Utjecaj mikrobiote miša na jetreni metabolizam N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamina

Sušak, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:763549

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Biološki odsjek

Lana Sušak

UTJECAJ MIKROBIOTE MIŠA NA JETRENI METABOLIZAM N-BUTIL-N-(4-HIDROKSIBUTIL)-NITROZAMINA

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Biološki odsjek

Lana Sušak

UTJECAJ MIKROBIOTE MIŠA NA JETRENI METABOLIZAM N-BUTIL-N-(4-HIDROKSIBUTIL)-NITROZAMINA

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj je rad izrađen pod vodstvom prof. dr. sc. Janoša Terzića, a u suradnji s dipl. ing. Blankom Roje u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ MIKROBIOTE MIŠA NA JETRENI METABOLIZAM N-BUTIL-N-(4-HIDROKSIBUTIL)-NITROZAMINA

Lana Sušak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rak mokraćnog mjehura najčešća je zloćudna bolest mokraćnog sustava i deveta najčešća zloćudna bolest u svijetu. Rizični čimbenici za razvoj ove bolesti nisu dovoljno istraženi te su slabo potkrijepljeni temeljnim istraživanjima na *in vivo* i *in vitro* modelima. U ovom radu istraživan je utjecaj mikrobiote i antibiotika na metabolizam urotelnog prokarcinogena N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamina (BBN) koristeći mišji model te staničnu liniju HepG2. Utjecaj antibiotika na jetreni metabolizam ovog spoja istraživan je na staničnoj kulturi hepatocita na način da su se stanice izložile antibioticima te inkubirale s BBN-om, a metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) izmjerena je količina nastalog karcinogenog metabolita. Na mišjem modelu, istraživan je utjecaj antibiotske redukcije mikrobiote na ekspresiju gena, za koje se smatra da sudjeluju u transformaciji BBN-a u njegov karcinogeni oblik, u tkivu jetre i mokraćnog mjehura. Ekspresija gena izmjerena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze. *In vivo* pokusi pokazali su da se ekspresija četiri gena koja sudjeluju u metabolizmu BBN-a u jetri promijenila kao odgovor na redukciju mikrobiote u miševa. Iz navedenog se može zaključiti da mikrobiota, mijenjajući ekspresiju gena, utječe na metabolizam ksenobiotika. U *in vitro* pokusima utvrđeno je da antibiotici nisu imali utjecaj na sposobnost hepatocita u metaboliziranju BBN-a.

Rad sadrži: 44 stranice, 17 slika, 8 tablica, i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: mikrobiota, mikrobiom, tumor, mokraćni mjehur, BBN, BCPN, antibiotici

Voditelj: Prof. dr. sc. Janoš Terzić

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenjitelji: Doc. dr. sc. Sunčica Bosak

Prof. dr. sc. Maria Špoljar

Rad prihvaćen: 19. veljače 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

THE IMPACT OF MOUSE MICROBIOTA ON HEPATIC METABOLISM OF N-BUTYL-N-4-HYDROXYBUTYL NITROSAMINE

Lana Sušak
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bladder cancer is the most common malignant disease of the urinary tract and the ninth most common malignancy in the world. The risk factors for the development of this disease have not been sufficiently studied and are poorly supported by basic studies *in vivo* and *in vitro*. In this paper, we studied the influence of the microbiota and antibiotics on the metabolism of urothelial procarcinogen N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) using a mouse model and a HepG2 cell line. The effect of antibiotics, on the hepatic metabolism of this compound, was studied on hepatocyte cell culture by exposing the cells to antibiotics and incubating them with BBN. The amount of carcinogenic metabolite formed was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). On a mouse model, we studied the effect of antibiotic microbiota reduction on gene expression, which is thought to participate in the transformation of BBN into its carcinogenic form, in liver and bladder tissue. Gene expression was measured by a quantitative polymerase chain reaction. *In vivo* experiments showed that the expression of four genes involved in BBN metabolism in the liver changed in response to microbiota reduction in mouse tissue. From the above, it can be concluded that, by altering gene expression, the microbiota can affect the metabolism of xenobiotics. *In vitro* experiments have found that antibiotics do not affect the ability of hepatocytes to metabolize BBN.

Thesis consists of: 44 pages, 17 figures, 8 tables and 45 references. Original language: Croatian.

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: microbiota, microbiome, bladder cancer, BBN, BCPN, antibiotics

Supervisor: Dr. Janoš Terzić, Prof.

Co-supervisor: Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Sunčica Bosak
Dr. Maria Špoljar, Prof.

Thesis accepted: 19 February 2020.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

1. UVOD ... 1

1.1. Rak mokraćnog mjehura ... 2

1.1.1. Epidemiologija i javnozdravstveni značaj ... 2

1.1.2. Klasifikacija tumora mokraćnog mjehura ... 3

1.1.3. Faktori rizika ... 6

1.1.3.1 Nasljedni faktori ... 7

1.1.3.2 Izloženost karcinogenima ... 7

1.1.4. Simptomi i liječenje ... 8

1.2. Mikrobiota čovjeka ... 9

1.2.1. Urinarna mikrobiota ... 9

1.2.2. Gastrointestinalna mikrobiota ... 10

1.2.3. Utjecaj mikrobioma na biotransformaciju ksenobiotika ... 11

1.3. N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN) ... 13

1.3.1. Metabolizam BBN-a ... 13

1.4. HepG2 stanična linija ... 15

2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 17

3. MATERIJALI ... 18

3.1. Eksperimentalne životinje ... 18

3.2. Eksperimentalne stanice ... 19

4. METODE ... 22

4.1. Postupak izolacije RNA iz tkiva ... 22

4.2. Postupak izolacije RNA iz stanica ... 22

4.3. Reverzna transkripcija molekule RNA u cDNA ... 23

4.4. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (QRT-PCR) ... 24

4.4.1. Početnice za RT-PCR ... 26

4.4.2. Priprema qRT-PCR ... 27

4.4.3. Obrada podataka ... 27

4.5. Priprema uzoraka za kromatografiju ... 29

4.6. Tankoslojna kromatografija ... 29

4.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 30

4.7.1. Izrada baždarnog pravca 31

5. REZULTATI 33

6. RASPRAVA 37

7. ZAKLJUČCI 40

9. REFERENCE 41

POPIS KRATICA

BBN - N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin

BCG - engl. *Bacillus Calmette–Guérin*

BCPN - N-butil-N-(3-karboksi-propil)-nitrozamin

Ct - Granična vrijednost fluorescencije, engl. *threshold cycle*

CYP - engl. Cytochrome P-450

DMEM - engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DPG - engl. *Drug-Processing Genes*

DBN - Dibutilnitrozamin

FANFT - N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]-formamid

FBS - engl. *Fetal Bovine Serum*

GF - engl. *Germ-Free*

HPLC - Tekućinska kromatografije visoke djelotvornosti, engl. *High performance liquid chromatography*

MNU - N-metil-N-nitrozourea

Nrf2 - engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

SPF - engl. *Specific-Pathogen Free*

PCR - Lančana reakcija polimerazom, engl. *Polymerase Chain Reaction*

PXR - engl. *Pregnane X receptor*

RT-PCR - Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, engl. Real-Time *Polymerase Chain Reaction*

qPCR - Kvantitativna lančana reakcija polimerazom, engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*

TLC - Tankoslojna kromatografija, engl. *Thin layer chomatography*

TUR - Transuretralna resekcija

UBC - Rak mokraćnog mjehura, engl. *Urinary Bladder Cancer*

1. UVOD

Rak mokraćnog mjehura je najčešći tip tumora mokraćnih organa te predstavlja jedan od vodećih uzroka smrti povezanih s rakom u svijetu. Iako je karakteriziran različitim podtipovima, većinom se ističu dva: neinvazivni oblik koji je široko zastupljen i većinom se povezuje s povoljnom prognozom izlječivosti te mišićno-invazivni oblik koji je rijeđi, ali obično povezan s relativno lošom prognozom i radikalnim liječenjem (Burger i sur. 2013). Poznato je da se za liječenje raka mokraćnog mjehura izdvajaju znatna sredstava, prvenstveno zbog značajnih troškova potrebnih za cjeloživotnu kliničku skrb o pacijentima s mišićno ne-invazivnom bolešću, ali i zbog potrebe skrbi o pacijentima nakon operacije uklanjanja mjehura. Međutim, unatoč raširenosti i stalnom porastu broja oboljelih, rak mokraćnog mjehura prilično je nedovoljno istražen u usporedbi s drugim vrstama karcinoma, te još uvijek nema dovoljno znanstvene potkrijepe na *in vivo* modelima (Kobayashi i sur. 2015).

Ovo istraživanje potaknuto je nedavnim otkrićem populacije mikroba koji prebivaju u urinarnom traktu (urinarni mikrobiom). U otkrivanju i potvrdi urinarnog mikrobioma korišteno je 16S rRNA sekvenciranje (Wolfe i Brubaker 2018). Nedavne studije su pokazale da se sastav bakterija koje prebivaju u urinarnom traktu razlikuje od sastava bakterija koje naseljavaju crijeva. Zbog toga se smatra da su dosadašnji podaci o odnosu mikrobioma prema zdravlju i bolesti mokraćnog mjehura neadekvatni jer ne uključuju urinarnu mikrobiotu (Thomas-White i sur. 2018). Osim što urotelni mikrobiom može izravno utjecati na razvoj raka mokraćnog mjehura kroz urotel ili putem metabolita koji se izbacuju u mokraću, treba imati u vidu da i crijevna mikrobiota može neizravno utjecati na različite udaljene dijelove tijela, uključujući mokraćni mjehur.

1.1. Rak mokraćnog mjehura

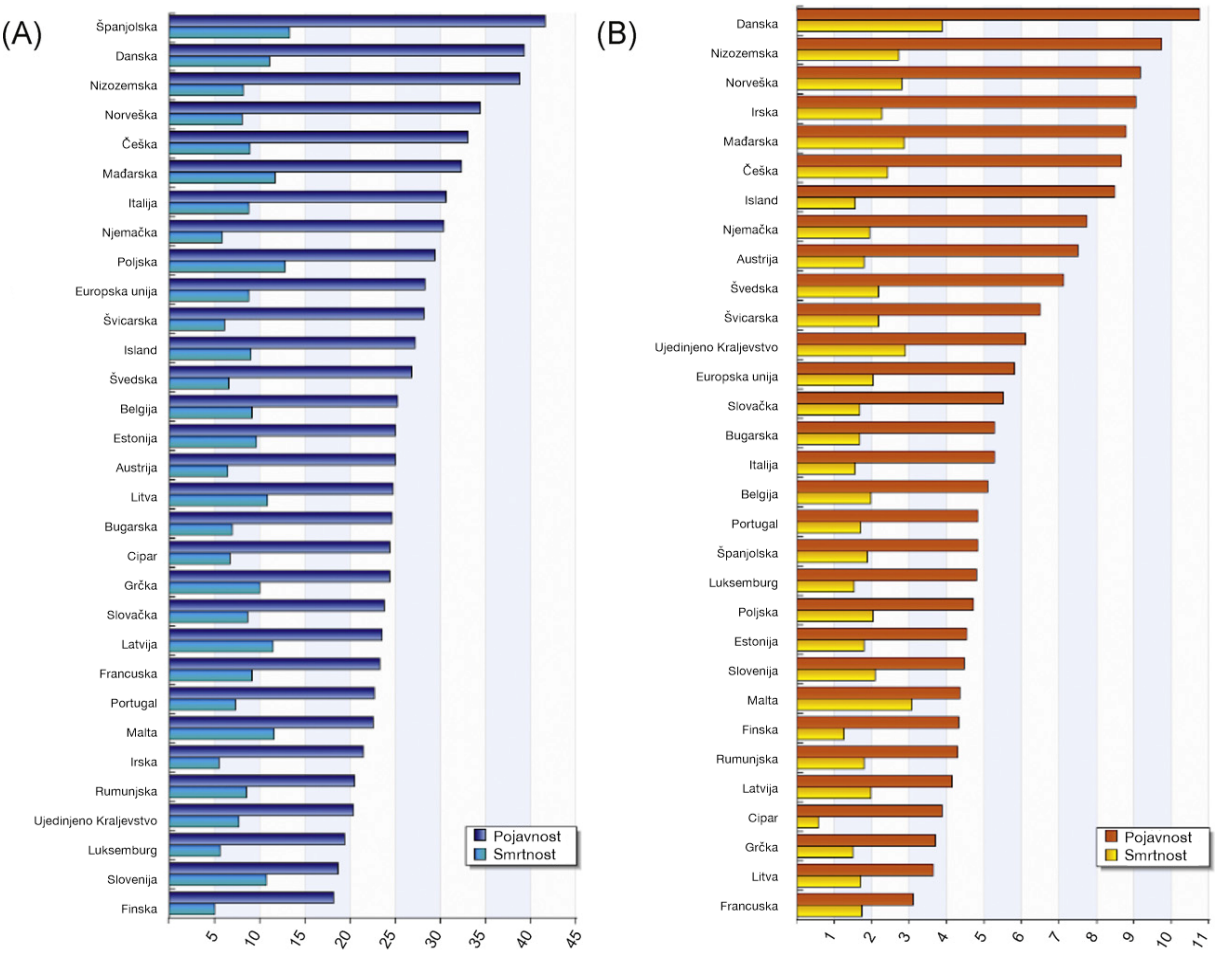
Rak mokraćnog mjehura (UBC; engl. *Urothelial bladder cancer*) česta je i kompleksna bolest, najučestalija od svih urotelnih malignoma. U otprilike 75% UBC-a riječ je o neinvazivnom obliku kod kojeg je, usprkos liječenju ciljanim terapijama, učestala pojava recidiva. U ostalih 25% slučajeva radi se o invazivnom obliku UBC-a za čije je liječenje potrebna radikalna operacija ili radioterapija (Babjuk i sur. 2011). Pacijenti oboljeli od neinvazivnog oblika UBC-a imaju znatno veću stopu preživljavanja, vjerojatno zbog niske stope progresije kakva se susrećekod istog, za razliku od pacijenata s mišićno invazivnim oblikom kod kojih je stopa preživljavanja znatno manja. Pušenje se smatra glavnim uzročnikom nastanka urotelnih malignosti te mu se pripisuje polovica svih oblika UBC-a. Od ostalih faktora rizika izdvaja se izloženost aromatskim aminima i policikličnim aromatskim ugljikovodicima (Burger i sur. 2013). Rizik od nastanka bolesti raste s godinama te se tri puta češće javlja kod muškaraca, nego kod žena. UBC se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, ali najčešće pogađa starije osobe. Obično se pojavljuje oko 70-te godine te je 20% pacijenata starije od 80 godina (Halling 2016).

1.1.1. **Epidemiologija i javnozdravstveni značaj**

Godišnje se dijagnosticira prosječno 110 500 UBC-a kod muškaraca i 70 000 kod žena. Zbog tako velike učestalosti i čestog povratka bolesti, UBC predstavlja veliki zdravstveni teret. Posljednjih godina primijećena je smanjena pojavnost UBC-a koja reflektira smanjenu izloženost uzročnicima istog (ponajviše smanjenje pušenja) (Burger i sur. 2013). Dosadašnji podaci o stopi pojavnosti i smrtnosti od UBC-a prikazani su na Slici 1., a iz tih epidemioloških podataka može se predvidjeti trend stope pojavnosti UBC-a u budućnosti (Ferlay i sur. 2008). Unatoč metodološkim pogreškama u takvim predviđanjima, osobito ako se ne uzimaju u obzir promjene u prevalenciji pušenja, trend koji se može predvidjeti u budućnosti sugerira da će UBC ostati veliko zdravstveno opterećenje (Burger i sur. 2013).

