

Utjecaj istodobne primjene delta-9-tetrahidrokanabinola i irinotekana na ekspresiju i aktivnost UDP-glukuronil-transferaza u jetri miševa sa singeničnim tumorom debelog crijeva

Bartolić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:607701>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marija Bartolić

**Utjecaj istodobne primjene Δ -9-
tetrahidrokanabinola i irinotekana na
ekspresiju i aktivnost UDP-glukuronil-
transferaza u jetri miševa sa singeničnim
tumorom debelog crijeva**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom dr. sc. Suzane Žunec i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Roberta Belužića u Laboratoriju za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta financiranog sredstvima programskog financiranja Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb i Sveučilišta Sjever, Varaždin pod nazivom „Istraživanje međudjelovanja irinotekana i tetrahidrokanabinola na laboratorijskim glodavcima integriranjem biokemijskih, molekularno-bioloških, patohistoloških i analitičkih metoda“ voditeljice prof. dr. sc. Ane Lucić Vrdoljak.

Zahvale

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Suzani Žunec na svesrdnoj podršci koju mi je ukazala tokom izrade ovog diplomskog rada i na samoj prilici da sudjelujem u ovako zanimljivom istraživanju te da dio eksperimenata provedem u sklopu prakse u Njemačkoj. Neizmjerne sam zahvalna na svim savjetima, sugestijama i izrazito srdačnom pristupu koji je izradu ovog rada pretvorio u vrlo lijepo iskustvo.

Hvala neposrednom voditelju dr. sc. Robertu Belužiću na pomoći i vrlo opuštenom pristupu unatoč svim problemima tehničke prirode koji su ustrajano pratili naš rad. Zahvalna sam na ukazanom povjerenju i odličnoj radnoj atmosferi zbog koje sam još više zavoljela rad u znanosti.

Nadalje, zahvaljujem profesoru Nussbergeru što je omogućio da dio eksperimenata provedem u njegovom laboratoriju na Institutu za biomaterijale i biomolekulske sustave u Stuttgartu. Izuzetno sam zahvalna na ukazanoj prilici i angažmanu koji je bio potreban da bi se to dogodilo.

Također, zahvaljujem doc. dr. sc. Morani Dulić na strpljenju i vremenu uloženom u čitanje i ispravljanje ovoga rada.

Želim zahvaliti svim svojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene i pružali mi podršku, pogotovo u razdobljima kada ni sama nisam bila sigurna u sebe, te su zaslužni što ću studentske dane pamtiti po bezbrojnim lijepim trenucima, kavama i jambovima.

Za kraj, zahvaljujem svojim roditeljima i bratu, koji su omogućili sve što imam i koji su zaslužni za svaki moj uspjeh. Hvala vam na strpljenju i volji da stojite iza mene tijekom svih ovih godina.

Sadržaj

SAŽETAK	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Rak debelog crijeva.....	3
2.2. Mehanizmi nastajanja raka debelog crijeva	3
2.2.1. <i>Tumori silaznog debelog crijeva i rektuma</i>	<i>4</i>
2.2.2. <i>Tumori uzlaznog debelog crijeva.....</i>	<i>6</i>
2.3. Modeli u istraživanjima raka debelog crijeva.....	7
2.3.1. <i>Kemijski inducirani modeli.....</i>	<i>7</i>
2.3.2. <i>In vivo transplantanti</i>	<i>8</i>
2.3.3. <i>Genetički modificirani miševi.....</i>	<i>10</i>
2.4. Irinotekan.....	12
2.5. Mehanizam djelovanja irinotekana	12
2.6. Biotransformacija irinotekana	15
2.6.1. <i>Karboksilesteraze.....</i>	<i>16</i>
2.6.2. <i>Citokrom P450.....</i>	<i>16</i>
2.6.3. <i>UDP-glukuroniltransferaze.....</i>	<i>16</i>
2.6.4. <i>β-glukuronidaze</i>	<i>17</i>
2.7. Primjena irinotekana	17
2.8. Kanabinoidi.....	18
2.9. Djelovanje kanabinoida u organizmu.....	19
2.9.1. <i>Tetrahidrokanabinol i kanabidiol u tretmanu nuspojava kemoterapije.....</i>	<i>19</i>
2.9.2. <i>Antitumorska djelovanja tetrahidrokanabinola i kanabidiola.....</i>	<i>21</i>
2.10. Kanabinoidi u tretmanu raka debelog crijeva	22
2.11. Interakcije irinotekana i Δ-9-tetrahidrokanabinola u tretmanu raka debelog crijeva	24
2.12. UDP-glukuroniltransferaze	26
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	28
3.1. Materijali.....	28
3.1.1. <i>Kemikalije.....</i>	<i>28</i>
3.1.2. <i>Komercijalni kompleti.....</i>	<i>29</i>
3.1.3. <i>Protutijela.....</i>	<i>29</i>

3.1.4. Uređaji i dodatna oprema	29
3.2. Eksperimenti na životinjama	30
3.3. Mjerenje ekspresije enzima UGT1A1 Western blot analizom.....	31
3.4. Mjerenje aktivnosti farmakološki relevantnih izoenzima UGT korištenjem <i>UGT Assay</i> komercijalnog kompleta	33
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	38
4.1. Ekspresija enzima UGT1A1	38
4.2. Relativna aktivnost izoenzima UGT.....	45
§ 5. ZAKLJUČAK.....	56
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	57
§ 7. DODATAK	XV
§ 8. ŽIVOTOPIS	XXII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Utjecaj istodobne primjene Δ -9-tetrahidrokanabinola i irinotekana na ekspresiju i aktivnost UDP-glukuronil-transferaza u jetri miševa sa singeničnim tumorom debelog crijeva

Marija Bartolić

Rak debelog crijeva jedno je od najučestalijih malignih oboljenja u svijetu i Hrvatskoj. U tretiranju ove bolesti najčešće se koristi irinotekan, no njegova primjena često uzrokuje nuspojave poput povraćanja i dijareje. Za ublažavanje navedenih tegoba sve češće se propisuje medicinski kanabis, no brojni pacijenti posežu za ilegalnim preparatima koji sadrže visoki udio psihoaktivnog spoja Δ -9-tetrahidrokanabinola (THC). S ciljem da se ispita održivost pretpostavke da istovremeno unošenje visokih koncentracija THC-a i irinotekana može dovesti do neželjenih međudjelovanja u ovom radu određena je ekspresija uridin-5'-difosfoglukuroniltransferaze 1A1 (UGT) i aktivnost izoenzima u uzorcima jetri miševa sa singeničnim tumorom debelog crijeva. Razina ekspresije naizgled ne varira između tretmana, no zbog previsokog pozadinskog signala vrijednosti nisu kvantificirane. Usporedba aktivnosti izoenzima između tretmana pokazala je da je u periodu od 7 dana aktivnost enzima u uzorcima tretiranim kombinacijom irinotekana i THC-a bila najniža što sugerira na postojanje interakcija na nivou metabolizma testiranih spojeva.

(75 stranica, 25 slika, 6 tablica, 67 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: aktivnost enzima, glukuronidacija, irinotekan, tetrahidrokanabinol, tumori

Mentor: dr. sc. Suzana Žunec, v. zn. sur.

Neposredni voditelj: dr. sc. Robert Belužić, zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 24. veljače 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Effect of concomitant use of Δ -9-tetrahydrocannabinol and irinotecan on the expression and activity of UDP-glucuronyl transferase in the liver of mice with syngeneic colon tumor

Marija Bartolić

Colon cancer is one of the most common malignancies in Croatia and worldwide. Irinotecan is most commonly used to treat this disease, but its use often causes side effects such as vomiting and diarrhea. Medical cannabis is increasingly being prescribed to alleviate these problems, but many patients are resorting to illegal preparations that contain a high proportion of the psychoactive compound Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC). In order to examine the assumption that the concomitant administration of high concentrations of THC and irinotecan may lead to adverse interactions, this study determined the expression of uridine-5'-diphosphoglucuronyltransferase 1A1 (UGT) and the activity of isoenzyme in liver samples of mice with syngeneic tumor. The level of expression did not seem to vary between treatments, but due to a high background signal, the values were not quantified. Comparison of isoenzyme activity between treatments showed that over a period of 7 days enzyme activity was lowest in samples treated with a combination of irinotecan and THC, suggesting the existence of interactions at the metabolic level of the tested compounds.

