of zinc (zn) and magnesium (mg) deficiency. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 5(3), 347–352. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.3.20>
124. Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L. I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., Lonardo, A., Carulli, N., & Loria, P. (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 24(5), 830–840. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x>
125. Robinson, K. E., & Shah, V. H. (2020). Pathogenesis and pathways: Nonalcoholic fatty liver disease & alcoholic liver disease. In *Translational Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 5). <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.12.05>
126. Rohani, P., Imanzadeh, F., Sayyari, A., Kazemi Aghdam, M., & Shiari, R. (2020). Persistent elevation of aspartate aminotransferase in a child after incomplete Kawasaki disease: a case report and literature review. *BMC Pediatrics*, 20(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-1975-8>
127. Rong, L., Zou, J., Ran, W., Qi, X., Chen, Y., Cui, H., & Guo, J. (2023). Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1087260>
128. Saeedi Saravi, S. S., Hasanvand, A., Shahkarami, K., & Dehpour, A. R. (2016). The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 2830–2837. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1185633>
129. Salamone, F., Galvano, F., Cappello, F., Mangiameli, A., Barbagallo, I., & Li Volti, G. (2012). Silibinin modulates lipid homeostasis and inhibits nuclear factor kappa B activation in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Translational Research*, 159(6), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.12.003>
130. Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., & Robuck, P. R. (2010). Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *New*

England Journal of Medicine, 362(18), 1675–1685.

<https://doi.org/10.1056/nejmoa0907929>

131. Selvaraj, S., Oh, J. H., Yoon, S., & Borlak, J. (2023). Diclofenac Disrupts the Circadian Clock and through Complex Cross-Talks Aggravates Immune-Mediated Liver Injury—A Repeated Dose Study in Minipigs for 28 Days. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021445>
132. Seto, W. K., & Susan Mandell, M. (2021). Chronic liver disease: Global perspectives and future challenges to delivering quality health care. (Vol. 16, Issue 1 January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243607>
133. Shen, H., Lu, J., Shi, T.-T., Cheng, C., Liu, J.-Y., Feng, J.-P., & Yang, J.-K. (2018). Correlation between normal range of serum alanine aminotransferase level and metabolic syndrome: A community-based study. *Medicine*, 97(41). DOI: 10.1097/MD.00000000000012767
134. Shu, X., Zheng, Y., Chen, Z., Guo, Q., Wang, Y., Ji, R., & Zhou, Y. (2022). Association between bilirubin and nonalcoholic fatty liver disease in the non-obese Chinese population: a cross-sectional study. *Annals of Translational Medicine*, 10(9), 522–522. <https://doi.org/10.21037/atm-22-1187>
135. Smith, G. S., Walter, G. L., & Walker, R. M. (2013). Chapter 18 - Clinical Pathology in Non-Clinical Toxicology Testing. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig, Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition) (pp. 565–594). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00018-2>
136. Soleimanpour, M., Imani, F., Safari, S., Sanaie, S., Soleimanpour, H., Ameli, H., & Alavian, S. M. (2016). The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the treatment of patients with hepatic disease: A review article. In *Anesthesiology and Pain Medicine* (Vol. 6, Issue 4). <https://doi.org/10.5812/aapm.37822>
137. Soret, P.-A., Magusto, J., Housset, C., & Gautheron, J. (2021). Clinical Medicine In Vitro and In Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Appraisal. *J. Clin. Med*, 10, 36. <https://doi.org/10.3390/jcm>
138. Steinebrunner, N., Mogler, C., Vittas, S., Hoyler, B., Sandig, C., Stremmel, W., & Eisenbach, C. (2014). Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. In *BMC Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-148>
139. Stellavato, A., Pirozzi, A. V. A., De Novellis, F., Scognamiglio, I., Vassallo, V., Giori, A. M., De Rosa, M., & Schiraldi, C. (2018). In vitro assessment of nutraceutical

- compounds and novel nutraceutical formulations in a liver-steatosis-based model. *Lipids in Health and Disease*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0663-2>
140. Stephen Robert, J. M., Peddha, M. S., & Srivastava, A. K. (2021). Effect of Silymarin and Quercetin in a Miniaturized Scaffold in Wistar Rats against Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *ACS Omega*, 6(32). <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00555>
141. Sun, L., Wang, Q., Liu, M., Xu, G., Yin, H., Wang, D., Xie, F., Jin, B., Jin, Y., Yang, H., Zhou, J., & Mao, Y. (2020). Albumin binding function is a novel biomarker for early liver damage and disease progression in non-alcoholic fatty liver disease. *Endocrine*, 69(2), 294–302. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02319-z>
142. Sun, L., Yin, H., Liu, M., Xu, G., Zhou, X., Ge, P., Yang, H., & Mao, Y. (2019). Impaired albumin function: a novel potential indicator for liver function damage? In *Annals of Medicine* (Vol. 51, Issues 7–8, pp. 333–344). <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1693056>
143. Suurmond, C.-A. E., Lasli, S., van den Dolder, F. W., Ung, A., Kim, H.-J., Bandaru, P., Lee, K., Cho, H.-J., Ahadian, S., Ashammakhi, N., Dokmeci, M. R., Lee, J., & Khademhosseini, A. (2019). In Vitro Human Liver Model of Nonalcoholic Steatohepatitis by Coculturing Hepatocytes, Endothelial Cells, and Kupffer Cells. *Advanced Healthcare Materials*, 8(24). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.201901379>
144. Tighe, S. P., Akhtar, D., Iqbal, U., & Ahmed, A. (2020). Chronic liver disease and silymarin: A biochemical and clinical review. In *Journal of Clinical and Translational Hepatology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 454–458). <https://doi.org/10.14218/JCTH.2020.00012>
145. Tsim, K., & Soreq, H. (2013). Acetylcholinesterase: Old questions and new developments. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fnmo.2012.00101>
146. Visaria, A., Pai, S., Fayngersh, A., & Kothari, N. (2020). Association between alanine aminotransferase within the normal range and all-cause and cause-specific mortality: A nationwide cohort study, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242431>
147. Zhang, B., Zhang, C., Zhang, X., Li, N., Dong, Z., Sun, G., & Sun, X. (2020). Atorvastatin promotes AMPK signaling to protect against high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver in golden hamsters. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8465>