Spolna nejednakost u učestalosti pojave UBC-a većinom je uzrokovana različitom učestalošću konzumacije duhanskih proizvoda u prošlosti. Utječe li hormonska razlika na spolnu nejednakost, još uvijek ostaje predmet istraživanja. Uvidom u statističke podatke o pojavnosti i smrtnosti od UBC-a uočava se da žene koje su rodile imaju manji rizik od nastanka UBC-a od nerotkinja, najvjerojatnije zbog hormonskih promjena povezanih s trudnoćom te je primijećen smanjen rizik s povećanjem broja trudnoća. Nadalje, napravljen je eksperiment na

animalnim stanicama u kojem se pokazalo da su štakori, tretirani s androgenim hormonima, u većoj mjeri razvijali tumore mokraćnog mjehura od onih tretiranih s estrogenim hormonima. Zbog toga se smatra da neki androgeni hormoni stimuliraju (ili ne inhibiraju) onkogenezu, dok estrogeni čine obratno (Kirkali i sur. 2005). Prevalencija kod muškaraca počela je opadati drugom polovicom prošlog stoljeća jer je kod žena počela konzumacija duhanskih proizvoda. Danas je učestalost pušenja manje-više jednaka kod oba spola, pa pojavnost UBC-a opada kod muškaraca, a raste kod žena (Halling 2016).



Slika 1. Dobno standardizirani prikaz stope pojavnosti i mortaliteta od UBC-a kod 100 000 (A) muškaraca i (B) žena.

Izvor: https://www.semanticscholar.org/paper/Epidemiology-and-risk-factors-of-urothelial-bladder-Burger-Catto/1f2bbf420d6eec11d873750655def9df009fdd8f/figure/0

1.1.2. **Klasifikacija tumora mokraćnog mjehura**

Tumori mokraćnog mjehura mogu biti dobroćudni tumor (benigni tumor mjehura) i zloćudni tumor (maligni tumor, UBC). Benigni tumor mjehura je rijedak, gotovo 95% svih tumora mokraćnog mjehura su zloćudni tumori (Kanemoto i sur. 2016). U 90% slučajeva svih zloćudnih tumora mokraćnog mjehura radi se o karcinomu prijelaznog epitela, tzv. urotela (lat.

carcinoma urotheliale ili *transitiocellulare*). Tumori skvamoznih stanica, adenokarcinomi, tumori malih stanica i sarkomi su puno rjeđi histološki oblici UBC-a. Kod otprilike 70% pacijenata s urotelnim karcinomom tumori su ograničeni na sluznicu i podsluznicu te ne prodiru u mišićni sloj. Zovemo ih neinvazivnim tipom UBC-a, a karakterizira ih visoka stopa preživljenja (petogodišnja stopa preživljenja: 90%), niski stupanj zloćudnosti i dobro diferencirane papilarne lezije koje rijetko metastaziraju. Takve lezije često pokazuju aktivacijske mutacije Ras gena i receptora fibroblasnog faktora rasta broj 3 (FGFR3). Konstitutivna aktivacija tih molekula otkrivena je u 75% lezija niskog stupnja. Drugi tirozin kinazni receptori koji su povezani s neinvazivnim tipom UBC-a su ERBB3 (engl. *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3*) i ERBB4 (engl. *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4*). Ove se lezije najčešće liječe kirurškom resekcijom i/ili imunoterapijom s *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) cjepivom i intravenoznom kemoterapijom. Ostalih 30% UBC-a opada na tumore koji invadiraju u mišićni sloj i imaju puno lošiju prognozu izlječenja. Pri liječenju primarnog tumora, jedna trećina pacijenata ima zahvaćene limfne čvorove ili udaljene metastaze. Česte su strukturalne i funkcionalne mutacije tumor supresor gena kao što su p53, RB1 i PTEN, a liječenje uključuje radikalnu cistektomiju s neoadjuvantnom kemoterapijom (Halling 2016).

Određivanje stadija tumora najvažnija je odredba za davanje prognoze i liječenje tumora mokraćnog mjehura. Idealni sustav određivanja stadija bi trebao točno reflektirati razvoj primarnog tumora, odrediti opseg širenja tumora u vrijeme postavljanja dijagnoze te podijeliti pacijente u grupe s obzirom na plan liječenja. Izdanje iz 2002. godine AJCC/UICC/ TNM sustava (engl. *American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer/Union Internationale Contre le Cancer/ Tumor, lymph Nodes, Metastasis* system) koristi se za stupnjevanje tumora mokraćnog mjehura i određivanje histološkog gradusa (Tablica 1.).

Ranije se pojam „površinski rak mokraćnog mjehura“ koristio za sve tumore mokraćnog mjehura koji nisu invadirali u mišićni sloj. Taj pojam uključivao je neinvazivni papilarni urotelni karcinom (pTa), karcinom *in situ* (CIS/pTis) i tumor koji invadira u laminu propriu (pT1), a danas svaki od ovih tipova karcinoma ima vlastitu nomenklaturu.

pT0 gradus tumora je stanje u kojem nema dokaza o ostacima karcinoma kod pacijenata kod kojih je obavljena cistektomija nakon početne dijagnoze pomoću uzoraka dobivenih biopsijom ili transuretralnom resekcijom (TUR). Pojavnost pT0 stadija je otprilike 10%, a preživljenje otprilike 80% (70% kod pacijenata s limfovaskularnom invazijom, a 89% kod pacijenata bez limfovaskularne invazije).

Tablica 1. TNM klasifikacija tumora mokraćnog mjehura

Primarni tumor (T)	
Tx	Primarni tumor se ne može ocijeniti
T0	Nema dokaza primarnog tumora
Ta	Neinvazivni papilarni tumor
Tis	Karcinom *in situ*
T1	Invazija tumora u laminu propriju
T2	Invazija tumora u mišićno tkivo
T2a	Invazija tumora u površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
T2b	Invazija tumora u duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3	Invazija tumora u perivezikalno tkivo
T3a	Mikroskopska
T3b	Makroskopska (masa izvan mokraćnog mjehura)
T4	Tumor invadira u jedno od sljedećeg: prostata, maternica, vagina, stjenka zdjelice, trbušna stjenka.
T4a	Tumor invadira u prostatu, maternicu ili vaginu
T4b	Tumor invadira u zdjeličnu ili trbušnu stjenku
Regionalni limfni čvorovi (N)	
NX	Limfni čvorovi se ne mogu ocijeniti
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaze u u jednom limfnom čvoru, veličine 2 cm ili manje u najvećem promjeru
N2	Metastaze u jednom limfnom čvoru, veće od 2 cm i manje od 5 cm u najvećem promjeru, ili u više limfnih čvorova, nijedna veća od 5 cm
N3	Metastaze u limfnim čvorovima veće od 5 cm
Udaljene metastaze (M)	
MX	Udaljene metastaze se ne mogu ocijeniti
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze

Za razliku od gotovo svih organskih sustava, neinvazivni UBC podijeljen je u dvije skupine (umjesto jedne) zbog dva različita principa rasta urotelnih neoplazmi: papilarni (pTa gradus tumora) i pločasti (pTis gradus tumora).

pT1 gradus tumora je definiran invazijom u laminu propriu, ali ne i u mišićni sloj. Prepoznavanje lamine proprie nije uvijek jednostavno. Patolozi moraju biti svjesni dijagnostičkih zamki poput tangecijalnih prereza, okolnih upala koje stvaraju nepravilnosti, toplinskih ozljeda tkiva, varljive citologije nekih varijanata urotelnog karcinoma i pseudoinvazivnih gnijezda benignih proliferativnih urotelnih stanica.

pT2 gradus tumroa definiran je tumorskom invazijom u mišićni sloj. TNM klasifikacija iz 2002. godine podijelila je pT2 karcinom u dvije potkategorije: tumor koji invadira manje od jedne polovice mišićnog sloja (pT2a) i tumor koji invadira više od jedne polovice mišićnog sloja (pT2b). Patolozi smatraju da bi se ova podjela trebala eliminirati iz budućih TNM klasifikacija jer nije dovoljno precizna za podjelu pacijenata u prognostičke grupe te bi veličina tumora bila sigurniji parametar za potkategorizaciju pT2 tumora.

pT3 gradus tumora je definiran invazijom tumora u perivezikalno meko tkivo. Potkategorizacija pT3 tumora na pT3a (tumori s mikroskopskim ekstravezikalnim ekstenzijama) i na pT3b (tumor s makroskopskim ekstravezikalnim ekstenzijama) je također kontroverzna, ali ipak postoji asocijacija između pT3b gradusa i povećanog rizika od povratka raka i smrti pa se zadržala u klasifikaciji.

pT4 gradus tumora definiran je invazijom tumora u susjedni organ, uključujući maternicu, vaginu, prostatu, zdjeličnu stijenku ili trbušni zid. Izdanje iz 2002. godine AJCC/UICC/ TNM sustava, dijeli pT4 gradus na pT4a koji uključuje invaziju prostate, maternice ili vagine i pT4b koji uključuje invaziju zdjelice ili trbušne stijenke (Cheng i sur. 2009).

1.1.3. **Faktori rizika**

Karcinom se kod ljudi razvija zbog genetičkih i epigenetičkih promjena izazvanih okolišnim i nasljednim čimbenicima. U istraživanju u kojem je sudjelovalo 44.788 parova blizanaca iz sjevernoeuropskih zemljama otkrilo se da okolišni čimbenici pridonose 69%, a nasljedni 31% rizika za nastanak UBC-a (Lichtenstein i sur. 2000). Ovi podatci, međutim, nemaju statističku značajnost, vjerojatno, zbog nedovoljne mogućnosti razlikovanja nasljednih od okolišnih efekata (Kanemoto i sur. 2016). Većina malignih bolesti mokraćnog mjehura

povezuje se s izloženošću karcinogenima, a izbjegavanje istih može dovesti do značajnog smanjenja rizika od nastanka bolesti (Burger i sur. 2013). Konzumiranje duhanskih proizvoda smatra se glavnim faktorom rizika za razvoj 50% tumora mokraćnog mjehura. Postoje populacije s visokim postotkom pušača, a niskom incidencijom UBC-a (populacije Polinezijskog podrijetla), što ukazuje na razliku u metabolizmu karcinogena povezanih s pušenjem. Ipak, u većini dijelova svijeta, trend pojavnosti UBC-a u korelaciji je s trendom pušenja (Kirkali i sur. 2005).

1.1.3.1 **Nasljedni faktori**

Poznato je da genetska dispozicija uvjetuje osjetljivost pojedinca na učinak ekstrinzičnih karcinogena, ponajviše duhanskih proizvoda. Spora varijanta acetilatora N-acetiltransferaze 2 (NAT2) i *null* genotip glutation S-transferaze *mu1* (GSTM1) glavni su nasljedni faktori rizika za razvoj UBC-a. Spora acetilacija ne mora direktno dovesti do UBC-a, ali može doprinijeti negativnom učinku karcinogena, poput onih koji se nalaze u duhanskim proizvodima. Enzimi N-acetil transferaze (NAT1 i NAT2) uključeni su u bioaktivaciju i detoksifikaciju karcinogena, pa spora varijanta istih značajno povećava rizik od nastanka bolesti (Burger i sur. 2013). Poznati onkogeni uključeni u razvoj UBC-a su FGFR3, HRAS, ERBB2, CCND1, MDM2 i E2F3, dok su CDKN2A, TP53, RB1, PTEN i PTCH poznati tumor supresor geni (Kanemoto i sur. 2016).

1.1.3.2 **Izloženost karcinogenima**

Postoji direktna patofiziološka veza između duhana i UBC-a. Duhanski dim sadrži aromatske amine, kao što je β-naftalen i policikličke aromatske ugljikohidrate koji su odgovorni za stvaranje DNA adukata. Izlučuju se iz bubrega te imaju karcinogeni učinak na cijeli mokraćni sustav. Na povezanost konzumacije duhanskih proizvoda i nastanak tumora mokraćnog sustava reflektiraju se i neki drugi trendovi. Prvo, populacije pušača se mijenjaju: prestanak pušenja je češći kod pojedinaca koji općenito imaju zdrave navike, dok je za osobe koje nastavljaju pušiti čest slučaj da su izloženi i nekim drugim opasnostima za zdravlje. Nadalje, sastav duhanskih proizvoda se s godinama mijenjao, tako da je učinak duhanskih proizvoda, koji se konzumiraju danas, na UBC još uvijek nejasan. Smanjenje mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti rezultiralo je pojavom da i stariji pacijenti, koji bi možda u prošlosti umrli zbog nekih drugih razloga, dobivaju tumore. Pasivna izloženost duhanskom dimu također je jedan od faktora rizika za UBC. Taj učinak je generalno snažniji kod žena, nego kod

muškaraca, a naročito kod žena koje nikad nisu pušile. Nakon pušenja, izloženost karcinogenima, kao što su aromatski amini, policiklički ugljikohidrati i klorirani ugljikohidrati, sljedeći je najčešći faktor rizika za UBC. Otprilike 20% svih tumora mokraćnog sustava povezano je s izloženošću ovim karcinogenima, naročito u industrijskim područjima koji se bave preradom boja, lakova, metala i petrolejskih produkata (Burger i sur. 2013).

1.1.4. **Simptomi i liječenje**

UBC rano stvara simptome i zato je u oko 80% slučajeva otkriven u ranoj fazi bolesti. Glavni simptom je povremena i bezbolna pojava krvi u urinu, koja se opetovano javlja. Osnovni način liječenja površinskih tumora je TUR. TUR je endoskopska operacija koja se izvodi kroz mokraćnu cijev, bez reza na trbuhu, a za cilj je odstraniti u cijelosti sve vidljive tumore (koji u mjehuru često rastu istodobno na više mjesta – multifokalno), kao i druge promjene sluznice. Nakon resekcije tumora uvodi se kateter koji se drži od jednog do nekoliko dana.

Invazivni tumor mokraćnog mjehura je tvorba koja se proširila kroz mišićni sloj mokraćnog mjehura i susjedne ograne. Nije dovoljno odstraniti samo mjehur već se odstranjuju i drugi organi zdjelice, ovisno o spolu: kod muškaraca prostata, sjemeni mjehurići, početni dio mokraćne cijevi, okolno masno tkivo i peritoneum (potrbušnica), a kod žena maternica, jajovodi, jajnici, prednji vaginalni zid i okolne fascije. Katkad se rabi i neoadjuvantna kemoterapija (kemoterapija prije operacije) u cilju smanjenja tumora prije kirurškog zahvata. U bolesnika koji odbijaju radikalnu operaciju ili kojima opće tjelesno stanje i ostale prateće bolesti onemogućuju operativni zahvat, moguće je primijeniti zračenje (radioterapiju). Petogodišnje preživljenje nakon primarne radioterapije je 20% (Kanemoto i sur. 2016).