(75 pages, 25 figures, 6 tables, 67 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: enzyme activity, irinotecan, glucuronidation, tetrahydrocannabinol, tumors

Mentor: Dr. Suzana Žunec, Research Associate

Assistant mentor: Dr. Robert Belužić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: February 24th, 2021

§ 1. UVOD

Rak debelog crijeva jedno je od najučestalijih malignih oboljenja u svijetu, treće najčešće kod muškaraca i drugo najčešće kod žena, a isto vrijedi i za statistiku RH.^{1,2} Jedan od najčešće primjenjivanih citostatika za liječenje uznapredovalog karcinoma debelog crijeva je irinotekan. Opće je poznata činjenica da primjena kemoterapije izaziva niz nuspojava, poput CINV (engl. *chemotherapy induced nausea and vomiting*)³, zbog čega oboljeli nerijetko uzimaju neregistrirane pripravke kanabisa koji mogu sadržavati nekoliko puta veću količinu glavnog psihoaktivnog sastojka Δ -9-tetrahidrokanabinola (THC) od medicinskog kanabisa.⁴ Preliminarna ispitivanja utjecaja THC-a na toksičnost irinotekana u okviru pilot-studije na zdravim štakorima koristeći dozu THC-a usporedivu s onom koja je pronađena u ilegalnim pripravcima kanabisa, ukazala su na značajno sinergističko pojačanje toksičnosti irinotekana uzrokovano istovremenom primjenom THC-a te je uočeno povećano izlučivanje metabolita THC-COOH u urinu štakora koji su tretirani kombinacijom THC-a i irinotekana u usporedbi sa štakorima tretiranim samo THC-om.^{5,6,7} Premda je eliminacija urinom manje zastupljena i u slučaju irinotekana (20 %) i THC-a (20-35 %), glavni metaboliti tih spojeva pronađeni u urinu su kiseli glukuronidi.⁸ Zanimljivo je da glukuronidacija irinotekana i THC-a u jetri ovisi o dva ista enzima, uridin-difosfat-glukuronil-transferazama UGT1A1 i UGT1A9.⁹ Međutim, do sada nijedna studija nije istraživala postoji li kompeticija između spomenutih spojeva za iste enzime. Da bi se ispitala održivost pretpostavke da istovremeno unošenje visokih koncentracija THC-a i irinotekana može dovesti do neželjenih međudjelovanja, provedene su analize u ciljnim tkivima miševa kojima su injicirane tumorske stanice radi indukcije singeničnog tumora crijeva, a potom su tretirani irinotekanom (dvije jednokratne primjene intraperitonealno; 60 mg kg⁻¹), THC-om (svakodnevna primjena per os; 7 mg kg⁻¹) i njihovom kombinacijom. Eksperimenti su provedeni u skladu s nacionalnim i međunarodnim zakonima o dobrobiti životinja za pokuse. Životinje su žrtvovane u vremenskim intervalima od 4 i 24 sata te 7 dana nakon prve primjene irinotekana te su uzorkovana ciljana tkiva/organi (jetra) u kojima su potom analizirane:

a) promjene u razini ekspresije proteina UGT1A1 Western-blot analizom, korištenjem poliklonskog protutijela specifičnog za spomenuti protein,

b) aktivnosti farmakološki relevantnih UGT izoenzima korištenjem komercijalnog kompleta i mjerenjem na čitaču mikrotitarskih pločica.

Koristeći opisani eksperimentalni model moguće je utvrditi utječe li THC na toksičnost irinotekana i time na antitumorsko djelovanje tog citostatika.

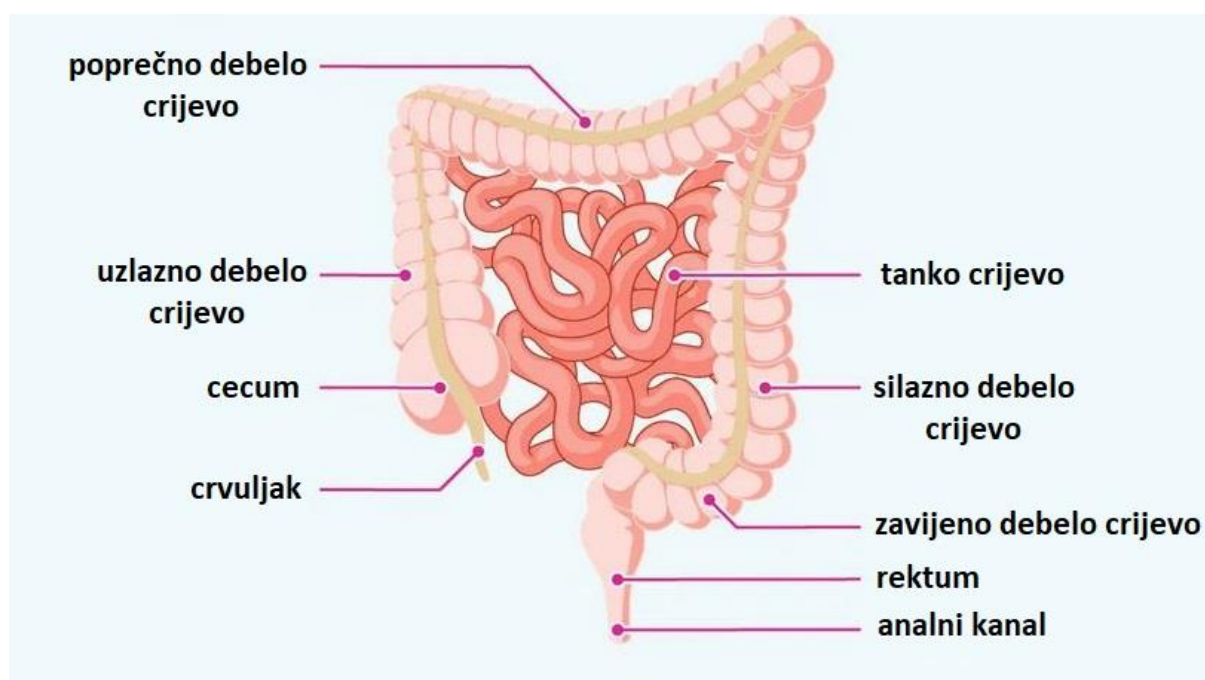
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Rak debelog crijeva

Rak debelog crijeva (engl. *colorectal cancer*, CRC) jedno je od najučestalijih tumorskih oboljenja u svijetu, treće najčešće kod muškaraca te drugo najčešće kod žena, a isto vrijedi i za statistiku RH.^{1,2} Pozitivna korelacija između učestalosti pojave raka debelog crijeva i *Human Development Index*-a (HDI) sugerira da uzroci bolesti leže, između ostalog, u načinu života industrijaliziranog društva, odnosno lošijoj prehrani i manjku fizičke aktivnosti. Prehrana karakteristična za razvijenije i bogatije zemlje, koja se sastoji od unosa velikih količina crvenog i obrađenog mesa te rafiniranih šećera povezuje se s povećanim rizikom oboljenja od raka debelog crijeva. Također, pretilost i dijabetes tipa II potvrđeni su kao rizični faktori za razvoj ove vrste raka.¹

2.2. Mehanizmi nastajanja raka debelog crijeva

Veliki napredak u shvaćanju molekularne pozadine nastanka raka debelog crijeva predstavio je „Vogelsteinov model“.¹⁰ U svom istraživanju, Vogelstein i Fearon navode četiri ključne stavke za razvoj ove bolesti: (1) aktivacija protoonkogeni te inaktivacija tumor supresorskih gena kao posljedice mutacija, (2) za nastanak malignog tumora potrebne su mutacije barem četiri do pet gena (*APC*, *K-Ras*, *DCC*, *TP53* geni),¹¹ dok taj broj može biti manji za uspješan nastanak benigne tvorbe, (3) sveukupna akumulacija promjena (mutacija) igra veću ulogu u razvoju tumora od određenog poretka kojim će se te mutacije odviti i (4) neki tumor supresorski geni se ne ponašaju „recesivno“ na staničnoj razini (suprotno Knudsonovoj pretpostavci),¹² odnosno ne zahtijevaju inaktivaciju oba alela kako bi došlo do poremećaja u radu proteina.¹⁰ Ovisno o tome koji molekulski putevi u organizmu su narušeni, tumori će se morfološki razlikovati, kao što je vidljivo u slučaju tumora uzlaznog i silaznog debelog crijeva (prikazani na slici 1).¹¹



Slika 1. Tanko i debelo crijevo čovjeka (preuzeto i prilagođeno iz reference 13).