148. Zhang, C., Lu, Y., Song, Y., Chen, L., Hu, J., Meng, Y., Chen, X., Li, S., Zheng, G., & Qiu, Z. (2022). Celecoxib attenuates hepatosteatosis by impairing de novo lipogenesis via Akt-dependent lipogenic pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(14), 3995–4006. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17435>
149. Zhang, J., Zhang, L., Sun, X., Yang, Y., Kong, L., Lu, C., Lv, G., Wang, T., Wang, H., & Fu, F. (2016). Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease treatment ameliorate acetaminophen-induced liver injury in mice via central cholinergic system regulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 359(2), 374–382. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.233841>
150. Zhang, Y., Wang, H., & Xiao, H. (2021). Metformin actions on the liver: Protection mechanisms emerging in hepatocytes and immune cells against NASH-related HCC. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/ijms22095016>
151. Zhou, L., Pang, X., Jiang, J., Zhong, D., & Chen, X. (2017). Nimesulide and 4'-Hydroxynimesulide as Bile Acid Transporters Inhibitors Are Contributory Factors for Drug-Induced Cholestasis. *Drug Metabolism and Disposition*, 45(5), 441. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.074104>
152. Zhu, B., Sun, D., Yang, L., Sun, Z., Feng, Y., & Deng, C. (2020). The effects of neostigmine on postoperative cognitive function and inflammatory factors in elderly patients-a randomized trial, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12877-020-01793-4>
153. Zhu, G., Chen, L., Liu, S., She, L., Ding, Y., Yang, C., & Zhu, F. (2022). Celecoxib-mediated attenuation of non-alcoholic steatohepatitis is potentially relevant to redistributing the expression of adiponectin receptors in rats, 8(7). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09872>
154. Zhu, X., Yan, H., Xia, M., Chang, X., Xu, X., Wang, L., Sun, X., Lu, Y., Bian, H., Li, X., & Gao, X. (2018). Metformin attenuates triglyceride accumulation in HepG2 cells through decreasing stearyl-coenzyme A desaturase 1 expression. *Lipids in Health and Disease*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0762-0>
155. Wang, H. H., Garruti, G., Liu, M., Portincasa, P., & Wang, D. Q.-H. (2017). Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. *Annals of Hepatology*, 16, S27–S42. <https://doi.org/https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5495>
156. Wang, J., He, W., Tsai, P.-J., Chen, P.-H., Ye, M., Guo, J., & Su, Z. (2020). Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic

- fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01210-0>
157. Wang, K., Shang, F., Chen, D., Cao, T., Wang, X., Jiao, J., He, S., & Liang, X. (2021). Protein liposomes-mediated targeted acetylcholinesterase gene delivery for effective liver cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00777-9>
158. Wang, L., Huang, Q. H., Li, Y. X., Huang, Y. F., Xie, J. H., Xu, L. Q., Dou, Y. X., Su, Z. R., Zeng, H. F., & Chen, J. N. (2018). Protective effects of Silymarin on triptolide-induced acute hepatotoxicity in rats. *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 789–800. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7958>
159. Wong, T., Wong, R. J., & Gish, R. G. (2019). Diagnostic and Treatment Implications of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. In *Gastroenterology & Hepatology* (Vol. 15, Issue 2).
160. Wu, F., Wu, D., Ren, Y., Huang, Y., Feng, B., Zhao, N., Zhang, T., Chen, X., Chen, S., & Xu, A. (2019). Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells. *Journal of Hepatology*, 70(6), 1145–1158. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.12.028>
161. Xing, M., Gao, M., Li, J., Han, P., Mei, L., & Zhao, L. (2022). Characteristics of peripheral blood Gamma-glutamyl transferase in different liver diseases. *Medicine (United States)*, 101(1). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028443>
162. Xu, Q. (2021). Human Three-Dimensional Hepatic Models: Cell Type Variety and Corresponding Applications. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.730008>
163. Yokota, S. I., Nakamura, K., Ando, M., Kamei, H., Hakuno, F., Takahashi, S. I., & Shibata, S. (2014). Acetylcholinesterase (AChE) inhibition aggravates fasting-induced triglyceride accumulation in the mouse liver. *FEBS Open Bio*, 4, 905–914. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.10.009>
164. Yu, J., Marsh, S., Hu, J., Feng, W., & Wu, C. (2016). The Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. In *Gastroenterology Research and Practice* (Vol. 2016). <https://doi.org/10.1155/2016/2862173>

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs

Dažādu vielu efekti uz aknu šūnu
līnijas HepG2 enzīmu aktivitāti

izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors/e: Viktorija Boldīneva Bof 22.05.2023
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai
Vadītājs/a: prof. Rūta Luernieca dr. habil. biol. Bnen 22.05.23
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents/e: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Jūta Bārtule _____
(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala
pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2023., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____
(paraksts)