1.2. Mikrobiota čovjeka

U ljudskom tijelu živi oko 10^4 različitih bakterija koje čine fiziološku mikrobiotu čovjeka, uključujući bakterije, viruse, gljivice i parazite. Svi mikroorganizmi jedne zajednice, zajedno sa svojim genima i molekulama koje proizvode, čine kompleksni mikrobiom te zajednice (Mihaljević 2019). Broj mikroba koji naseljavaju ljudski organizam uvelike premašuje ukupan broj ljudskih stanica (oko 10^{13}). Nalaze se na svim dijelovima tijela izloženim vanjskom okolišu, uključujući gastrointestinalni trakt, kožu, usnu šupljinu i genitourinarni trakt. Mikrobiom se ubrzano razvija kroz rano djetinjstvo, zatim različitom brzinom u odrasloj dobi te postaje jedinstven za svakog pojedinca. Varijacije nastaju pod utjecajem i genetskih i okolišnih faktora, kao što su prehrana, geografska lokacija, izloženost toksinima, karcinogenima i hormonima (Markowski i sur. 2019). Istraživanja o mikrobiomu, potpomognuta dostupnošću visoko-propusnog DNA sekvenciranja, pokazala su da je poremećaj u mikrobiomu povezan s brojnim ljudskim bolestima. Najistaknutiji su utjecaji *Helicobacter pylori* u razvoju raka želuca i visokorizičnih vrsta humanog papiloma virusa (HPV) kod raka grlića maternice. Pomoću različitih molekularnih mehanizama može se predvidjeti kako interakcija između mikroorganizama i njihovih domaćina utječe na onkogenezu, progresiju tumora i odgovor na terapiju (Bučević Popović i sur. 2018).

1.2.1. **Urinarna mikrobiota**

Do sada se smatralo da je mokraćni mjehur sterilan, međutim nedavno otkriće urinarnog mikrobioma, populacije mikroba koji prebivaju u urinarnom traktu, od velike je važnosti za genitourinarnu fiziologiju. Urinarni mikrobiom mijenja se s godinama, ali nije poznato doprinose li te starosne promjene u urinarnoj mikrobioti povećanju rizika od raka u urogenitalnom traktu. Promjene povezane sa spolom bolje su proučene i identificirane su jasne razlike u sastavu mikrobioma između muškaraca i žena. Kod žena u velikoj mjeri prevladavaju rodovi *Lactobacillus* i *Gardnerella*, dok su *Corynebacterium*, *Staphylococcus* i *Streptococcus* najčešći rodovi kod muškaraca. Kao rezultat, može se pretpostaviti da spolna nejednakost u genitourinarnoj mikroflori može doprinijeti dobro poznatoj spolnoj nejednakosti pojavnosti raka genitourinarnog trakta kod ljudi. Još uvijek nije istraženo utječe li urinarni mikrobiom na razvoj i progresiju UBC-a ili UBC utječe na sastav i različitost mikroorganizama mokraćnog mjehura. Jedna od hipoteza je da mikrobiom mokraćnog mjehura mijenjanjem izvanstaničnog matriksa može potaknuti ili inhibirati karcinogenezu. Isto tako, kao što je dokazano da

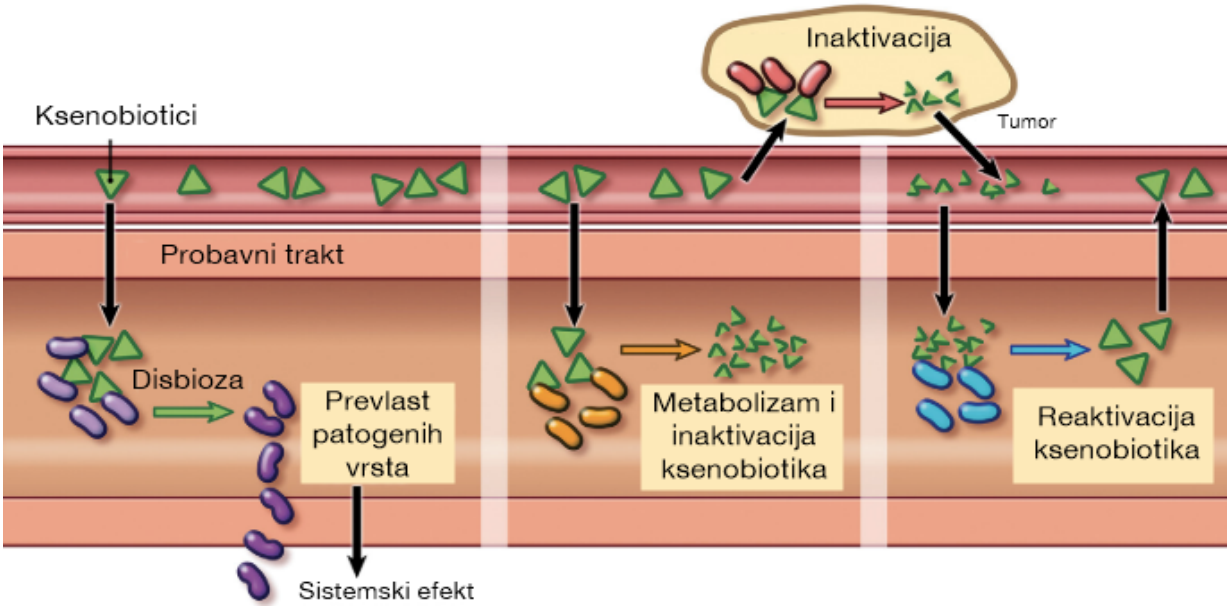
gastrointestinalni mikrobiom utječe na razvoj raka i odgovor na terapiju, očekivano je da postoji slična veza kad je u pitanju mikrobiom i UBC. Preliminarne studije identificirale su razlike u mikrobiomu mokraćnog mjehura u bolesnika s UBC-om u usporedbi sa zdravim pojedincima. Riječ je o rodovima *Streptococcus, Pseudomonas* i *Anaerococcus* koji se češće javljaju u bolesnika s UBC-om (Markowski i sur. 2019), a istraživačka grupa profesora Terzića pronašla je povećanu nazočnost bakterije *Fusobacterium nucleatum* u urinu (i tumorima) osoba s rakom mokraćnog mjehura (Bučević Popović i sur. 2018).

BCG cjepivo koristi se za liječenje neinvazivnih UBC-a već više od 40 godina te se smatra jednom od najuspješnijih imunoterapija za rak (Redelman-sidi, Glickman i Bochner 2014). Dr. William B. Coley prvi je počeo s uporabom mikrobnih proizvoda u svrhu liječenja raka. U početku je koristio cjepiva s živim bakterijama *Streptococcus pyogenes* (Coley 1991), a kasnije ih je zamijenio mješavinom bakterija *S. pyogenes* i *Serratia marcescens* (Coley 1910). 1976. godine prvi je put primjenjeno BCG cjepivo kao imunoterapija za pacijente s UBC-om (Bruce 1976). Za BCG cjepivo korištene su atenuirane bakterije soja *Bacillus*, koje se instaliraju u mokraćni mjehur na mjesto gdje je potvrđeno postojanje površinskog tumora. Ubacivanje bakterija u mjehur dovodi do aktivacije imunološkog odgovora koji, osim bakterija, prepoznaje i tumorske stanice te ih uništava (Redelman-sidi, Glickman i Bochner 2014).

1.2.2. **Gastrointestinalna mikrobiota**

Ljudska crijeva sadržavaju najveći broj komenzalnih mikroorganizama. Njihova je prisutnost potrebna za optimalnu probavu hrane, produkciju vitamina i opskrbu hranjivim tvarima (Hooper i sur. 2015). Utjecaj gastrointestinalnog mikrobioma na razvoj tumora je raznolik. Crijevne bakterije mogu izravno oštetiti DNA domaćina putem genotoksina, poput kolibaktina kojeg proizvode neki sojevi *E. coli*, ili posredno, stvaranjem reaktivnih kisikovih čestica. Neki patogeni mikroorganizmi manipuliraju signalnim putevima domaćina, primjerice izmjenom Wnt/β-katenin signalnog puta podržavaju proliferaciju tumorskih stanica (Bučević Popović i sur. 2018). Mikrobiom gastrointestinalnog trakta može izazvati kroničnu upalu koja pruža podlogu za razvoj tumora ili može izazvati imunosupresivne reakcije koje mogu poništiti imunološki odgovor domaćina. Konačno, bakterijski metabolizam može interferirati s komponentama hrane ili ksenobioticima, rezultirajući štetnim spojevim koji potiču tumorigenezu čak i na udaljenim mjestima tijela (Garrett 2017). Gastrointestinalna mikrobiota uključena u metabolizam lijekova i ksenobiotika djeluje i na inaktivaciju i reaktivaciju terapija uključenih u liječenje raka (Slika 2.). Kemoterapije mogu imati bakteriostatski efekt na

gastrointestinalnu mikrobiotu, vodeći do mikrobne disbioze i prevlasti patogenih vrsta. Prevlast patogenih vrsta dovodi do stvaranja upalnih citokina koji potpomažu rast tumora (Markowski i sur. 2019).



Slika 2. Utjecaj gastrointestinalne mikrobiote na metabolizam lijekova i ksenobiotika. Gastrointestinalna mikrobiota uključena u metabolizam lijekova i ksenobiotika djeluje na inaktivaciju i reaktivaciju terapija uključenih u liječenje raka. Kemoterapije mogu imati bakteriostatski efekt na gastrointestinalnu mikrobiotu, dovodeći do mikrobne disbioze i prevladavanja patogenih vrsta. Prevlast patogenih vrsta dovodi do stvaranja upalnih citokina koji potpomažu rast tumora.

Izvor: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0302283818310510

1.2.3. **Utjecaj mikrobioma na biotransformaciju ksenobiotika**

Crijevna mikrobiota pokazala se veoma važnom u reguliranju metabolizma domaćina i doprinosu pretilosti. Međutim, relativno je slabo poznat učinak crijevnih bakterija na ekspresiju gena koji sudjeluju u biotransformaciji ksenobiotika (DPG; engl. *Drug-Processing Genes*) (Selwyn, Cui i Klaassen 2015). Nedavna istraživanja sugeriraju da crijevna mikrobiota može poslužiti kao dodatni mehanizam za regulaciju DPG-a u jetri odraslih miševa (Björkholm i sur. 2009). Time se prvi put dokazuje da su putevi transformacije ksenobiotika kod domaćina regulirani crijevnom mikrobiotom.

DPG kodiraju enzime faze I biotransformacije, uključene u procese hidrolize, oksidacije i redukcije te faze II biotransformacije, uključene u proces konjugacije. Jetra je glavni organ uključen u metabolizam i transport lijekova, te jetreni DPG pokazuju jedinstvene razvojne obrasce (Mooij i sur. 2014). Isto tako, postoje i varijacije u sastavu i broju crijevnih mikroba kao dio razvojnog procesa (Koenig i sur. 2011). Intestinalna mikrobiota dojenčadi podvrgnuta

je brzim promjenama te je sastav i broj mikroba više-manje stalan nakon 3. godine života. Osim crijevnom mikrobiotom, DPG su regulirani i transkripcijskim faktorima, kao što su AhR (engl. *Aryl Hydrocarbon Receptor)*, CAR (engl. *Constitutive androstane receptor*), PXR (engl. *Pregnane X receptor*), PPARα (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor)* te Nrf2 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Od otprilike 900 gena koji su različito regulirani u jetri GF (engl. *Germ-free*) miševa u odnosu na konvencionalne miševe, geni uključeni u metabolizam ksenobiotika svrstavaju se među najčešće promijenjene. Ekspresija mRNA mnogih DPG-a smanjena je u jetri GF miševa, uključujući nekoliko citokrom P-450 (CYP) gena koji sudjeluju u fazi I i određene glutation-S-transferaze, koje sudjeluju u fazi II biotransformacije DPG-a (Selwyn i sur. 2015).

1.3. N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN)

Eksperimentalni tumori mokraćnog mjehura koristan su model za proučavanje karcinogeneze mokraćnog mjehura, kao i za procjenu novih terapijskih strategija. Posljedično, primjena kemijskih karcinogena jedna je od najčešće korištenih metoda za indukciju tumora mokraćnog mjehura (Vasconcelos-Nóbrega i sur. 2012). Postoji nekoliko karcinogenih kemikalija koje su povezane s razvojem tumora. Među njima su nitrozni spojevi kao što su BBN i N-metil-N-nitrozourea (MNU) te nitrofuranski spojevi kao što je N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]-formamid (FANFT). Unesu li se na točno određeni način, točno određene količine pogodne određenoj vrsti životinje, svi oni imaju 100%-tnu učinkovitost u stvaranju tumora. BBN i FANFT su indirektni karcinogeni i unose se oralno, dok MNU zahtijeva direktni unos u mjehur (Halling 2016). BBN je bistra crvenožuta tekućina koja se obično u laboratorijsku životinju unosi oralnim putem (u vodi za piće). BBN se također može primijeniti supkutano ili uvoditi izravno u mokraćni mjehur intravezikalnim ubrizgavanjem (Vasconcelos-Nóbrega i sur. 2012). Doza u rasponu od 0.01% do 0.05% dovoljna je za induciranje tumora mokraćnog mjehura laboratorijskim životinjama i najčešće se daje 2 do 3 mjeseca starim miševima. Kad se je BBN davao tek okoćenim miševima, inducirane su plućne i jetrene neoplazme, a ne urinarne lezije (Halling 2016).

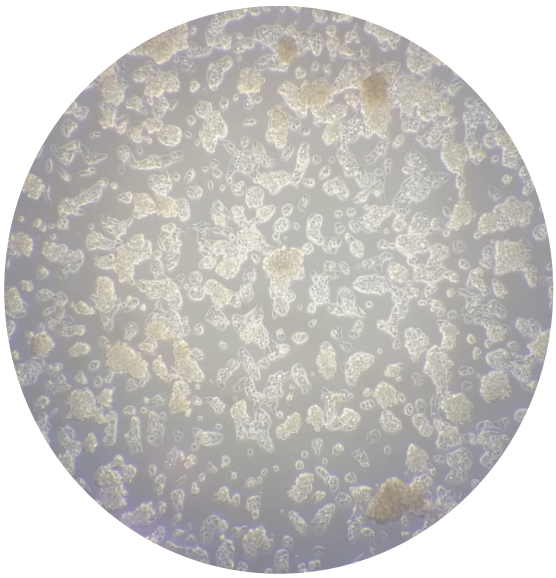
1.3.1. **Metabolizam BBN-a**

Zbog svog velikog potencijala da inducira tumore mokraćnog mjehura, BBN je najčešće korišten reagens za stvaranje kemijski induciranih *in vivo* modela UBC-a i za proučavanje karcinogeneze (Halling 2016). Uzrokuje lezije koje histološki nalikuju invazivnom karcinomu prijelaznog epitela mjehura i karcinomu skvamoznih stanica mjehura kod čovjeka (Mori 2001). BBN je karcinogen koji nastaje iz N-nitrozo spoja, dibutilnitrozamina (DBN), sastavnog metabolita dima cigarete. I DBN i BBN induciraju tumore mokraćnog mjehura, a DBN može inducirati i tumore jetre i jednjaka (Vasconcelos-Nóbrega i sur. 2012). BBN kao indirektni karcinogen, zahtijeva aktivaciju, ponajviše u jetri, ali dijelom i u mjehuru (Benfanti i sur. 1988). BBN se konvertira u BCPN nakon oksidacije alkoholne skupine u karboksilnu enzimatskom reakcijom pomoću alkohol i aldehid dehidrogenaza. BBN se također konvertira u BBN-glukuronid, uridin difosfat-glukuronoziltransferazom kataliziranom konjugacijom, ali za razliku od BCPN-a, ovaj metabolit nema kancerogena svojstva. BCPN dolazi do mokraćnog mjehura preko krvi i urina te dolazi u kontakt s urotelom gdje se kovalentno veže za stanične

makromolekule i inicira karcinogene procese. Budući da BBN uzrokuje oštećenja DNA u urotelu te inducira stvaranje UBC-a u miševa i štakora, može se svrstati u genotoksične karcinogene. U BBN-induciranim tumorima mokraćnog mjehura, najčešće detektirane mutacije bile su G-A ili C-T tranzicija i T supstitucije (Halling 2016). Oksidativni metabolit BBN-a, BCPN, igra odlučujuću ulogu u indukciji tumora mokraćnog mjehura. BCPN se kao i BBN metabolizira putem α-hidroksilacije, stvarajući reaktivne spojeve koji se vežu za DNA i oštećuju je. O6-(4-hidroksibutil) gvanin i O6-butil-gvanin su najčešće mutacije koje su detektirane kod urotelne DNA miševa tretiranih BBN-om (Mori 2001). BCPN ima veliku sklonost induciranju mutacija koje utječu na ekspresiju gena poput p53, RAS i H19 (Vasconcelos-Nóbrega i sur. 2012). Kod miševa se BBN efikasno metabolizira pomoću enzima citokrom P-450 u jetri i CYP enzima u mjehuru do aktivnih spojeva (Mori 2001).