2.2.1. Tumori silaznog debelog crijeva i rektuma

Mutacije tumor supresorskog gena *APC* (engl. *adenomatous polyposis coli*) uzrok su nasljedne adenomatozne polipoze (engl. *familial adenomatous polyposis*, FAP) kao i raka silaznog debelog crijeva i rektuma.¹¹ Osobe koje boluju od nasljedne adenomatozne polipoze razvijaju benigne polipe u debelom crijevu već u ranoj dobi, a ukoliko se debelo crijevo ne ukloni, ti polipi postaju maligni. Kod klasičnog FAP-a prosječna oboljela osoba razvit će tumor debelog crijeva oko 39. godine života.¹⁴

Protein APC dio je Wnt signalnog puta gdje sudjeluje u formiranju multiproteinskog kompleksa kojime se regulira razina β -katenina u citoplazmi. Nastali multiproteinski kompleks inhibira proteolizu citosolnog β -katenina u proteasomu, što dovodi do akumulacije β -katenina u citoplazmi.¹⁵ β -katenin vrši funkciju transkripcijskog aktivatora različitih gena čiji proteini uglavnom stimuliraju proliferaciju stanica, ali i linkera između membrane i citoskeleta.¹¹ U odsustvu Wnt liganda, β -katenin se nalazi u kompleksu s APC proteinom i Axinom, što omogućava GSK3 kinazi da fosforilira β -katenin i označi ga za razgradnju. Kada molekula Wnt

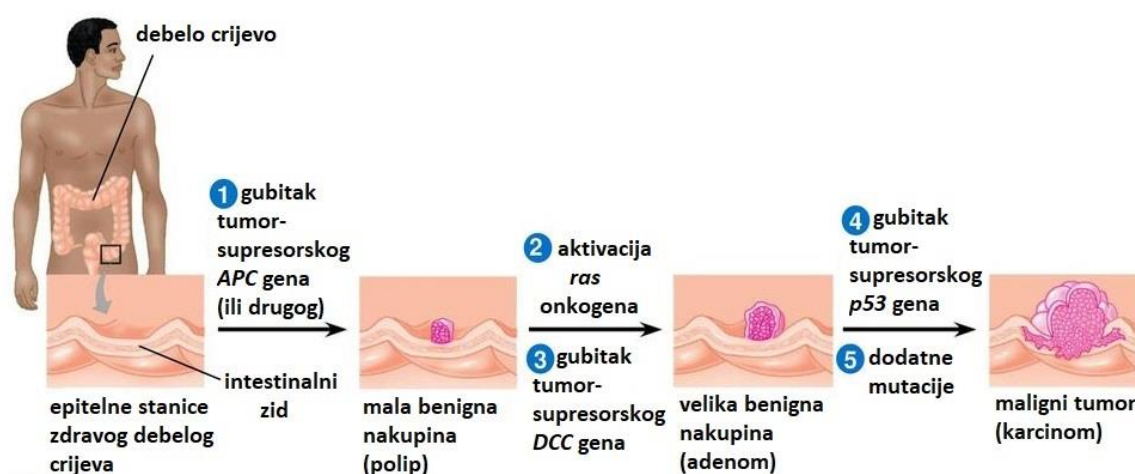
aktivira signalni put, Dsh (*Dishevelled* protein) i Lrp (membranski protein) interagiraju s GSK3, APC i Axinom i tako sprečavaju nastanak proteinskog kompleksa i inaktivacije β -katenina.¹⁵ Mutirani APC gubi sposobnost vezanja β -katenina ili Axina što onemogućava nastanak kompleksa i reguliranu razgradnju β -katenina koji se akumulira i stimulira staničnu proliferaciju i nastanak polipa.¹¹

Mutacije *K-Ras* protoonkogeni u stanicama polipa dovode do razvoja adenoma odnosno benignog tumora.¹⁵ *K-Ras* je mali G-protein (GTPaza) koji sudjeluje u signalnom slijedu kinaznih receptora koje aktiviraju faktori rasta. Aktivacija receptora uzrokuje kaskadu kinaza, uključujući MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) i PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaze). Mutirani *K-Ras* ne hidrolizira GTP, zbog čega je konstantno u aktivnoj formi i održava kaskadu kinaza i bez aktivacije kinaznog receptora.¹⁵ Proteini koje aktiviraju kinaze nizvodno od *K-Rasa* u signalnom slijedu, poput protein-kinaze B (Akt), stimuliraju progresiju kroz stanični ciklus, stanični rast i preživljavanje. Aktivnost Akt kinaze kontrolira PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) fosfataza, tumor supresora čija funkcija je utišana u 15-20% tumora debelog crijeva.¹¹

Transforming growth factor β (TGF β) aktivira TGF β receptore (serin/treonin kinazni receptori) u čijem signalnom slijedu dolazi do fosforilacije Smad proteina (R-Smad, co-Smad i I-Smad). R-Smad (Smad2 ili Smad3) proteine čine dvije domene, MH1 i MH2, povezane linker regijom. Kada su u inaktivnoj, nefosforiliranoj formi, NLS (*nuclear localization signal*) sekvenca je zamaskirana te su domene MH1 i MH2 povezane na način da ne mogu vezati DNA ili co-Smad. Fosforilacija R-Smada uzrokuje razdvajanje MH1 i MH2 domene te izlaganje NLS sekvence, vezanje β importina na oslobođenu sekvencu i asocijaciju Smad 2 ili Smad 3 proteina s drugim Smad 2 ili Smad 3 proteinom i Smad 4 (co-Smad) proteinom. Nastali kompleks (Smad2/Smad2/Smad4 ili Smad3/Smad3/Smad4) translocira se u jezgru pomoću β -importina¹⁵ gdje zajedno s drugim transkripcijskim faktorima regulira transkripciju gena koji potiču diferencijaciju stanica ili apoptozu.¹¹ Rad I-Smad proteina induciran je aktivacijom TGF β receptora, a njihova uloga je zaustavljanje intracelularne signalizacije, odnosno deaktivacija receptora (negativni *feedback*).¹⁵ Delecije *Smad2* i *Smad4* gena (kromosom 18q) uočene su u 70% karcinoma debelog crijeva.

Kromosom 18q također nosi i tumor supresorski gen *DCC* (*deleted in colon cancer*) čija delecija odnosno inaktivacija sprječava njegovu proapoptotsku aktivnost.¹¹ U 75% slučajeva karcinoma debelog crijeva dolazi do mutacije *TP53* gena koji kodira multifunkcionalni p53

protein. Protein p53 igra važnu ulogu u G₁ (*checkpoint*) fazi staničnog ciklusa. Riječ je o proteinu koji je u normalnim uvjetima prisutan u jako niskim koncentracijama zbog konstantne razgradnje. Kada se stanica nađe pod stresom i dođe do oštećenja DNA, aktivira se ATM, serin-kinaza koja fosforilira i stabilizira p53, povećava se njegova koncentracija i aktivira ekspresija proteina koji zaustavljaju G₁ fazu staničnog ciklusa što daje vremena za popravak DNA ili uzrokuju apoptozu. U slučaju mutacije *TP53* gena, G₁ *checkpoint* zakazuje, oštećena DNA se replicira te se greška prenosi na stanice kćeri.¹⁵ Na slici 2 prikazan je razvoj karcinoma debelog crijeva te najvažnije mutacije koje se odvijaju u određenim stadijima razvoja.



Slika 2. Shematski prikaz razvoja karcinoma debelog crijeva i popratnih mutacija (preuzeto i prilagođeno iz reference 16).