1.4. HepG2 stanična linija

Stanična linija hepatoma često se koristi kao *in vitro* zamjena staničnoj liniji primarnih humanih hepatocita. Karakterizira je neograničen životni vijek, stabilan fenotip, dostupnost i lako rukovanje. Glavno ograničenje prilikom korištenja ove stanične linije je slabija metabolička aktivnost u usporedbi s primarnim hepatocitima. HepG2 je stanična linija koja se najčešće koristi u ispitivanjima metabolizma lijekova i hepatotoksičnosti. To su netumorske stanice s visokim stupnjem proliferacije, morfologijom koja nalikuje jetrenim stanicama te ima mnoge odlike jetrene funkcije (Slika 3.).



Slika 3. HepG2 stanična linija. Povećanje: 100X. Autor: Lana Sušak.

U proteklim desetljećima uloženi su ogromni napori da se uspostave stanične linije koje imaju funkcije jetrenih stanica. Kao rezultat toga, okarakterizirane su ljudske i mišje stanične linije koje se koriste u istraživanju jetrenih funkcija, a kao alternativa ljudskim hepatocitima. Među njima, veliki broj humanih staničnih linija hepatoma, uključujući HepG2, Hep3B, HuH7 i HepaRG, obično se koristi za ispitivanja metabolizma lijekova i hepatotoksičnosti. Iako su metaboličke funkcije stanica hepatoma ograničene u usporedbi s primarnim hepatocitima, ipak nude razne prednosti za *in vitro* istraživanja, poput velike dostupnosti, lakog rukovanja, gotovo neograničenog životnog vijeka i stabilnog fenotipa koji ne ovisi o karakteristikama donora. HepG2 je najčešće korištena stanična linija ljudskog hepatoma u farmakotoksikološkim istraživanjima. Ova stanična linija izvedena je iz biopsije jetre 15-godišnjeg bijelca kavkaskog podrijetla s diferenciranim hepatocelularnim karcinomom. Stanice HepG2 su netumorigene i visoko proliferativne stanice koje se uspješno uzgajaju u staničnoj kulturi. Funkcionalne

karakteristike HepG2 stanica detaljno su ispitane. Izražavaju mnoge diferencirane funkcije jetre, poput sinteze i izlučivanja plazma proteina, metabolizma kolesterola i triglicerida, metabolizma i transporta lipoproteina, sinteze žučne kiseline, sinteze glikogena i/ili signalizacije inzulina (Min i sur. 2014).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Temeljni cilj ovog istraživanja je utvrditi utječe li mikrobiom i utječu li antibiotici na pretvorbu prokarcinogena, BBN-a, u njegov karcinogeni oblik, BCPN.

Prvi cilj je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR), ispitati koji su geni pod utjecajem promjene mikrobioma. Geni koji će se koristiti, odabrani su temeljem rezultata prethodnih eksperimenata, a uključuju 3 mišja citokrom P-450 gena: Cyp2a4, Cyp2c37 i Cyp3a11 te 2 aktivatora istih: Nrf2 i PXR.

Drugi cilj je metodom RT-PCR-a ispitati je li ljudski homolog mišjeg gena, CYP3A4, promijenjen u HepG2 stanicama tretiranim antibioticima u usporedbi s netretiranim stanicama.

Treći cilj je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti izmjeriti prisutnost BCPN-a u uzorcima HepG2 stanica koje su bile izložene djelovanju antibiotika te u onima koje nisu, kako bi se razdvojio utjecaj antibiotika od utjecaja mikrobioma na metabolizam BBN-a.

3. MATERIJALI

3.1. Eksperimentalne životinje

Tumorigeni učinak mikrobioma testiran je na BBN-induciranom mišjem modelu za UBC. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su miševi C57BL/6J (tzv. *black* 6) divljeg tipa nabavljeni od tvrtke Jackson Laboratory. 16 mužjaka, koji su na početku tretmana bili 6-8 tjedana stari, nasumično su raspoređeni u pokusne i kontrolne grupe. U drugom dijelu istraživanja korišteni su i GF (engl. *Germ-Free*) i SPF (engl. *Specific-Pathogen Free*) miševi, uzgojeni u Hemzoltz Centre for Infection Research (Braunschweig, Njemačka). Miševi su uzgajani u kontroliranim uvjetima gdje je temperatura bila 22°C ± 1°, a pokusi na miševima odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i od Ministarstva poljoprivrede poljoprivrede RH (broj odobrenja: 525-10/0255-15-5.).

Za potrebe eksperimenta, u kojem je ispitivan učinak mikrobioma na ekspresiju mRNA gena uključenih u proces biotransformacije BBN-a u BCPN, korištena su dva mišja modela za tumor mokraćnog mjehura, akutni i kronični, te kontrolna skupina. Miševi na akutnom tretmanu konzumirali su BBN kao 0,05%-tnu otopinu u vodi za piće kroz 2 tjedna, nakon čega su žrtvovani. U kroničnom modelu miševi su konzumirali 0.05 % BBN 12 tjedana, a potom su pili običnu vodu još 8 tjedana. Kontrolni miševi pili su običnu vodu (u daljnjem tekstu: skupina CTRL), a nekima su u nju dodani i antibiotici (u daljnjem tekstu: ABX). Unutar svakog modela, miševi su raspoređeni u dvije skupine. Prva skupina (u daljnjem tekstu: skupina B) pila je navedenu 0,05%-tnu otopinu BBN-a u vodi za piće. Drugoj skupini miševa (u daljnjem tekstu: skupina AB) u vodu za piće su se, uz BBN, dodali i antibiotici širokog spektra kako bi se reducirao mikrobiom u organizmu. Miševi koji su primali antibiotike prvo su stavljeni na predtretman samo s antibioticima u trajanju od 2 tjedna, nakon čega je krenuo tretman u kojem su primali BBN kao 0,05% otopinu i antibiotike. Korišteni antibiotici, kao i njihovi proizvođači i koncentracije, navedeni su u Tablici 2. Za dugotrajni tretman antibioticima, nakon 2 mjeseca inicijalnog tretmana, u vodu za piće dodani su novi antibiotici, čije su koncentracije također navedene u Tablici 2., kako bi se izbjegla pojava rezistentnih bakterija. Svježa otopina antibiotika pripremana je svaki tjedan, prema već uhodanom protokolu za antibiotski tretman miševa (Jauch i sur. 2013). Na kroničnom modelu testirana je ekspresija gena u jetri, a na akutnom u jetri i mokraćnom mjehuru. Također se uspoređivala ekspresija gena u jetrama GF i SPF miševa. Pomoću ovih skupina miševa cilj je bio utvrditi utječe li mikrobiom na ekspresiju BBN-metabolizirajućih enzima u ovim tkivima.

Tablica 2. Popis korištenih antibiotika, njihovi proizvođači i koncentracije u vodi za piće.

ANTIBIOTIK	PROIZVOĐAČ	KONCENTRACIJA (prva 2 mjeseca)	KONCENTRACIJA (nadopuna)
Neomicin	Sigma Aldrich	147,87 μg/ml	/
Vankomicin	Pharma swiss	50,00 μg/ml	/
Metronidazol	Sigma Aldrich	100,00 μg/ml	/
Streptomicin	Sigma Aldrich	62,65 μg/ml	1,00 mg/ml
Penicilin	Sigma Aldrich	72,15 U/ml	/
Gentamicin	Krka	/	170,00 μg/ml
Ciprofloksacin	MedChemExpress	/	125,00 μg/ml
Bacitracin	Sigma Aldrich	/	1,00 mg/ml

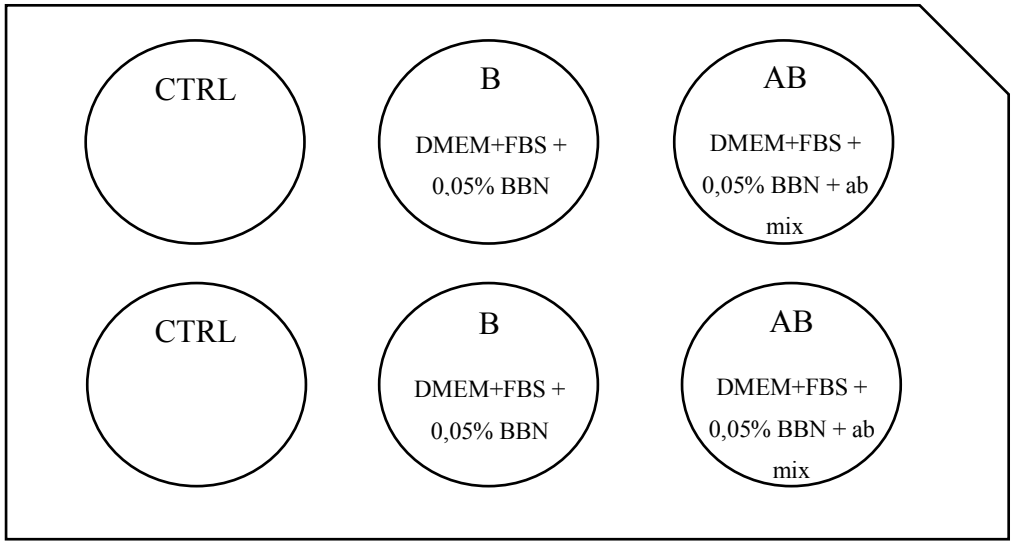
SPF miševi su uobičajeni laboratorijski miševi koji imaju normalan mikrobiom. Za postizanje SPF statusa moraju biti testirani na prisutnost specifičnih patogena koji mogu utjecati na njihov zdravstveni status. Lista mikrooganizama koji su isključeni iz kolonija SPF miševa dostupna je na stranici Charles River Laboratorija (Charles River Laboratories, Inc, Wilmington, Massachusetts, SAD). GF miševi uzgajaju se u izolatorima koji u potpunosti sprječavaju izlaganje miševa mikroorganizmima s namjerom da se njihov mikrobiološki status održi negativnim na sve detektabilne bakterije, viruse i eukariotske mikroorganizme. GF miševima daje se isključivo sterilna hrana i piće te u njihove inkubatore dopire samo sterilan zrak (Yi i Li 2012).

3.2. Eksperimentalne stanice

Za oba eksperimenta korištena je HepG2 stanična linija, s time da se za mjerenje ekspresije mRNA gena uključenih u proces biotransformacije BBN-a u BCPN koristile same stanice, a za mjerenje koncentracije BCPN-a medij bez stanica.

Stanice su nasađene u 10 ml DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) medija (Sigma-Aldrich) uz dodatak 10% FBS-a (engl. *Fetal Bovine Serum*) (PAA Laboratories Inc),

100 U/ml penicilina (GIBCO) te 100 µg/L streptomicina (GIBCO). Nekoliko su dana ostavljene u inkubatoru na 37°C kako bi se namnožile i dosegle otprilike 90%-tnu konfluentnost. Zbog presađivanja u *6-well plate,* stanicama je odsisan medij, isprane su s 1 ml PBS-a te im je dodan 1 ml Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich). Da bi se zaustavilo djelovanje tripsina, dodano je 1 ml DMEM-a s FBS-om. Stanice su resuspendirane i nasađene u *6-well plate* u 2 ml medija istog sastava. Nakon 48 sati, kada bi stanice dosegle 70%-tnu konfluentnost, tretirane su prema shemi na Slici 4.



Slika 4. Shema tretmana HepG2 stanica

Antibiotska smjesa pripremljena je u 50 µl DMEM-a s FBS-om, a sastav je prikazan u Tablici 3. (Jauch i sur. 2013).

Tablica 3. Sastav antibiotske smjese.

ANTIBIOTIK	PROIZVOĐAČ	KONCENTRACIJA (µg/ml)	ODVAGA (mg)
Vankomicin	Pharma swiss	50,00	2,5
Penicilin	Sigma Aldrich	72,15	3,61
Neomicin	Sigma Aldrich	147,87	12,33
Metrondiazol	Sigma Aldrich	100,00	5,00
Streptomicin	Sigma Aldrich	62,65	3,14

24 sata nakon tretmana, medij je prebačen u tubice, a stanice isprane s 1 ml PBS-a. Dodano im je 200 µl tripsina te su resuspendirane s 500 µl DMEM-a s FBS-om. Ukupni volumen od 800 µl prebačen je u *DNA/RNase free* tubicu od 1,5 ml te centrifugiran 3 minute na 300g pri temperaturi od 4°C. Supernatant se uklonio, a talog isprao s 800 µl PBS-a te je ponovno centrifugiran na isti način. Konačno je i PBS aspiriran čime je ostao stanični pelet, spreman za izolaciju RNA.

4. METODE

***Eksperiment**: Mjerenje ekspresije mRNA gena za koje se smatra da su uključeni u proces biotransformacije BBN-a u BCPN*

4.1. Postupak izolacije RNA iz tkiva

Uzorci tkiva čuvali su se u tekućem dušiku sve do izolacije RNA. Odmah po vađenju iz tekućeg dušika, tkiva su homogenizirana uz pomoć naprave za homogenizaciju tkiva. Prvotno su prebačena u 500 µl Qiazol Lysis reagensa (Qiagen, Hilden, Njemačka), a potom homogenizirana 20 sekundi koristeći tkivni homogenizator Precellys® Minilys Personal Tissue Homogenizer (Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA), uz 1 minutu hlađenja na ledu. Postupak se ponavljao tri puta, nakon čega su uzorci ostavljeni 5 minuta na sobnoj temperaturi. Svi postupci provedeni su u tzv. *DNA/RNase free* tubicama koje su deklarirano čiste od DNA, RNA te enzima DNAza i RNAza. Nakon inkubacije od 5 minuta, uzorcima je dodano 0.2 ml kloroforma, nakon čega su promiješani na vorteksu 15 sekundi i ostavljeni 3 minute na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom centrifugirani 15 minuta na 12000g, pri temperaturi od 4°C, a rezultat centrifugiranja je stvaranje tri faze iz smjese: organski sloj s proteinima na dnu tubice, DNA u prstenu koji se nalazi između dvije faze te RNA u gornjem, vodenom sloju. Gornja je faza, u kojoj se nalazi RNA, pipetiranjem prebačena u novu tubicu te joj je dodano 250 µl izopropanola. Nakon miješanja na vorteksu, uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ponovljeno je centrifugiranje na 12000g, 10 minuta na temperaturi od 4°C te se pretpostavilo da se sva RNA precipitirala u talog na dnu tubice. Supernatant se uklonio, a talog resuspendirao u 500 µl 75% etanola kako bi se izvukao višak vode. Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 7500g, pri temperaturi od 4°C, supernatant je uklonjen, a RNA talog ostavljen da se osuši na zraku. U posljednjem koraku, RNA je otopljena u 20 µl vode pročišćene od DNA, RNA i RNA razgrađujućih enzima (AccuGENE, Lonza) te joj je izmjerena koncentracija na Nanodrop spektrofotometru (NanoDrop spectrophotometer, NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, USA). Uzorci su po potrebi pohranjeni na -80°C do postupka sinteze cDNA.

4.2. Postupak izolacije RNA iz stanica

Na svaki stanični pelet dodano je 200 µl Qiazol-a te se temeljito resuspendirao, dok se čitav talog ne bi otopio. Resuspendirani peleti inkubirani su 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega im je dodano 40 µl kloroforma. Nakon miješanja na vorteksu, uzorci su inkubirani

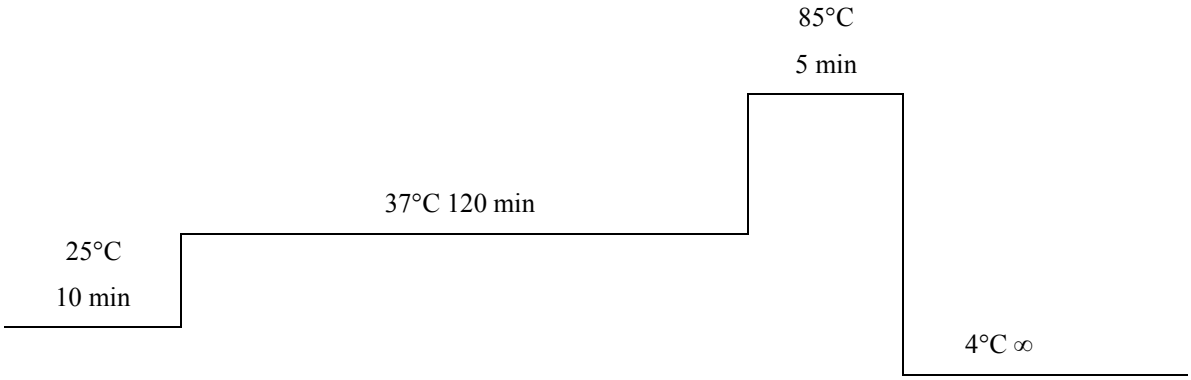
3 minute na sobnoj temperaturi. Kako bi se odvojile vodena i organska faza, stanice su centrifugirane 15 minuta na 12000g, pri temperaturi od 4°C. Gornja vodena faza prebačena je u nove DNA/RNAse free tubice, a donja ostavljena na ledu. RNA se precipitirala sa 100 µl izopropanola nakon čijeg su se dodatka stanice promiješale na vorteksu, inkubirale 10min na sobnoj temperaturi i centrifugirale na isti način kao i u prethodnom koraku. Nakon centrifugiranja, RNA je bila vidljiva kao bijeli pelet na stijenci tubice. Kako bi se uklonio višak soli, dodano je 200 µl etanola i centrifugiralo 5 minuta na 7500g, pri temperaturi od 4°C. Supernatant je dekantiran, a pelet ostavljen nekoliko minuta da se osuši na zraku. Suhi pelet resuspendiran je u 20 µl *Nuclease free* vode, a koncentracija RNA izmjerena na Nanodropu. Ukoliko su koncentracije RNA bile previsoke, uzorci bi se razrijedili s Nuclease free vodom kako bi se dobile koncentracije u rasponu od 200 do 500 ng/µl.

4.3. Reverzna transkripcija molekule RNA u cDNA

Dobivene RNA prevedene su u komplementarne DNA (cDNA) koristeći High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) čiji je sadržaj prikazan u Tablici 4. Na Slici 5. prikazan je temperaturni program PCR uređaja korišten za reakcije reverzne transkripcije.

Tablica 4. Popis komponenti i njihovih volumena za reverznu transkripciju lančanom reakcijom polimeraze.

Komponenta	**V(reakcija) / µl**
10X RT buffer	2,0
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transctiptase	1,0
Nuclease free H_2O	4,2
Ukupno	10



Slika 5. Shematski prikaz temperaturnih vrijednosti programa PCR uređaja za vrijeme reverzne transkripcije.

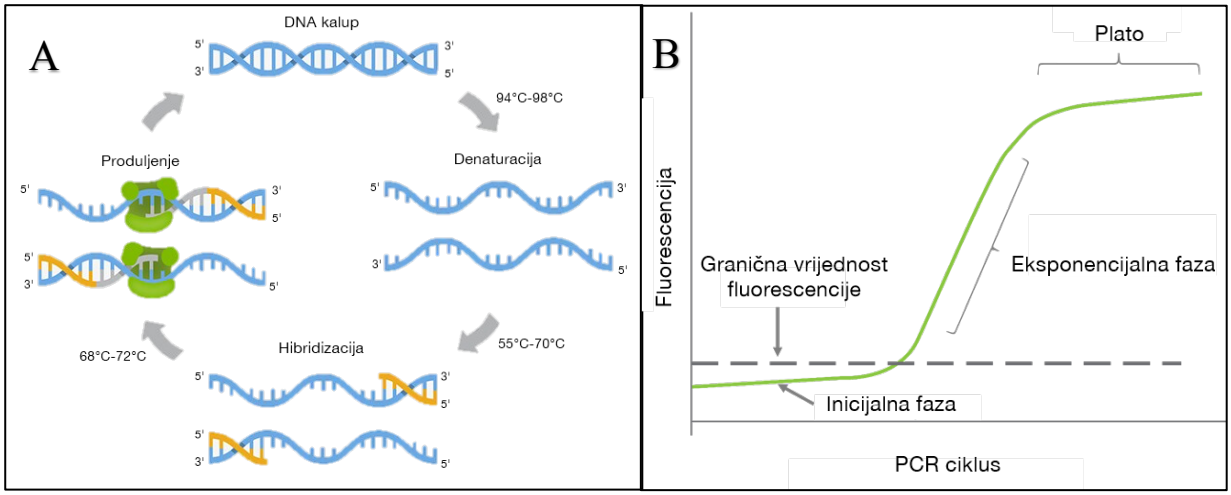
4.4. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (QRT-PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) korištena je za *in vitro* višestruko umnažanje cDNA sekvence iz male količine početnog materijala. Real time PCR je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNA. Za reakciju su potrebne vrlo male količine mRNA, što omogućava upotrebu ove metode u slučajevima kada su na raspolaganju vrlo male količine tkiva. Ciljni dio molekule DNA umnaža se pomoću kratkih oligonukleotidnih sekvenci (početnica) koje su komplementarne krajevima ulomka DNA od interesa, a potrebni su kako bi se DNA polimeraza na njih vezala i nastavila njihovo produljenje. Ova se reakcija odvija u uređaju koji automatski i precizno kontrolira promjene temperature i vrijeme trajanja određenih dijelova ciklusa (PCR termoblok).

PCR se sastoji od tri osnovna koraka. Prvi korak je denaturacija dvolančane DNA u jednolančanu uz pomoć topline, najčešće na temperaturi od 95°C. Drugi korak je hibridizacija komplementarnih početnica s jednolančanom DNA koja se odvija pri temperaturi od 55°C. Treći korak je produljenje početnica uz pomoć enzima Taq polimeraze koja ugrađujući nove komplementarne nukleotide i stvara novi lanac po modelu jednolančane DNA. Optimalna temperatura za djelovanje termostabilne TagQ polimeraze je 72°C. Novonastali produkti dalje služe kao kalup za umnažanje, što dovodi do eksponencijalnog umnažanja molekula DNA (Slika 6A.). Tri navedena koraka čine jedan ciklus PCR-a čiji je rezultat udvostručenje broja kopija DNA molekula, a koji se tijekom reakcije ponavlja 25-45 puta, pri čemu se željeni fragment DNA umnoži milijun do milijardu puta. Nakon 45 ciklusa dolazi do zasićenja (potrošnje reaktanata) te se gubi efikasnost reakcije (Wong i Medrano 2005). Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) je metoda koja omogućuje kvantifikaciju početne količine DNA u uzorku. Temelji se na

prikupljanju podataka pomoću fluorescencijskih boja tijekom qPCR-a jer su produkti obilježeni fluorescencijskom bojom. Tijekom PCR ciklusa mjeri se porast fluorescencije koji je je razmjeran količini dobivene DNA tijekom svakog ciklusa. Amplifikacija i detekcija se događaju u jednom koraku. Postoji više metoda za fluorescencijsko praćenje umnažanja DNA kod qPCR-a. Za potrebe ovog eksperimenta korištena je SYBR Green boja. Fluorescencijska boja SYBR Green emitira fluorescenciju vezanjem na dvolančanu (novonastalu) DNA. Kako tijekom PCR-a nastaje sve više dvolančanih produkata, dolazi do povećanja fluorescencije.

Rezultati qRT-PCR-a očitavaju se na amplifikacijskoj krivulji koja prikazuje porast intenziteta fluorescencije koji se laserski detektira u odnosu na broj PCR ciklusa. Amplifikacijska krivulja sigmoidnog je oblika te se na njoj mogu prepoznati 3 faze (Slika 6B.). Početni dio krivulje se naziva lag faza u kojoj fluorescencija umnažanja DNA ne prelazi baznu fluorescenciju (engl. *baseline*). U qPCR reakcijskoj smjesi nalazi se pasivna fluorescencijska boja čija je fluorescencija tijekom cijelog ciklusa PCR-a konstantna. Druga faza započinje kada fluorescencija umnažanja prijeđe fluorescenciju bazne linije te dolazi do eksponencijalnog umnažanja DNA. Treću fazu čine linearna i faza platoa kada jedan ili više reaktanata bude potrošen.



Slika 6. Prikaz RT-PCR reakcije. **A.** Koraci RT-PCR-a. Prvi korak je denaturacija jednolančane moleukule DNA. Drugi korak je hibridizacija komplementarnih početnica s jednolančanom DNA. Posljednji korak je produljenje početnica uz pomoć enzima Taq polimeraze, koja ugrađujući nove komplementarne nukleotide stvara novi lanac po modelu jednolančane DNA. Novonastali produkt služi kao kalup za sljedeći ciklus RT-PCR-a. **B.** RT-PCR amplifikacijska krivulja. Početni dio krivulje se naziva lag faza u kojoj fluorescencija umnažanja DNA ne prelazi baznu fluorescenciju. U drugoj fazi dolazi do eksponencijalnog umnažanja DNA. Treću fazu čine linearna i faza platoa kada jedan ili više reaktanata bude potrošen.

Izvor: https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html

Izvor: https://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview

qPCR prepostavlja da je količina amplikona tijekom eksponencijalne faze proporcionalna početnoj količini kalupa. Tako se na krivulji postavlja detekcijski prag (engl. *threshold*) koji, nakon što ga intenzitet fluoresciranja prijeđe, definira ciklus prijelaza granične vrijednosti fluorescencije (engl. *threshold cycle*, Ct). Što je ciklus u kojemu se prijeđe prag niži, količina kalupa (početne DNA) je veća jer je prije postignuta granična vrijednost fluorescencije(Heid i sur. 1994). Kako bi se mogli uspoređivati rezultati dobiveni iz dvaju različitih uzoraka, dobivene se vrijednosti prethodno trebaju normalizirati. U tu se svrhu koriste endogene kontrole. Kao endogena kontrola uzimaju se geni čija se ekspresija ne mijenja u uvjetima pri kojima je proveden eksperiment (Karlen i sur. 2007), u ovom slučaju aktin.

4.4.1. **Početnice za RT-PCR**

Tablica 5. Korištene početnice, njihove sekvence i broj nukleotida. Oznaka **m** prije naziva oligonukleotidnog primera označava da su to mišji geni (*mouse*), a **h** ljudski (*human*).

Ime oligonukleotida	DNA sekvenca (5'→3')	Broj nukleotida
mCyp2a4 F	5'-GGA AGA CGA ACG GTG CTT TC-3'	20
mCyp2a4 R	5'-GGA GGC TTC CCA GCA TCA TT-3'	20
mCyp2c37 F	5'-TGG CAA TCA ACC ATT GCA AAA-3'	21
mCyp2c37 R	5'-ACT TTA GCT GTG ACA TGT GGG T-3'	22
mCyp3a11 F	5'-CAT TGA GGA GGA TCA CAC ACA C-3'	22
mCyp3a11 R	5'-GTC CCA TAT CGG TAG AGG AGC A-3'	22
mNrf2 F	5'-GCT GCT CGG ACT AGC CAT TG-3'	20
mNrf2 R	5'-TCA AAT CCA TGT CCT GCT GGG-3'	21
mPXR F	5'-TCA AGG ATT TCC GGC TGC-3	18
mPXR R	5'-TAG GTT GAC ACA TCG GCC AG-3'	20
hCYP3A4 F	5'-AGT GTG GGG CTT TTA TGA TGG T-3'	22
hCYP3A4 R	5'-AAA GGC CTC CGG TTT GTG AA-3'	20

U Tablici 2. prikazani su sljedovi nukleotida forward (F) i reverse (R) početnica (Microsynth) za gene korištene u ovom istraživanju. Početnice za RT-PCR dizajnirane su pomoću NCBI baze podataka gdje je prvo pronađena sekvenca mRNA za željeni mišji gen. Zatim je na istoj stranici napravljena početnica uz pomoć alata za dizajniranje početnica Primer-BLAST. Podešena je optimalna duljina amplikona na 100pb te je izabrana opcija da se primeri moraju lijepiti na egzon-egzon spojeve. Kako bi se provjerila efikasnost početnica, korištena su serijska razrjeđenja poznate cDNA koncentracije.

4.4.2. **Priprema qRT-PCR**

Dobivena cDNA razrijeđena je vodom 10 puta u 200 µl uzorka. Potom je pripremljena smjesa komponenti potrebnih za RT-PCR, čiji je sastav prikazan u Tablici 4., za svaki od korištenih gena i za ß-aktin koji je korišten kao endogena kontrola. Korištene su ploče s 96 jažica te je u svaku jažicu dodano po 12 µl smjese i po 3 µl uzorka cDNA. Preko gotove ploče zalijepljena je naljepnica, kako uzorci ne bi isparili za vrijeme zagrijavanja, te je centrifugirana 3 minute na 2000g pri temperaturi od 4°C. Uzorci su potom prebačeni u RT-PCR uređaj (7500 Real Time PCR SystemApplied Biosystems Foster City, CA, SAD) te je pokrenuta reakcija.

Tablica 6. Sastav smjese komponenti potrebnih za RT-PCR.