2.2.2. Tumori uzlaznog debelog crijeva

Nastanak tumora u uzlaznom debelom crijevu povezuje se s mikrosatelitnom nestabilnošću (engl. *microsatellite instability*, MSI). MSI je posljedica inaktivacije mehanizma popravka DNA, tzv. DNA *mismatch repair* (MMR). Gubitak MMR sposobnosti uzrokuje akumulaciju promjena u kratkim tandemskim ponavljajućim sekvencama unutar genoma (mikrosateliti). Mutacije jednog od dva najvažnijih MMR gena, *MSH2* i *MLH1*, ključne su za nastanak Sindroma Lynch, odnosno nasljednog ne-polipoznog karcinoma debelog crijeva (engl. *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*, HNPCC). Također, u velikom broju slučajeva kod HNPCC uočena je i pojačana Wnt signalizacija, no za razliku od tumora uzlaznog debelog

crijeva, mutacije *APC* gena su ovdje rijetkost, dok su mutacije β -katenina uobičajene.¹¹ Sporadični karcinomi uzlaznog debelog crijeva također su uzrokovani gubitkom MMR sposobnosti. Kod sporadičnih tumora MSI je rezultat hipermetilacije promotora MMR gena, posebice *MLH1*. Hipermetilacija *APC* promotora (a ne mutacija *APC* gena) te mutacije nekih drugih aktera Wnt signalnog puta uzrok su pojačane Wnt signalizacije.¹¹ Također, učestala je i mutacija *BRAF* gena¹¹ koji kodira B-Raf protein, serin/treonin protein-kinazu koja fosforilira i aktivira MEK kinazu koja zatim pokreće kaskadu MAP kinaza.¹⁵ MSI tumori odstupaju od Vogelsteinovog modela jer su mutacije *K-Ras* i *TP53* gena vrlo rijetke.¹⁵

2.3. Modeli u istraživanjima raka debelog crijeva

Jedan od najvažnijih modela u istraživanjima raka je miš. Prednosti miša su njegova relativna fiziološka sličnost s čovjekom, mogućnost genetskih manipulacija i inženjeringa te lakoća razmnožavanja i uzgoja. Nedostaci miševa su kratak životni vijek (u usporedbi s čovjekom), ubrzani metabolizam, kao i razlike u prevalenciji i nastanku tumora.¹⁷ Unatoč tome, brojnost različitih vrsta mišjih modela zadnjih godina eksponencijalno raste¹⁷ u svrhu istraživanja nastanka i razvoja različitih vrsta tumora.¹⁸

2.3.1. Kemijski inducirani modeli

Najčešće korišteni karcinogeni za indukciju raka tankog i debelog crijeva kod miševa su 1,2-dimetilhidrazin (DMH) i njegov metabolit azoksimetan (AOM).¹¹ DMH i AOM, metaboliziraju se do metilazoksiformaldehida, alkilirajućeg agensa koji se veže na gvanin i timin u DNA.¹⁹ Navedeni spojevi u glavni slučajevi uzrokuju mutacije u genu za β -katenin (*Ctnnb1*). Do mutacije dolazi na N-terminalnom slijedu β -katenina, koji postaje stabilan, ne tvori kompleks s APC-om i Axinom te se ne razgrađuje već ulazi u jezgru gdje potiče transkripciju gena. Rezultat mutacije je pojačana signalizacija Wnt signalnog slijeda.¹¹ Tumori se najčešće javljaju u tankom, a ne debelom crijevu, a još jedan nedostatak je što latentni period u kojem dolazi do formacije tumora može trajati do 30 tjedana.²¹ Latentni period može se smanjiti primjenom AOM zajedno s natrijevim dekstran-sulfatom (DSS).¹⁹ DSS uništava epitel debelog crijeva, što uzrokuje upale te može dovesti do akutnog ili kroničnog kolitisa. Primjena DSS-a u kombinaciji s karcinogenima omogućava proučavanje poveznice između raka debelog crijeva i upala.¹⁹

Tumori tankog i debelog crijeva inducirati se mogu i primjenom *N*-metil-*N*-nitrozouree (MNU) i *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrozogvanidina (MNNG), topičkih alkilirajućih karcinogena. Oralnom primjenom uzrokuju tumore u želucu, tankom i debelom crijevu, bubrezima, koži, plućima i timusu. Primjena MNU kroz rektum uzrokuje nastanak DNA adukata i dovodi do pojave ACF-a (*aberrant crypt foci*), dok rektalna primjena MNNG uzrokuje adenome i karcinome debelog crijeva. Kod 15-30% tumora debelog crijeva induciranih pomoću MNU ili MNNG u štakorima uočene su mutacije *K-Ras* gena.¹⁸ Heterociklički aromatski amini (HAA) nastaju u reakcijama slobodnih aminokiselina, šećera i kreatina pri visokim temperaturama prilikom termičke obrade mesa i ribe, a najbrojniji među njima su 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridin (PhIP) i 2-amino-9H-pirido[2,3-*b*]indol.¹⁹ PhIP je mutagen koji uzrokuje nastanak raka debelog crijeva kod štakora, ali ne i kod miševa – kod miševa ne inducira nastanak tumora debelog crijeva, već ACF.¹⁸ Kancerogeneza kod miševa moguća je primjenom kombinacije PhIP i DSS-a. PhIP se metabolizira u jetri do aktiviranih estera koji mogu raditi adukte s DNA.¹⁹ Kod tumora uzrokovanih PhIP-om uobičajene su mutacije *Cnntb1* i *APC* gena, dok su mutacije *K-Ras* i *TP53* gena rijetke.¹⁸ Veliki nedostatak kemijske indukcije tumora je niska stopa nastanka i razvoja tumora, no odnosi između izlaganja kancerogenim tvarima i razvoja tumora su dobro proučeni¹⁸ tako da ovaj model i dalje ima široku primjenu. Iako su rijetko invazivni i gotovo da ne metastaziraju, većina modela dobro prikazuje napredak od ACF-a do adenoma i karcinoma debelog crijeva.¹⁹

2.3.2. *In vivo* transplantanti

Stanične linije imaju važnu ulogu u proučavanju signalnih puteva kod tumora. Dobivaju se digestijom primarnih tumora na pojedinačne stanice i njihovim uzgojem u Petrijevim posudama. Predstavljaju klonalnu populaciju tumorskih stanica uzgojenih na hranjivom mediju te se stoga razlikuju od originalnog tumora iz kojeg su proizašle.²⁰ Stanične linije dobro prikazuju ponašanje tumorskih stanica te pružaju uvid u različite aspekte razvoja tumora kao što su agregacija i migracija stanica, formiranje kolonija, odgovor na tretman lijekovima, produkcija glasničkih molekula u međustaničnoj komunikaciji, razina oksidativnog stresa i analiza staničnog ciklusa. Glavni nedostatak ovakvog *in vitro* modela je nemogućnost praćenja interakcija između tumorskih stanica i njihove okoline u živom organizmu.¹⁸ Stanične linije tumora debelog crijeva, odnosno CRC stanične linije razlikuju se u mutacijama i primjeni. Primjeri nekih od njih su SW480, koje se koriste u identifikaciji i proučavanju meta

potencijalnih lijekova, CR4 i LS174 koje se u evaluaciji novih strategija liječenja te COLO 205 koje se mogu koristiti za proučavanje metastaza, staničnih migracija i reakcije tumora na potencijalni lijek.²¹

In vivo proučavanja nastanka i razvoja humanih tumora postala su moguća otkrićem atimičnog (*nude*) miša, koji zbog poremećaja u stvaranju T limfocita ne odbija strane stanice/tkiva.¹⁷ Subkutana injekcija humanih tumorskih (CRC) stanica u ovakvog miša rezultira razvojem tumora na mjestu gdje su stanice injektirane. Osim *nude* miša često se koriste i SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*) miševi koji ne proizvode ni B ni T limfocite, kao i NOD/SCID (engl. *non obese diabetic*) miševi koji uz to manjkaju i NK stanice (*natural killer cells*). Ovaj model nije tehnički zahtjevan, rast tumora može se pratiti golim okom, a latentni period uglavnom traje do nekoliko tjedana.²⁰ Ipak, stanične linije prilagodbom na rast na plastici postaju genetički homogenije¹⁷ te nastali tumor ne odražava genetičku raznolikost uočenu kod tumora razvijenih unutar čovjeka. Također, veliki nedostatak su upravo imunodeficientni domaćini – ovakav model ne daje uvid u ulogu imunološkog sustava tijekom karcinogeneze. Ovaj problem može se zaobići injekcijom mišjih tumorskih staničnih linija u singeničnog miša gdje će se tumor razviti u imunokompetentnoj okolini te je moguće praćenje utjecaja imunološkog sustava na tumor. Ipak, glavni nedostaci su nedostupnost različitih mišjih tumorskih staničnih linija, kao i to da se te linije ipak razlikuju od ljudskih.²⁰ Okolina ksenografta također je dosta različita od prave jer se CRC stanične linije injektiraju subkutano odnosno potkožno, što se jako razlikuje od unutrašnjosti crijeva. Tumori koji se razvijaju iz CRC staničnih linija ne opisuju dobro histološke značajke humanog tumora. Taj problem može se izbjeći pribjegavanjem drugoj vrsti ksenografta, a to je ksenotransplantacija organoida koji se uzgajaju kao trodimenzionalna kultura od kirurški odstranjenog tumorskog tkiva ili genetičke manipulacije normalnog tkiva crijeva.²⁰

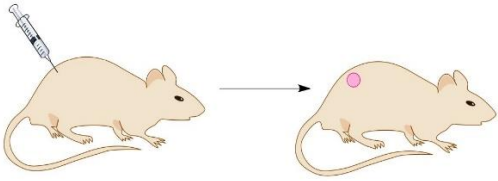
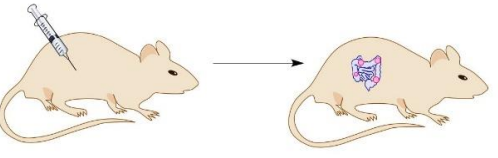
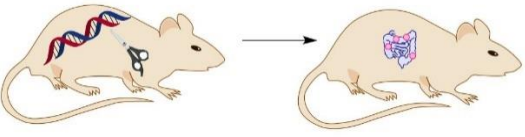
Model *Patient-derived xenografts*, PDX, podrazumijeva implantaciju kirurški odstranjenog tumorskog tkiva iz pacijenta u imunodeficientnog miša; kada tumor naraste, kirurški se odstrani i transplantira u drugog miša te se postupak ponavlja. Kod PDX modela stroma se razvija zajedno s tumorskim tkivom što omogućava nastanak mikrookoline slične onoj u kojoj se tumor nalazio kod pacijenta.²⁰ Sastavnice humane strome (fibroblasti, krvne žile) relativno brzo zamjenjuju se mišjim, no mišje stanice adaptiraju neke humane značajke, a građa tumora u većini slučajeva ostaje nepromijenjena.¹⁹ Modeli PDX bolje zadržavaju histološke karakteristike i genetsku heterogenost originalnog tumora.¹⁷ Mutacije *K-Ras* i

PIK3CA gena, koje su važne u razvoju tumora debelog crijeva, konzistentne su kroz niz transplantacija tumora. Modeli PDX važnu primjenu imaju u kreiranju personaliziranog liječničkog tretmana. Odstranjeni tumor implantira se u miša te, kada naraste, u sljedećeg miša te se postupak ponavlja, a svaki od njih tretira se različitim antitumorskim agensom kako bi se odredio odgovarajući tretman za tog pacijenta.²⁰ Kako bi se riješio problem okoline ksenografta i izostanka metastaza kod subkutano injektiranih staničnih linija razvijen je ortotopni model gdje se stanične linije transplantiraju direktno u odgovarajuću anatomsku poziciju tumora od interesa. Ovaj model jako dobro prikazuje kako se ponaša tumorsko tkivo i njegova okolina tijekom razvoja bolesti kod ljudi, ali metastaze, iako se javljaju, neće se nužno pojaviti na mjestu od interesa ili je potreban dug vremenski period da se to dogodi.¹⁸

2.3.3. Genetički modificirani miševi

Razvoj genetičkog inženjerstva doveo je do stvaranja genetički modificiranih miševi (engl. *genetically engineered mouse models*, GEMM) koji omogućavaju *in vivo* praćenje nastanka i razvoja adenoma ili karcinoma u imunokompetentnoj mikrookolini.²⁰ Prvi genetički modificirani miš koji služi kao CRC model, *APC^{Min}*, dobiven je mutacijom zametnih stanica miša (*germline* mutacija) korištenjem mutagena *N*-etil-*N*-nitrozoureje (Enu) nakon čega je uslijedilo skeniranje i potraga za odgovarajućim mutiranim fenotipom. Uočena je mutacija koja izaziva višestruke adenome u crijevima koji napreduju u adenokarcinome kako miš stari.²² Mutacija se odvija na kodonu 380 *APC* gena te je sustavnim križanjem takvih miševa razvijen *Min* (*multiple intestinal neoplasia*) model miša koji vrlo dobro opisuje rane stadije FAP-a.¹⁹ Ipak, većina tumora kod *APC^{Min}* miševa su adenomi, a rijetko karcinomi; metastaze često izostaju, a kada se i pojave, zbog velike varijabilnosti smanjuju se šanse za reproducibilnost istog modela.¹⁸ Polipi se pretežno javljaju u tankom, a ne debelom crijevu.²⁰ Tumori kod ljudi su heterogeniji, čemu pridonose razlike u prehrani i mikrobiomu čovjeka i miša, ali i veća izloženost toksinima kod ljudi, manja genetička raznolikost GEMM-a zbog konstantnog parenja srodnika te činjenica da kod jedne GEMM vrste tumori potječu od iste mutacije. Prednosti GEMM-ova su dobar prikaz ranog stadija karcinogeneze, poznavanje mutacije koja uzrokuje tumor te *in situ* razvoj tumora u imunokompetentnoj sredini.¹⁸ U tablici 1 sumirane su prednosti i nedostaci svih prethodno navedenih mišjih modela u istraživanju raka debelog crijeva.

Tablica 1. Usporedba različitih mišjih modela u istraživanju raka debelog crijeva.

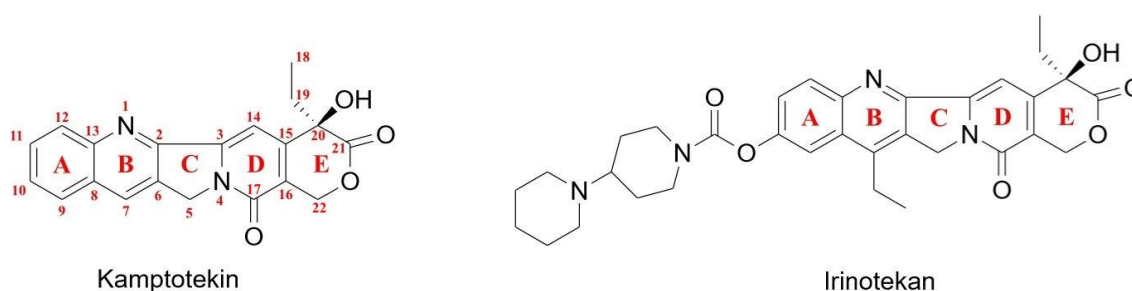
MODEL	PREDNOSTI	NEDOSTACI
<p>Kemijska indukcija tumora</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Jednostavna izvedba 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Niska stopa nastanka i razvoja tumora ✗ Nisu invazivni, nema metastaza
<p>Subkutani ksenografti</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Korištenje humanih staničnih linija ✓ Jednostavna aplikacija 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Nemogućnost praćenja imunološkog odgovora organizma na tumor (imunodeficijentni miš) ✗ Stanice tumora i stanice strome različitog podrijetla ✗ Stanične linije homogenije su od tumora koji se razvija u čovjeku ✗ Nema metastaza ✗ Mjesto gdje se tumor razvija nije njegova prirodna pozicija
<p>PDX</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Razvijeno tumorsko tkivo kirurški odstranjeno od pacijenta ✓ Zadržava se heterogenost originalnog tumora ✓ Proučavanje odgovarajućeg tretmana za pojedinačnog pacijenta 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Nemogućnost praćenja imunološkog odgovora organizma na tumor (imunodeficijentni miš) ✗ Mjesto gdje se tumor razvija nije njegova prirodna pozicija ✗ Nema metastaza
<p>Ortotopni ksenografti</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Korištenje humanih staničnih linija ✓ Tumor se razvija na odgovarajućoj anatomskoj poziciji ✓ Histološki sličniji humanom tumoru ✓ Potencijalne metastaze 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Nemogućnost praćenja imunološkog odgovora organizma na tumor (imunodeficijentni miš) ✗ Dug vremenski period potreban za nastanak metastaza, metastaze se često ne javljaju na mjestu od interesa
<p>Singenični miševi</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tumor se razvija u imunokompetentnoj okolini – praćenje imunološkog odgovora na tumor ✓ Tumorske stanice i stroma istog podrijetla 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Tumori slabo metastaziraju ✗ Razlike između mišjih i ljudskih tumorskih stanica
<p>GEMM</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Poznata je genetička mutacija koja je uzrokovala nastanak tumora ✓ Razvoj tumora <i>in situ</i> ✓ Tumor se razvija u imunokompetentnoj okolini -praćenje imunološkog odgovora na tumor ✓ Tumorske stanice i stroma istog podrijetla ✓ Dobar prikaz ranog stadija karcinogeneze 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Čest izostanak metastaza ✗ Genetički homogeniji tumori nego kod ljudi ✗ Djelomična replikacija morfolologije i fiziologije ljudskog tumora