Komponenta	**V(reakcija) / µl**
SYBR Green	7,5
FW primer 10µM	0,75
REV primer 10µM	0,75
Nuclease free H_2O	3
Ukupno	12

4.4.3. **Obrada podataka**

U ovom su istraživanju mjerene relativne promjene ekspresije ciljnih gena (Cyp2a4, Cyp2c37, Cyp3a11, Nrf2 i PXR) u jetri, crijevima i mokraćnom mjehuru miševa. Za analizu podataka korištena je komparativna Ct metoda. Ovom se metodom uspoređuje Ct vrijednost

jednog ciljnog gena s drugim (koristeći formulu $2^{-\Delta\Delta Ct}$), od kojih je svaki normaliziran u odnosu na kontrolni gen (Schmittgen i Livak 2008). Od dobivenih rezultata korištena je srednja Ct vrijednost duplikata (Ct Mean) gena od interesa (GOI) i aktina (Akt). Prvo se Ct Mean gena od interesa (GOI) normalizirao u odnosu na aktin (Akt) u istom uzorku. Dobiveni rezultat predstavlja ΔCt vrijednost (1). Nadalje, ΔCt vrijednosti AB uzoraka uspoređena je sa srednjom vrijednosti B uzoraka kako bi se dobila ΔΔCt vrijednost (2). Naposljetku je iznos ΔΔCt vrijednosti uvršten u jednadžbu kao potencija broja 2 kako bi se dobio omjer količine gena od interesa (3):

(1) $\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{AKT}$

(2) $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{GF} - \Delta Ct_{SPF})$

(3) Omjer količine gena od interesa = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Normalnosti distribucije uzoraka provjerene su Shapiro Wilk testom. Uzorci koji su pokazali normalnu distribuciju dalje su analizirani studentovim t-testom, a oni koji nisu Mann-Whitney testom. Vrijednost od $p<0.05$ smatrana je statistički značajnom. Za grafički prikaz korištena je $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrijednost te je prikazana i pozitivna SEM (standardna pogreška ili engl. *Standard Error of Mean*). Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Uzorci s HIGHSD (engl. *High Standard Deviation*) su izbačeni iz daljnjih analiza, a ako je bio prisutan HIGHSD za aktin, izbačeni su svi geni s tog reda ploče PCR-a. Izračun relativnih promjena ekspresije ciljnih gena napravljen je u programu Microsoft Office Excell 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD), a statistička obradu u programu GraphPad Prism (GraphPad Software, LLC).

4.5. Priprema uzoraka za kromatografiju

Od HepG2 stanica koje su korištene za prethodni eksperiment, za potrebe ovog eksperimenta, skupljeno je po 2 ml medija 24 sata nakon tretmana. Uzorci su čuvani na 4°C do početka eksperimenta. Također su pripremljene i otopine standarda: 0,1% BBN u etil acetatu i par granula BCPN-a u 500 µl etil acetata.

4.6. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (TLC, prema eng. *Thin Layer Chromatography*) je kromatografska tehnika koja se koristi za odvajanje komponenata smjese pomoću tanke stacionarne faze poduprte inertnom podlogom. Uvelike se upotrebljava zbog svoje jednostavnosti, relativno niskog troška, visoke osjetljivosti i brzine odvajanja. Može se koristiti kao sredstvo za praćenje napretka reakcije ili, u ovom slučaju, za pročišćavanje malih količina spoja. TLC funkcionira na istom principu kao i sve kromatografske metode: spoj ima različite afinitete prema pokretnoj i stacionarnoj fazi, a to utječe na brzinu kojom migrira. Cilj TLC-a je dobiti dobro definirane migracijske točke/pruge na kromatografskoj ploči (Touchstone i Dobbins 1983). Kromatografske ploče, koje predstavljaju stacionarnu fazu, mogu se pripremiti u laboratoriju, ali se najčešće kupuju. Uzimajući u obzir svojstva našeg uzorka, odabrane su Silikagel 60 F254 ploče. Kao i kod odabira stacionarne faze, pri odabiru ispravnog otapala treba imati na umu kemijska svojstva analita (Wiemer 1988). Shodno tome, mobilna faza pripremljena je koristeći kloroform, metanol i ledenu octenu kiselinu u omjeru 18:1:1, ukupnog volumena od 100 ml. Nakon odabira stacionarne i mobilne faze, eksperiment je proveden prema protokolu:

1. Dodano je 13,5 µl 12 M HCl-a i 2 ml etil acetata u 2 ml uzorka. Korištene su staklene tubice s čepom.
2. Uzorci su promiješani na vorteksu 1 minutu i ostavljeni na zraku 1 minutu s otvorenim čepom. *Ako se slojevi počnu odjeljivati, ostavljeni su na zraku još 5 minuta. Ako se stvori emulzija, uzorci su centrifugirani 3 minute na 3000g pri temperaturi od 25°C.*
3. Gornji organski sloj prebačen je u zasebnu epruvetu.
4. Ponovljeno je dodavanje 2 ml etil acetata, 2. i 3. korak 3 puta.

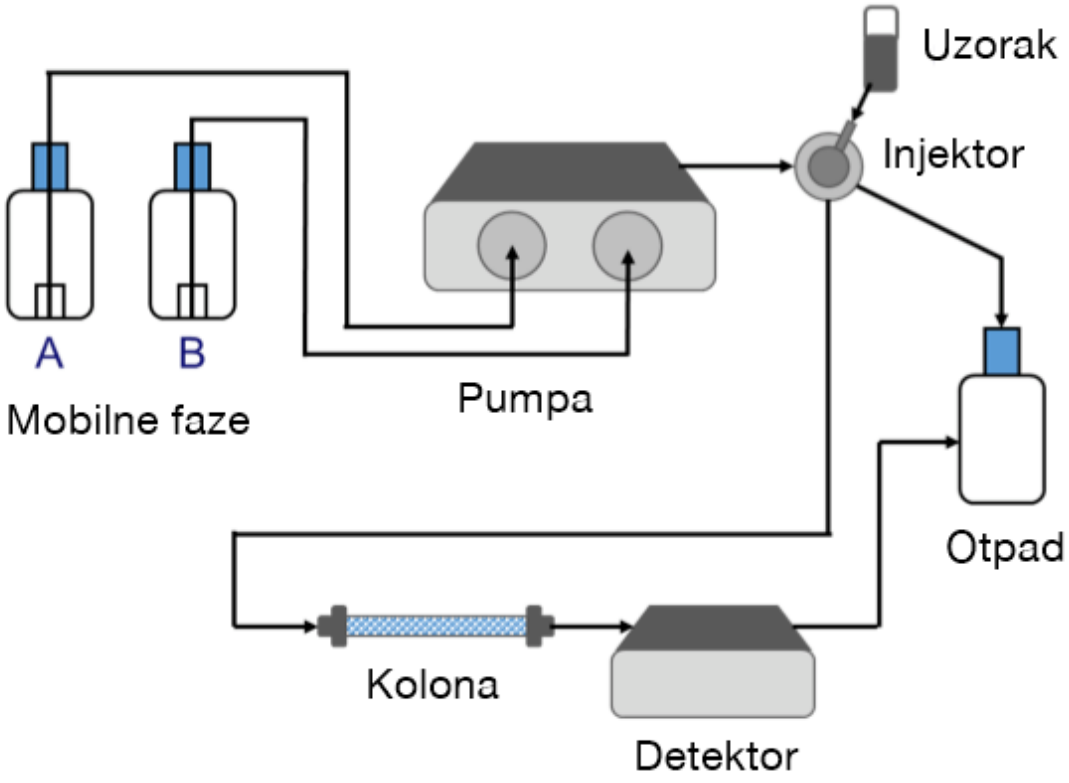
5. U epruvetu s organskim slojem dodana je proizvoljna količina natrijeva sulfata kako bi skupio vodu.
6. Uzorci su centrifugirani 3 minute pri 1500g i temperaturi od 25°C nakon čega je organski sloj dekantiran u nove epruvete.
7. Otapalo je uklonjeno sušenjem u vakuumskom koncentratoru (SpeedVac). *Vrijeme sušenja ovisi o količini uzorka, ali traje otprilike 50 minuta. Nakon 25 minuta, približno 1,5 ml preostalog uzorka prebačeno je u eppendorf tubice te se nastavilo sušenje još 25 minuta.*
8. Nastali talog na dnu tubice, otopljen je u 20 µl etil acetata.
9. Nanošeno je po 20 µl uzorka i standarda na ploču koja se razvijala u kadici s mobilnom fazom 1 sat i 15 minuta.
10. Ploču je pregledana pod UV svjetlom te su obilježene pruge u razini s BCPN standardom grafitnom olovkom.
11. Svaka pruga s ploče je sastrugana, prebačena u nove tubice te eluirana s 4 ml acetona.
12. Uzorci su filtrirani kroz Nylon syringe filtere (0.45 µm, 13 mm).
13. Alikvot se koncentrirao do približno 4 ml pomoću vakuumskog koncentratora otprilike 35 minuta.
14. Dobiveni talog otopljen je u 200 µl smjese izopropanola i acetonitrila u omjeru 4:1 te je prebačen u HPLC vijale s umetkom za male volumene.

4.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, prema eng. *High-performance liquid chromatography)* je poseban oblik kromatografije, a koristi se za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih spojeva (Martin i Guiochon 2005). Glavni dijelovi HPLC-a su injektor koji ubrizgava uzorak, kolona koja sadrži porozni materijal (stacionarnu fazu), pumpa koja stvara pritisak i tjera mobilnu fazu i smjesu analita kroz kolonu i detektor koji mjeri apsorbancu (Slika 7.). Vrijeme potrebno da komponenta pređe put od injektora do detektora zove se retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja. Vrijeme zadržavanja varira ovisno o interakcijama između stacionarne faze, molekula koje se analiziraju i korištenog otapala (Xiang, Liu i Lee 2006).

Ovo istraživanje provedeno je na aparatu Prekin Elmer Series 200 (Autosampler PE Series 200, binarna pumpa PE Series 200, UV/VIS detektor PE Series 200, vakuum otplinjač (tekuće faze) PE Series 200, Peltier column owen PE Series 200). Korištena je Ultra Cyano

kolona (5 µm, 250 x 4,6 mm, Restek). Detekcija razdvojenih pikova izvršena je pomoću UV detektora pri 239 nm. Kao mobilna faza koristila se smjesu otapala: A: acetonitril/voda = 15/85 uz dodatak 0,05 % TFA (trifluoroctena kiselina), B: acetonitril. Protok mobilne faze iznosio je 1,2 ml/min, injektirano je 10µl otopine uzorka korištenjem autosamplera, a kolona je termostatirana pri temperaturi od 30^0C.



Slika 7. Glavni dijelovi HPLC-a. Glavni dijelovi HPLC-a su injektor koji ubrizgava uzorak, kolona koja sadrži porozni materijal (stacionarnu fazu), pumpa koja stvara pritisak i tjera mobilnu fazu i smjesu analita kroz kolonu i detektor koji mjeri apsorbanciju.

Izvor: https://research.tue.nl/en/equipments/high-performance-liquid-chromatography-hplc

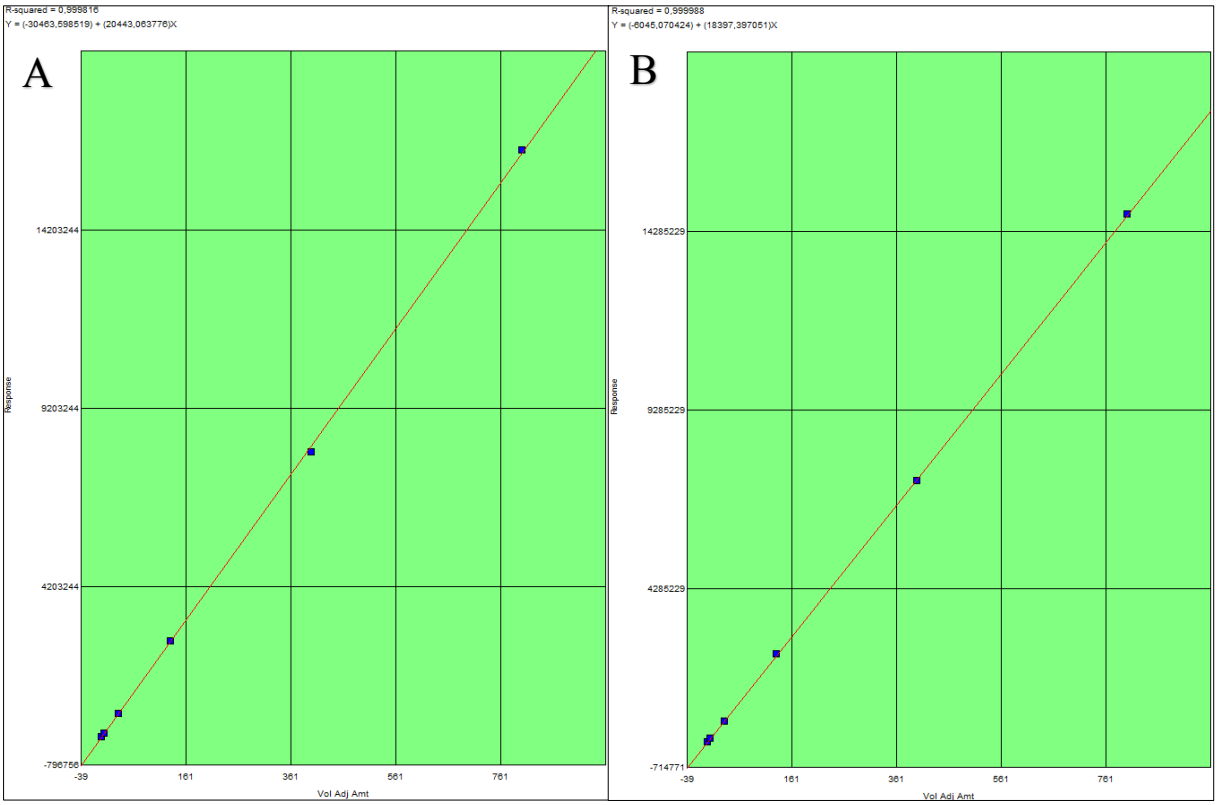
4.7.1. **Izrada baždarnog pravca**

Komponente prisutne u uzorcima identificirane su uspoređivanjem njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenom standarda. Kao standardi korišteni su BBN (R_t= 7,72) i BCPN (R_t= 9,00) pripremljeni na sljedeći način: u odmjerne tikvice od 25 ml odvagano je po 40 mg BBN-a i BCPN-a. Tikvice su nadopunjene smjesom izopropanola i acetonitrila u omjeru 4:1. Iz radnog standarda napravljena su razrjeđenja kao što je prikazano u Tablici 7.

Analizom razrjeđenja određena je površina ispod kromatografske krivulje. Pomoću računalnog programa nacrtan je baždarni dijagram iz kojeg je određena jednadžba pravca i koeficijent regresije (Slika 8A. i 8B.).

Tablica 7. Razrjeđenja radnog standarda u svrhu izrade baždarnog pravca.