2.4. Irinotekan

Šezdesetih godina prošlog stoljeća iz stabla *Camptotheca acuminata* izoliran je alkaloid kamptotekin (CPT) za koji je na temelju preliminarnih istraživanja pretpostavljeno da je odgovoran za antitumorska svojstva ekstrakta biljke.²³ U ranim kliničkim istraživanjima kamptotekin je ispitivan kao topljiva natrijeva sol te je ustanovljeno da je takav oblik vrlo toksičan, što je smanjilo interes za njegov daljnji razvoj.²⁴ Dvadesetak godina kasnije ustanovljeno je da snažna antitumorska svojstva kamptotekina proizlaze iz njegove sposobnosti da inhibira topoizomerazu I što dovodi do zastoja staničnog ciklusa i apoptoze.²⁵ Uz to, otkriće da je upravo topoizomeraza I prekomjerno eksprimirana kod nekih malignih oboljenja, među kojima je i humani adenokarcinom debelog crijeva, potaknulo je sintezu derivate kamptotekina, među kojima je i irinotekan.²⁴

2.5. Mehanizam djelovanja irinotekana

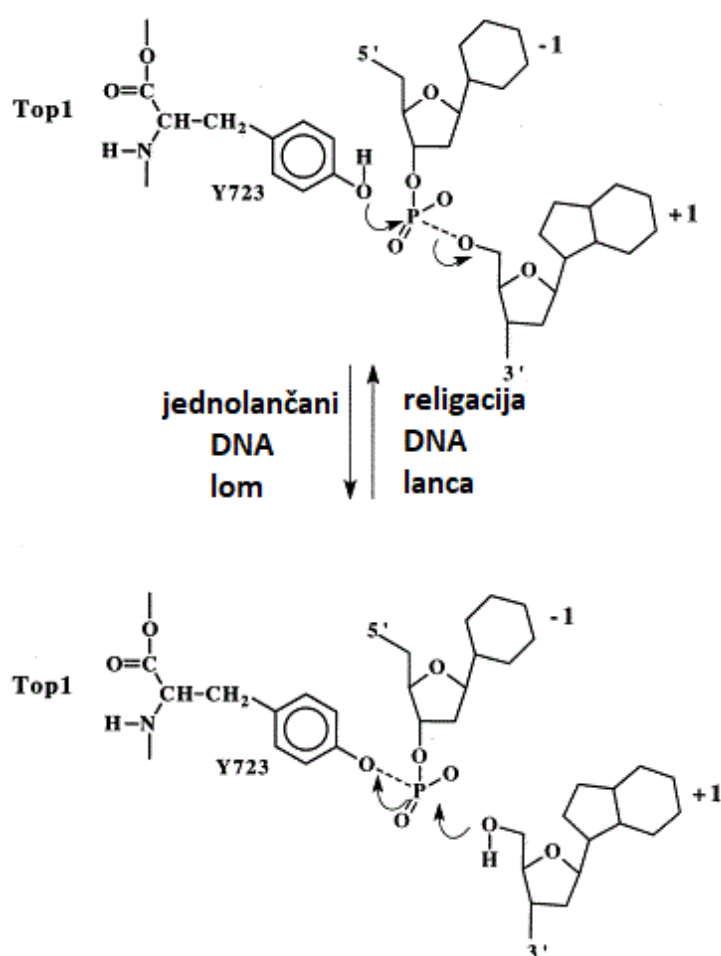
Irinotekan (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-karboniloksikamptotekin, CPT-11) je derivat kamptotekina koji se od njega razlikuje u dvije supstitucije vodikovih atoma: na poziciji 7 prstena B nalazi se etilna skupina, a na poziciji 10 prstena A je 1,4'-bipiperidinska skupina (prikazano na slici 3).



Slika 3. Struktura kamptotekina (lijevo) i njegovog derivata irinotekana (desno). Slika je izrađena pomoću *ChemDraw Direct-a*.²⁶

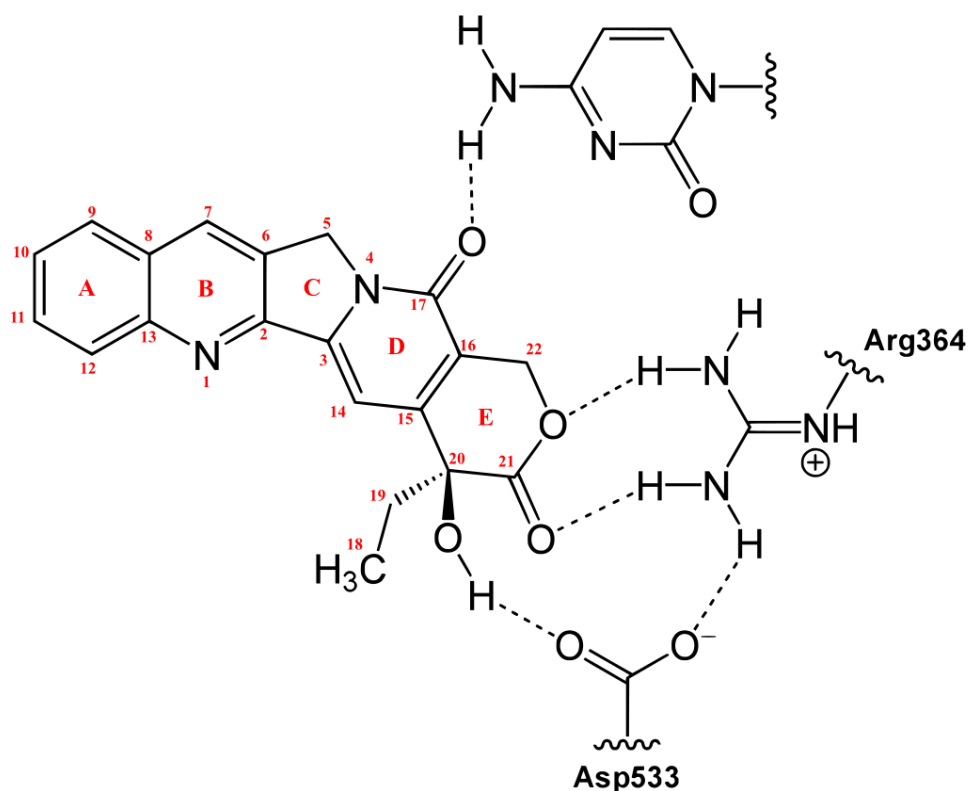
U kiselim uvjetima prevladava zatvorena forma laktonskog prstena (E) te je ta forma jedini aktivni oblik irinotekana. Upravo je taj prsten odgovoran za ostvarivanje interakcija s

topoizomerazom I i DNA te posljedičnom inhibicijom enzima.²⁴ Topoizomeraze tipa I relaksiraju DNA uvođenjem negativnih superzavoja. Kada se DNA veže u aktivno mjesto topoizomeraze tipa I, bočni ogranak tirozina nukleofilno napada i kida fosfodietersku vezu u DNA, pri čemu nastaje kovalentna veza između tirozina i fosfata, a oslobađa se 3'-OH skupina susjednog nukleotida – nastaje jednolančani lom. U sljedećem koraku topoizomeraza zauzima otvorenu konformaciju te omogućava netaknutom lancu DNA da se provuče kroz nastali urez. Nakon što enzim ponovno zauzme zatvorenu konformaciju, slobodna 3'-OH skupina napada fosfat, narušava se kovalentna veza između tirozina i DNA i pokidani lanac se ligira.²⁷ Mehanizam je prikazan na slici 4.



Slika 4. Mehanizam djelovanja topoizomeraza tipa I. (preuzeto i prilagođeno iz reference 28)

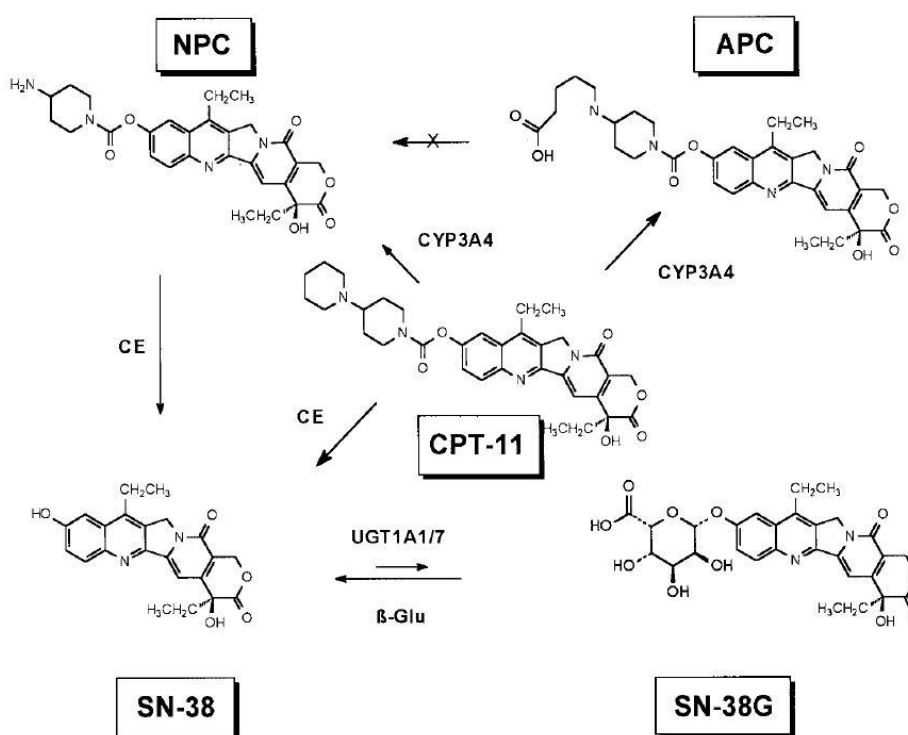
Irinotekan djeluje na isti način kao i kamptotekin, veže se na kompleks DNA i topoizomeraze I stvarajući stabilan ternarni kompleks, što dovodi do zastoja replikacijskih rašlji.²⁹ Ključnu ulogu u stabilizaciji kompleksa DNA-topoizomeraza I imaju 20(*S*)-hidroksi skupina prstena E, piridonska svojstva prstena D, laktonska svojstva prstena E i planarnost sveukupnog sustava. Promjene na prstenima D ili E stoga uvelike utječu na sposobnost kamptotekina da stabilizira kompleks, dok modifikacije pozicija 9,10 i 11 na prstenu A, kao i pozicije 7 prstena B nemaju negativan utjecaj na svojstva spoja ili ta svojstva poboljšavaju (kao što je to slučaj kod irinotekana). Karbonilni kisik na poziciji 17 ostvaruje vodikovu vezu s NH₂ skupinom pirimidinskog prstena citozina koji se nalazi na +1 poziciji (u odnosu na mjesto nastanka loma u lancu DNA). Bočni ogranci Asp533 i Arg364 enzima stvaraju vodikove veze s kisikovim atomima prstena E. Navedene interakcije prikazane su na slici 5. Vrlo važna je i konfiguracija kiralnog C-20 atoma. Kamptotekin i njegovi derivati aktivni su samo ako je taj ugljikov atom *S* konfiguracije. Razlog tome su steričke smetnje između etilne skupine na atomu C-20 i nukleotida na poziciji +2 kada je C-20 atom *R* konfiguracije (nije prikazano na slici).³⁰



Slika 5. Interakcije kamptotekina s bočnim ograncima topoizomeraze I i okosnicom DNA (preuzeto i prilagođeno iz reference 31).

2.6. Biotransformacija irinotekana

I kod ljudi i kod životinja irinotekan se u organizmu metabolizira u jetri, a njegovi metaboliti se uvelike izlučuju putem žuči. U tim procesima sudjeluju brojni enzimi, među kojima su najznačajniji karboksilesteraze, enzimi citokroma P450 (CYP450), UDP-glukuroniltransferaze (UGT), i β -glukuronidaze.⁸ Na slici 6 prikazana je biotransformacija irinotekana posredovana navedenim enzimima.



Slika 6. Shematski prikaz metabolizma irinotekana (CPT-11) (preuzeto iz reference 8). SN-38 (7-etil-10-hidroksikamptotekin) - aktivni metabolit; SN-38G - glukuronidni oblik SN-38; APC (7-etil-10-[4-N-(5-aminopentanoična kiselina)-1-piperidino] karboniloksikamptotecin) i NPC (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-amino]-karboniloksikamptotecin) - neaktivni metaboliti; CE - karboksilesteraze, CYP3A4 – enzim iz obitelji citokrom P450, UGT1A1/7 - izoforme UDP-glukuroniltransferaza; β -Glu - β -glukuronidaza.

2.6.1. Karboksilesteraze

Karboksilesteraze (EC 3.1.1.1) u jetri hidroliziraju estersku vezu na poziciji C-10 A prstena irinotekana pri čemu nastaje odgovarajuća karboksilna kiselina i SN-38 (7-etil-10-hidroksikamptotekin), najtoksičniji metabolit irinotekana. Iz tog razloga irinotekan se često naziva predlijekom (engl. *prodrug*) jer je SN-38 100 do 1000 puta citotoksičniji od njega (*in vitro*).²⁴

2.6.2. Citokrom P450

Citokrom P450 3A4 (CYP3A4; EC 1.14.13.97) je monooksigenaza koja oksidira piperidinsku skupinu na C-10 atomu irinotekana pri čemu nastaje APC (7-etil-10-[4-N-(5-aminopentanska kiselina)-1-piperidino]karboniloksikamptotekin. Otcjepljenjem piperidino skupine APC-a nastaje NPC, koji djelovanjem karboksilesteraza daje SN-38. U usporedbi sa SN-38 i irinotekanom, APC pokazuje slabu antitumorsku aktivnost *in vitro*. Također, nastajanje APC i NPC u (humanom) tumoru debelog crijeva nije očekivano s obzirom na vrlo nisku razinu CYP3A u tim stanicama.⁸

2.6.3. UDP-glukuroniltransferaze

Uridin-5'-difosfo-glukuroniltransferaze (UDP-glukuronoziltransferaze, UGT; EC 2.4.1.17) sudjeluju u konverziji SN-38 u njegov neaktivni glukuronid, SN-38G. Enzim UGT1A1 smatra se glavnim odgovornim za glukuronidaciju SN-38, iako je ustanovljeno da izoforma 1A7 21 puta efikasnije konvertira SN-38 pri fiziološkom pH.⁸ Izoforma 1A1 posebno je zanimljiva jer je taj enzim zadužen za glukuronidaciju bilirubina te je poznato da smanjena ekspresija UGT1A1 gena uzrokuje Gilbertov sindrom³², bolest koja se očituje po povišenoj razini bilirubina u krvi (hiperbilirubinemija).³³ Do poremećaja ekspresije gena u ovom slučaju dolazi zbog polimorfizma UGT1A1 gena. Promotorska regija UGT1A1 gena sadrži TATA element koji se sastoji od pet do sedam „TA“ ponavljanja ([TA]_nTAA). Najučestaliji alel sadrži šest TA ponavljanja i smatra se divljim tipom, dok je alel sa sedam TA ponavljanja najučestalija varijanta (gen UGT1A1*28). Što je TA ponavljanja više, to je ekspresija UGT1A1 gena manja. Što je njegova ekspresija manja, akumulacija SN-38 naspram inaktivnog SN-38G je veća te se povećava toksičnost. Upravo je toksičnost limitirajući faktor u doziranju irinotekana. Iz tog

razloga razvijeni su testovi probira za otkrivanje pacijenata s UGT1A1*28 genom kako bi se njihova terapija mogla prilagoditi.³² Više o enzimima UGT opisano je u poglavlju 2.12.