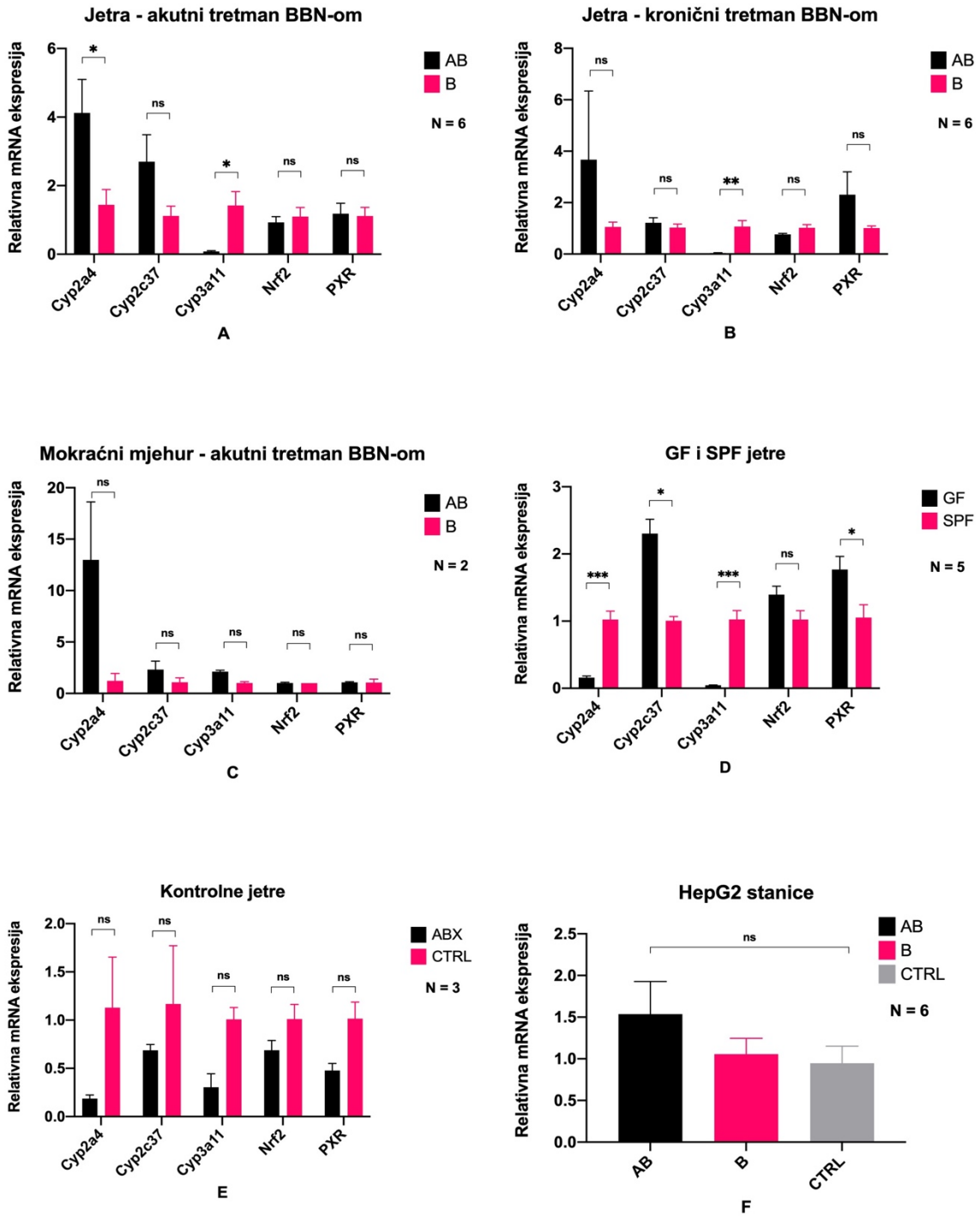
Razrjeđenje	Koncentracija (µg/ml)
R4	400,70
R3	133,57
R2	33,39
R1	6,68
R0	1,34



Slika 8. Grafički prikaz kalibracijskih krivulja. **A.** BBN kalibracijska krivulja. Za kalibraciju je korišteno pet razrjeđenja radne otopine (K4, K2, K, K1, K0), a slika je preuzeta iz računalnog programa. **B.** BCPN kalibracijska krivulja. Za kalibraciju je korišteno pet razrjeđenja radne otopine (K4, K2, K, K1, K0), a slika je preuzeta iz računalnog programa.

5. REZULTATI

Rezultati eksperimenta *Mjerenje ekspresije mRNA gena za koje se smatra da su uključeni u proces biotransformacije BBN-a u BCPN* prikazani su na Slici 9.



Slika 9. Relativna mRNA ekspresija uzoraka akutnih (**8A**) i kroničnih (**8B**) jetri, mokraćnih mjehura (**8C**), GF i SPF jetri (**8D**), kontrolnih uzoraka (**8E**) i HepG2 stanica (**8F**). Oznaka N označava broj uzoraka. Oznaka ns pokazuje da razlika mRNA ekspresije nije statistički značajna prema rezultatima t-testa. Ostale oznake pokazuju da je razlika mRNA ekspresije statistički značajna, s p-vrijednošću <0.05 za oznaku *, <0.01 za oznaku ** i <0.001 za oznaku ***. Normalnosti distribucije uzoraka provjerena je Shapiro Wilk testom.

U tkivu mokraćnog mjehura (Slika 8c) genska ekspresija svih gena (osim aktina) bila je vrlo niska te se u četiri od šest uzoraka nije mogla ni determinirati. Zbog toga dobiveni rezultati nisu posebno razmatrani.

Vrijednosti 2^{-ddCt} Cyp2a4 gena u AB uzorku jetre s kroničnog tretmana te Cyp2c37 gena u uzorku GF jetre nisu bile normalno distribuirane prema Shapiro Wilk testu, pa su analizirane Mann-Whitney testom. Ostali rezultati, koji su pokazali normalnu distribuciju, analizirani su pomoću studentovog t-testa. P-vrijednost veća od 0.05 smatrana je statistički neznačajnom te je takvim uzorcima dodijeljena oznaka ns (engl. *not significant*). P-vrijednost manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom te je takvim uzorcima dodijeljena oznaka *, značajnost manja od 0.01 označena je s **, a značajnost manja od 0.001 s ***.

1. Cyp2a4: Gen Cyp2a4 pokazao je statistički značajno veću ekspresiju u uzorcima AB u usporedbi s uzorcima B u tkivima jetri na akutnom tretmanu (p-vrijednost: 0.048). Nadalje, vidljiv je statistički značajno manji ekspresija u uzorcima GF u usporedbi s SPF uzorcima u tkivima jetri (p-vrijednost: 0.0001). U tkivima kroničnih i kontrolnih jetri nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji Cyp2a4 gena između uzoraka AB i B.

2. Cyp2c37: Nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena Cyp2c37 između uzoraka AB i B u tkivima akutnih, kroničnih i kontrolnih jetri. Međutim, pokazan je statistički značajan veći ekspresija u uzorcima GF jetri u usporedbi s uzorcima SPF jetri (p-vrijednost: 0.016).

3. Cyp3a11: Gen Cyp3a11 pokazao je statistički značajno manju ekspresiju u uzorcima AB u usporedbi s uzorcima B u tkivima akutnih i kroničnih jetri (p-vrijednost: 0.016 i 0.0041) kao i kod GF i SPF jetri (p-vrijednost: 0.00007). Jedino u tkivu kontrolnih jetri nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji Cyp3a11 gena.

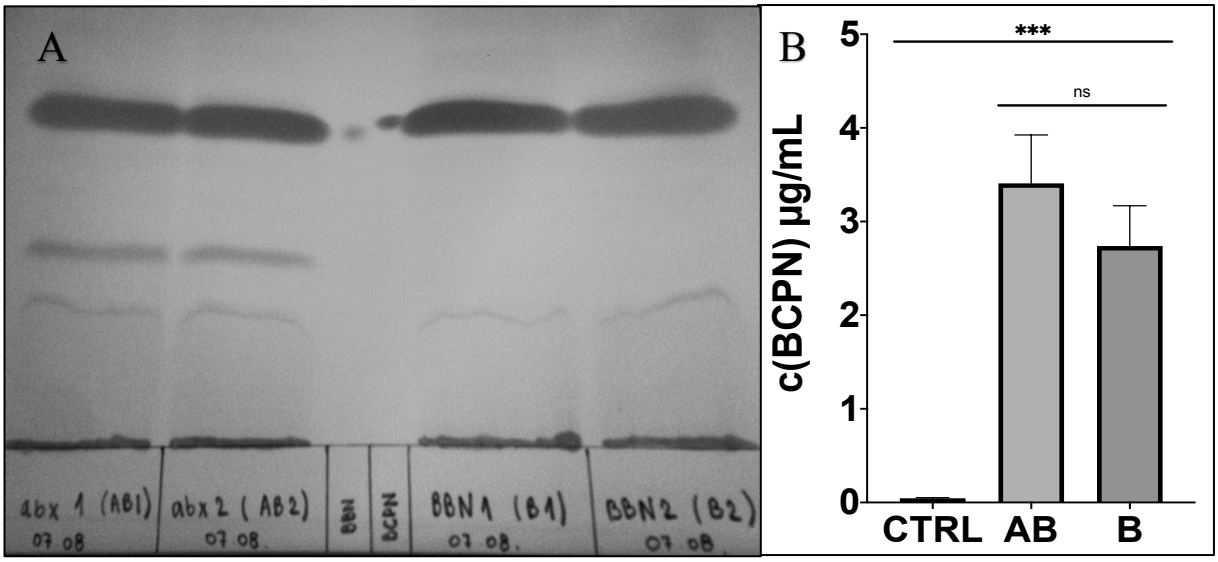
4. Nrf2: Nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena Nrf2 između uzoraka AB i B u tkivima akutnih, kroničnih i kontrolnih jetri, kao ni kod uzoraka GF i SPF jetri.

5. PXR Nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena PXR između uzoraka AB i B u tkivima akutnih, kroničnih i kontrolnih jetri. Međutim, u uzorcima GF i SPF jetri pokazana je statistički značajna razlika u ekspresiji gena (p-vrijednost: 0.036).

6. CYP3A4: Nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena CYP3A4 između AB i B uzoraka HepG2 stanica. Također, u usporedbi uzoraka AB i B s kontrolnim uzorcima HepG2 stanica nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena CYP3A4.

Rezultati eksperimenta *Mjerenje količine BCPN-a u uzorcima HepG2 stanica* prikazani su na Slici 9. Rezultati TLC-a (Slika 10A.) u svim uzorcima podudarali su se s rezultatima HPLC-a (Slika 10B.). Prilikom svake HPLC reakcije, analizirana je i obična voda kao negativna kontrola. Prisutnost BCPN-a u uzorcima utvrđena je uspoređivanjem retencijskih vremena sa standardom poznate koncentracije. Očitane koncentracije BCPN-a korigirane su s obzirom na korišteni alikvot te izražene u µg/ml (Tablica 8.), prema formuli:

$$c(BCPN)_{konačni} = \frac{c(BCPN)_{u\,0,2ml} \times 0,2ml}{2ml}$$



Slika 10. Kromatografska analiza BBN-a i BCPN-a. **A.** Primjer kromatografske ploče pod UV svjetlom. Nanošeno je po dva uzorka u duplikatima između kojih su dodani standardi BBN i BCPN. **B.** Grafički prikaz konačne koncentracije BCPN-a u HepG2 stanicama. Oznaka ns pokazuje da razlika između skupina AB i B nije statistički značajna. Oznaka *** pokazuje da je razlika između kontrolnih i tretiranih uzoraka statistički značajna s p-vrijednošću <0.001.

Sve vrijednosti konačnih koncentracija BCPN-a pokazale su normalnu distribuciju prema Shapiro Wilk testu pa su dalje analizirane studentovim t-testom. Nakon provedbe t-testa, između konačnih koncentracija BCPN-a uzoraka AB i B, dobivena je p-vrijednost od 0.64 koja sugerira da ne postoji statistički značajna razlika između koncentracija BCPN-a u uzorcima HepG2 stanica s antibioticima i onih bez antibiotika. Statistički značajna razlika postoji ako se usporede koncentracije BCPN-a u uzorcima AB i B s kontrolnim uzorcima. Nakon provedbe t-testa, dobivena je p-vrijednost od 0.0001 u usporedbi negativne kontrole s tretiranim uzorcima.

Tablica 8. Podaci dobiveni pomoću HPLC-a za eksperiment: **Mjerenje količine BCPN-a u uzorcima HepG2 stanica**.

Uzorak	Početni volumen (ml)	c(BCPN) (µg u 0,2 ml alikvota)	c(BCPN) (µg/ml)
CTRL	2	0,4876	0,0488
CTRL	2	0,4688	0,0469
CTRL	2	0,462	0,0462
CTRL	2	0	0,0000
CTRL	2	0,4115	0,0412
CTRL	2	0,6803	0,0680
AB	2	28,7721	2,8772
AB	2	26,5352	2,6535
AB	2	21,9213	2,1921
AB	2	19,7534	1,9753
AB	2	63,3156	6,3316
AB	2	47,3872	4,7387
AB	2	36,0378	3,6038
AB	2	28,8743	2,8874
B	2	25,9265	2,5927
B	2	30,4093	3,0409
B	2	19,1416	1,9142
B	2	24,9203	2,4920
B	2	54,179	5,4179
B	2	30,6382	3,0638
B	2	15,3527	1,5353
B	2	18,4597	1,8460

6. RASPRAVA

Iako je rak mokraćnog mjehura veliki zdravstveni problem, još uvijek je prilično nedovoljno proučavan u odnosu na druge karcinome, naročito na *in vivo* modelima (Kobayashi i sur. 2015). Eksperimentalni tumori mokraćnog mjehura koristan su model za proučavanje karcinogeneze mokraćnog mjehura, a primjena kemijskih karcinogena jedna je od najčešće korištenih metoda za njihovu indukciju. BBN je najčešće upotrebljavani urotelni kemijski kancerogen korišten za *in vivo* pokuse, a kemijski je srodan karcinogenim spojevima iz duhanskog dima. U organizmu se metabolizira u svoj karcinogeni oblik uz pomoć, među ostalim, enzima obitelji CYP.

U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da su CYP enzimi, kao i njihovi aktivatori, jedni od najčešće diferencijalno izraženih enzima između konvencionalnih i GF miševa (Björkholm i sur. 2009). Da bi odgovorili na kemijske izazove, ekspresija mnogih enzima regulirana je pomoću ligandom-aktiviranih čimbenika transkripcije, tj. nuklearnih receptora (Tolson i Wang 2011). Kako bi se provjerilo utječe li mikrobiom na gensku ekspresiju kod miševa, izabrano je pet gena: tri gena citokroma P-450: Cyp2a4, Cyp2c37 i Cyp3a11 te dva njihova aktivatora: Nrf2 i PXR.

Ovo istraživanje pokazalo je da odsutnost miokrobioma utječe na ekspresiju mRNA mnogih važnih DPG-a, među kojima je najistaknutiji primjer smanjena ekspresija mRNA PXR-ciljnog gena Cyp3a11. Njegova eskpresija smanjena je u jetrama svih miševa koji su konzumirali antibiotike i GF miševa. Do sada se smatralo da je smanjenje ekspresije Cyp3a11 gena u nedostatku crijevne mikrobiote vjerojatno rezultat smanjene PXR-signalizacije jer je PXR dobro poznati aktivator transkripcije Cyp3a11 gena (Toda i sur. 2009). Nedavne su studije pokazale da je žučna litoholna kiselina, koja je pronađena u fekalijama samo iz konvencionalnih štakora, a ne i iz GF štakora, potencijalni ligand za PXR aktivator te da povećava njegovu ekspresiju, a time i ekspresiju Cyp3a obitelji gena u jetri (Staudinger i sur. 2001). Međutim, u ovom se istraživanju pokazalo da je ekspresija Cyp3a11 gena smanjena i kad je ekspresija PXR gena nepromijenjena. Kod miševa tretiranih antibioiticma, razlike u ekspresiji PXR gena gotovo da i nema, dok je ekspresija Cyp3a11 gena znatno smanjena. Kod GF i SPF miševa primijećen je i suprotan učinak. Ekspresija PXR gena je povećana kod GF miševa, naspram SPF miševa, dok je ekspresija Cyp3a11 gena kod GF miševa smanjena. Shodno navedenome, može se zaključiti da tretman antibioticima dovodi do redukcije broja bakterija koje vjerojatno, još uvijek nepoznatim metabolitima, reguliraju ekspresiju Cyp3a11 gena.

Osim Cyp3a11 gena, nema velike promjene u ekspresiji gena između uzoraka tretiranih antibiotikom i onima s normalnim mikrobiomom. Međutim, kada govorimo o GF i SPF miševima, svi geni (osim Nrf2 gena) pokazali su statistički značajnu razliku u genskoj ekspresiji, što govori da potpuni izostanak mikrobiote znatno utječe na gensku ekspresiju. U našim dosadašnjim istraživanjima, odsutnost mikrobiote (u GF miševima) dovela je do promjene aktivnosti gena koji kontroliraju cirkadijani ritam (Šimić 2019).

Cyp2a4 gen sudjeluje u 15-α-hidroksilaciji steroidnih hormona (poput testosterona i estrogena) (Poça i sur. 2017). Gen Cyp2c37 kao i cijela obitelj Cyp2c citokrom P-450 monooksigenaza odgovorna je za metabolizam otprilike 20% terapijskih lijekova i mnogih endogenih spojeva kod ljudi. Ukoliko se induciraju prije konzumacije lijekova, mogu rezultirati promjenama u učinkovitosti lijeka (Jackson i sur. 2006). Gen Cyp3a11 kodira jedan od glavnih enzima uključenih u metabolizam lijekova te je odgovoran za biotransformaciju više od 75% ksenobiotika (Selwyn i sur. 2015). Nrf2 i PXR djeluju kao ksenosenzori i reguliraju ekspresiju jetrenih enzima i transportera uključenih u metabolizam lijekova. Također je odabran i ljudski gen CYP3A4 (homolog mišjeg gena Cyp3a11) budući da je upravo on zaslužan za biotransformaciju više od 60% lijekova te je najčešći od svih članova citokrom P-450 obitelji uključenih u metabolizam lijekova (Selwyn, Cui i Klaassen 2015).

Kako bi se pokazalo da je redukcija ili izostanak mikrobioma uzrokovao promjenu ekspresije gena, a ne utjecaj antibiotika, provedeno je istraživanje na HepG2 stanicama. Stanice su tretirane istim spektrom antibiotika kao i miševi. Eksperimentom *Mjerenje ekspresije mRNA gena za koje se smatra da su uključeni u proces biotransformacije BBN-a u BCPN* pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji CYP3A4 gena između stanica tretiranih antibioticima, stanica kojima nisu dodani antibiotici te kontrolnih stanica. Time je pokazano da korišteni antibiotici, samo svojim učinkom, ne mijenjaju ekspresiju najvažnijeg gena uključenog u metabolizam ksenobiotika. U daljnjem bi istraživanju trebalo koristiti staničnu liniju primarnih hepatocita, jer je kod HepG2 stanične linije slabija ekspresija CYP3A4 gena.

U eksperimentu *Mjerenje količine BCPN-a u uzorcima HepG2 stanica* nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji BCPN-a između AB i B stanica. Kako su stanične kulture sterilne (tj. bez mikrobiote), to znači da učinak promjene ekspresije gena, koji se opaža u miševa, postoji zbog posrednih učinaka mikrobioma, a ne korištenih antibiotika. U našim ranijim istraživanjima, pokazana je razlika u koncentraciji BCPN-a u urinima, fecesu te izolatima tankog crijeva AB i B miševa. U navedenim uzorcima opažena je statistički značajna manja koncentracija BCPN-a u urinima, fecesu te izolatima tankog crijeva miševa koji su pili

antibiotike, nego kod onih koji nisu. Takva istraživanja dodatno potvrđuju da je redukcija mikrobioma zaslužna za smanjenu pretvordu BBN-a u BCPN.

Sudjelovanje mikrobiote crijeva u metabolizmu lijekova za posljedicu ima međuljudsku varijaciju u učinkovitosti i toksičnosti lijekova. Razlikovanje pojedinaca u odgovoru na lijek uzrokuje zakašnjelo djelovanje i štetne nuspojave. Iako sve više dokaza upućuje na to da crijevna mikrobiota doprinosi toj varijabilnosti, molekularni mehanizmi djelovanja uglavnom ostaju nepoznati. Stoga je vrlo važno proučiti učinak mikrobiote na gene koji metaboliziraju lijekove, kao i mehanizme njihovog djelovanja.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Mikrobiota utječe na ekspresiju četiri gena koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika.
2. Ekspresija Cyp3a11 gena, koji je odgovoran za pretvorbu više od 70% ksenobiotika, značajno je regulirana bakterijama, a ne samo standardnim transkripcijskim čimbenicima.
3. Odsutnost mikrobiote u GF miševima dovela je do značajne promjene aktivnosti gena Cyp2a4, Cyp2c37, Cyp3a11 i PXR, dok je gen Nrf2 ostao nepromijenjen.
4. Testirani antibiotici ne utječu na biotransformaciju BBN-a u BCPN u jetrenim stanicama.
5. Korišteni antibiotici ne mijenjaju ekspresiju ključnih gena skupine CYP u jetrenim stanicama.

9. REFERENCE

Babjuk, M., Oosterlinck, W., Sylvester, R., Kaasinen, E., Böhle, A., Palou-Redorta, J. i Rouprêt, M. 2011, „EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update“, *European Urology*, vol. 59, no. 6, str. 997–1008.

Benfanti, M., Magagnotti, C., Bonati, M., Fanelli, R. i Airoldi, L. 1988, „Pharmacokinetic in Rats1 Profile and Metabolism of 7V-Nitrosobutyl- (4-hydroxybutyl) amine“, *Cancer Research*, vol. 48, str. 3666–9.

Björkholm, B., Bok, C.M., Lundin, A., Rafter, J., Hibberd, M.L. i Pettersson, S. 2009, „Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver“, *PloS one*, vol. 4, no. 9, str. 6958–6958.

Bruce, A.W. 1976, „Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors“, *The Journal of Urology*, vol. 116, no. 2, str. 180–2.

Bučević Popović, V., Šitum, M., Chow, C.E.T., Chan, L.S., Roje, B. i Terzić, J. 2018, „The urinary microbiome associated with bladder cancer“, *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, str. 1–8.

Burger, M., Catto, J.W.F., Dalbagni, G., Grossman, H.B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeney, L.A., La Vecchia, C., Shariat, S. i Lotan, Y. 2013, „Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer“, *European Urology*, vol. 63, no. 2, str. 234–41.

Cheng, L., Montironi, R., Davidson, D.D. i Lopez-Beltran, A. 2009, „Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder“, *Modern Pathology*, vol. 22, no. S2, str. S70–95.

Coley, W.B. 1910, „The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)“, *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, vol. 3, no. Surg Sect, str. 1–48.

Coley, W.B. 1991, „The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases.“, *Clinical orthopaedics and related research*, vol. 262, str. 3–11.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. i Maxwell Parkin, D. 2008, „Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 “:, *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 2010, str. 2893–917.

Garrett, W.S. 2017, „Cancer and the microbiota“, *Science*, vol. 348, no. 6230, str. 80–6.

Halling, K.C. 2016, „Urothelial carcinoma“, *Molecular Pathology in Clinical Practice:Second Edition*, vol. 1655, str. 447–52.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. i Williams, P.M. 1994, „Real Time Quantitative PCR“, *Genome Methods*, vol. 6, str. 986–94.

Hooper, L. V, Littman, D.R., Macpherson, A.J. i Program, M.P. 2015, „Interactions between the microbiota and the immune system“, *Science*, vol. 336, no. 6086, str. 1268–73.

Jackson, J.P., Ferguson, S.S., Negishi, M. i Goldstein, J.A. 2006, „Phenytoin induction of the cyp2c37 gene is mediated by the constitutive androstane receptor“, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 34, no. 12, 2006/08/25., str. 2003–10.

Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G. i Osterreicher, C.H. 2013, „IL-23 / IL-17-mediated tumour growth“, *Nature*, vol. 491, no. 7423, str. 254–8.

Kanemoto, K., Fukuta, K., Kawai, N., Tozawa, K., Ochiai, M., Okamoto, K., Ohnami, S., Sakamoto, H., Yoshida, T., Kanai, Y., Katoh, M., Yasui, T., Kohri, K., Kakizoe, T. i Nakagama, H. 2016, „Genomic landscape of experimental bladder cancer in rodents and its application to human bladder cancer: Gene amplification and potential overexpression of Cyp2a5/CYP2A6 are associated with the invasive phenotype“, *PLoS ONE*, vol. 11, no. 11, str. 1–17.

Karlen, Y., Mcnair, A., Perseguers, S., Mazza, C. i Mermod, N. 2007, „Statistical significance of quantitative PCR“, *BMC Bioinformatics*, vol. 16, str. 1–16.

Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., Kiemeney, L., Kriegmair, M., Montironi, R., Murphy, W.M., Sesterhenn, I.A., Tachibana, M. i Weider, J. 2005, „Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis“, *Urology*, vol. 66, no. 6 SUPPL. 1, str. 4–34.

Kobayashi, T., Owczarek, T.B., Mckiernan, J.M., Abate-, C., Biology, C., Irving, H. i Cancer, C. 2015, „Modeling bladder cancer in mice: opportunities and challenges“, *Nat Rev Cancer*, vol. 15, no. 1, str. 42–54.

Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J. i Knight, R. 2011, „Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome“, *PNAS*, vol. 108, str. 4578–85.

Lichtenstein, P., Holm, N. V, Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. i Hemminki, K. 2000, „Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland“, *New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 2, str. 78–85.

Markowski, M.C., Boorjian, S.A., Burton, J.P., Hahn, N.M., Ingersoll, M.A., Vareki, S.M., Pal, S.K. i Sfanos, K.S. 2019, „The Microbiome and Genitourinary Cancer: A Collaborative Review“, *European Urology*, vol. 75, no. 4, str. 637–46.

Martin, M. i Guiochon, G. 2005, „Effects of high pressure in liquid chromatography“, *Journal of Chromatography A*, vol. 1090, no. 1, str. 16–38.

Mihaljević, F. 2019, *Ljudska mikrobiota i mikrobiom*, vol. 73, str. 3–11.

Min, J., Soo, C., Oh, J., Yoon, S., Ji, L. i Im, H. 2014, „HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics“, *Archives of Pharmacal Research*, vol. 38, str. 691–704.

Mooij, M.G., Schwarz, U.I., Koning, B.A.E. De, Leeder, J.S., Gaedigk, R., Samsom, J.N., Spaans, E., Goudoever, J.B. Van, Tibboel, D., Kim, R.B., Wildt, S.N. De, Care, I. i Surgery, P. 2014, „Ontogeny of Human Hepatic and Intestinal Transporter Gene Expression during Childhood : Age Matters s“, *Drug metabolism and disposition*, vol. 42, str. 1268–74.

Mori, Y. 2001, „Lack of change in the levels of liver and kidney cytochrome P-450 isozymes in p53(+/-) knockout mice treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine“, *Mutagenesis*, vol. 16, no. 5, str. 377–83.

Poça, K.S., Parente, T.E.M., Chagas, L.F., Leal, B.S., Leal, H.S., Paumgartten, F.J.R. i De-Oliveira, A.C.A.X. 2017, „Interstrain differences in the expression and activity of Cyp2a5 in the mouse liver“, *BMC Research Notes*, vol. 10, no. 1, str. 125.

Redelman-sidi, G., Glickman, M.S. i Bochner, B.H. 2014, „The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer — a current perspective“, *Nature Publishing Group*, vol. 11, no. 4, str. 153–62.

Schmittgen, T.D. i Livak, K.J. 2008, „Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method“, *Nature Protocols*, vol. 3, no. 6, str. 1101–8.

Selwyn, F.P., Cheng, S.L., Bammler, T.K., Prasad, B., Vrana, M., Klaassen, C. i Cui, J.Y. 2015, „Developmental regulation of drug-processing genes in livers of germ-free mice“, *Toxicological Sciences*, vol. 147, no. 1, str. 84–103.

Selwyn, F.P., Cui, J.Y. i Klaassen, C.D. 2015, „Special Section on Drug Metabolism and the Microbiome RNA-Seq Quantification of Hepatic Drug Processing Genes in Germ-Free Mice“, *Drug metabolism and disposition*, vol. 43, str. 1572–80.

Šimić, A. 2019, „Razlike izražaja gena u mokraćnom mjehuru miševa uzgajanih u sterilnom i standardnom okolišu“.

Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., Willson, T.M., Koller, B.H. i Kliewer, S.A. 2001, „The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, vol. 98, no. 6, str. 3369–74.

Thomas-White, K., Forster, S.C., Kumar, N., Kuiken, M. Van, Putonti, C., Stares, M.D., Hilt, E.E., Price, T.K., Wolfe, A.J. i Lawley, T.D. 2018, „Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota“, *Nature Communications*, vol. 9, str. 1–7.

Toda, T., Saito, N., Ikarashi, N., Ito, K., Yamamoto, M., Ishige, A., Watanabe, K. i Sugiyama, K. 2009, „Intestinal flora induces the expression of Cyp3a in the mouse liver“, *Xenobiotica*, vol. 39, no. October 2008, str. 323–34.

Tolson, A.H. i Wang, H. 2011, „Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR“, *Adv Drug Deliv Rev.*, vol. 62, no. 13, str. 1238–49.

Touchstone, J.C. i Dobbins, M.F. 1983, *Practice of thin layer chromatography*, J. Wiley i Sons ;, New York.

Vasconcelos-Nóbrega, C., Colaço, A., Lopes, C. i Oliveira, P.A. 2012, „BBN as an urothelial carcinogen“, *In Vivo*, vol. 26, no. 4, str. 727–39.

Wiemer, B. 1988, „Fundamentals of thin layer chromatography planar chromatography.“, *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, vol. 16, no. 6, str. 653.

Wolfe, A.J. i Brubaker, L. 2018, „Urobiome updates : advances in urinary microbiome research“, *Nature Reviews Urology*, vol. 16, no. 2, str. 73–4.

Wong, M.L. i Medrano, J.F. 2005, „Real-time PCR for mRNA quantitation“, *BioTechniques*, vol. 39, no. 1, str. 75–85.

Xiang, Y., Liu, Y. i Lee, M.L. 2006, „Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature“, *Journal of Chromatography A*, vol. 1104, no. 1, str. 198–202.

Yi, P. i Li, L. 2012, „The germfree murine animal : An important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host“, *Veterinary Microbiology*, vol. 157, no. 1–2, str. 1–7.