2.6.4. β -glukuronidaze

Beta-glukuronidaze (EC 3.2.1.31) hidroliziraju inaktivni SN-38G natrag u aktivni SN-38. Gastrointestinalni mikroorganizmi, kao primjerice *Escherichia coli*, proizvode β -glukuronidaze koje mogu uzrokovati novu akumulaciju SN-38. Akumulacija SN-38 može se očitovati u oštećenjima sluznice crijeva budući da je SN-38 najtoksičniji metabolit irinotekana. Ustanovljena je pozitivna korelacija između histoloških oštećenja i aktivnosti β -glukuronidaza. U usporedbi s debelim crijevom, u tankom crijevu uočena su manja oštećenja, što se može povezati s manjom izloženosti tankog crijeva SN-38 zbog manje količine β -glukuronidaza.⁸

2.7. Primjena irinotekana

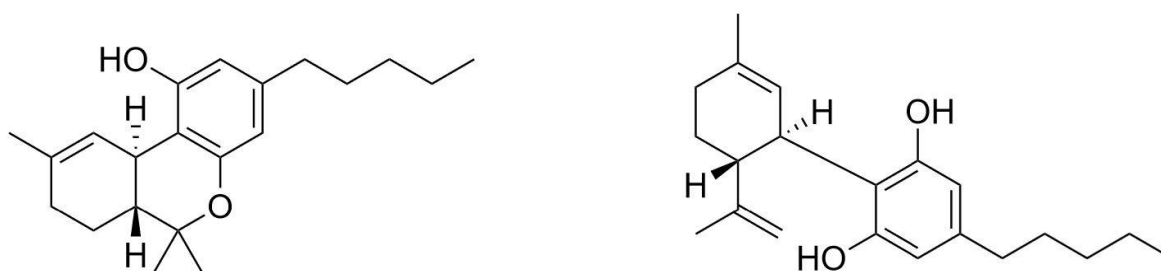
Prije izolacije kamptotekina i sinteze njegovih derivata, kao primarni citostatik u liječenju uznapredovalog raka debelog crijeva korišten je 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU je fluorinirani analog uracila koji inhibira timidilat-sintazu (TS), a pacijentima se obično daje u kombinaciji s leukovorinom (LV), biomodulatorom koji pojačava djelovanje 5-FU.³⁴ LV je prekursor 5,10-metilentetrahidrofolata (CH_2FH_4), kofaktora u pretvorbi dUMP u dTMP kataliziranoj timidilat-sintazom. U prisutnosti navedenog kofaktora FdUMP (fluorodeoksiuridin monofosfat) radi stabilan kovalentni ternarni kompleks TS:FdUMP: CH_2FH_4 što uzrokuje inaktivaciju sintaze.³⁵ Irinotekan se danas često koristi u kombinaciji s drugim kemoterapeutcima. Kombinacija irinotekana i 5-FU/LV pokazala se učinkovitijim tretmanom od samog 5-FU usporavanjem napretka bolesti te smanjenjem veličine tumora i produženjem životnog vijeka.³⁶ Posebno korisnim irinotekan se ispostavio kod 5-FU rezistentnih karcinoma debelog crijeva, gdje je korišten samostalno u terapiji što je rezultiralo višebrojnim studijama irinotekana kao samostalnog kemoterapeutika.

Unatoč zadovoljavajućoj antitumorskoj aktivnosti, veliki problem irinotekana je njegova toksičnost. Dijareja je česta nuspojava primjene irinotekana te se količina irinotekana u tretmanu određuje i s obzirom na pojavnost dijareje. Uzrok dijareje najvjerojatnije su oštećenja epitela crijeva uslijed djelovanja SN-38 koji se aktivira djelovanjem β -glukuronidaza na SN-38G u crijevima. Također, tretiranje irinotekanom nije preporučljivo za osobe s

nepravilnim radom ili oštećenjima jetre, budući da irinotekan podliježe brojnim biotransformacijama u jetri.³⁷ Iz tog razloga teži se pronalaženju spojeva koji će, u kombinaciji s irinotekanom, smanjiti njegovu toksičnost za organizam, ali i povećati antitumorska svojstva. Jedan takav primjer su nanočestice selenija. Irinotekan u kombinaciji s nanočesticama selenija (Nano Se) pokazuje povećanu citotoksičnost naspram tumorskih stanica u usporedbi s normalnim stanicama. Kombinacija Nano Se i irinotekana povećala je osjetljivost tumorskih stanica za DNA oštećenja posljedično uzrokujući apoptozu kroz aktivaciju kaspaza. Same nanočestice Se nisu se manifestirale toksičnima za organizam.³⁸ Osim spojeva koji djeluju kao pojačivači antitumorskih svojstava irinotekana ili smanjuju njegovu toksičnost, znanstvena istraživanja obuhvaćaju i prehranu koja bi mogla dati pozitivan rezultat prilikom primjene irinotekana. Tako je pokazano da kod miševa konzumacija produkata koji sadrže omega-3 polinezasićene masne kiseline (prije primjene irinotekana) smanjuje oštećenja crijeva (manje apoptotičnih događaja u kriptama tankog crijeva), umanjuje upalu jetre izazvanu hepatotoksičnim djelovanjem irinotekana, poboljšava broj crvenih i bijelih krvnih stanica, a smanjuje broj nezrelih crvenih krvnih stanica u krvotoku.³⁹ Rezultati ovakvih istraživanja ukazuju na mogućnost poboljšanja tijeka i ishoda tretmana irinotekanom kod ljudi, podizanje kvalitete života pacijenata, ali i produljenje životnog vijeka.

2.8. Kanabinoidi

Pojam kanabinoidi odnosi se na sve ligande koji se vežu na kanabinoidne receptore, CB1 i CB2. Dijele se na endogene, fitogene i sintetičke kanabinoide. Najznačajniji fitokanabinoidi su psihoaktivni Δ -9-tetrahidrokanabinol (THC) i kanabidiol (CBD) koji za razliku od THC ne posjeduju psihoaktivna svojstva (strukture prikazane na slici 7).³ THC i CBD, kao i stotinjak drugih kanabinoida, izolirani su iz biljke *Cannabis sativa*.



Slika 7. Molekulska struktura Δ -9-THC-a (lijevo) i CBD-a (desno). Slika je izrađena pomoću *ChemDraw Direct-a*.²⁶

2.9. Djelovanje kanabinoida u organizmu

Kanabinoidni receptori CB1 i CB2 spadaju u receptore spregnute s G proteinima (GPCR). CB1 receptori uglavnom se nalaze u središnjem živčanom sustavu (SŽS), dok se CB2 receptori u najvećem broju nalaze u limfnim čvorovima, slezeni, koštanoj srži te slijepom crijevu, ali i u SŽS-u. CB1 su najbrojniji receptori GPCR tipa u humanom središnjem živčanom sustavu, a nalaze se na krajevima neurona gdje sudjeluju u inhibiciji neurotransmisije. Aktivacija CB2 receptora izaziva imunološki odgovor organizma, uključujući proliferaciju, preživljavanje i migraciju limfocita. Ljudsko tijelo proizvodi endokanabinoide koji utječu na osjet boli i reakciju na bol, odgovore na stres i upale, apetit, memoriju i raspoloženje. Većina fitokanabinoida izolirana je iz biljke *Cannabis sativa*, no iako je riječ o više od sto različitih spojeva, samo nekoliko njih prisutno je u većim količinama i smatra se aktivnima. Sintetički kanabinoidi razvijeni su sa svrhom proučavanja endokanabinoidnog sustava, a dijele se na sintetičke ekvivalente endo- i fitokanabinoida, analoge endo- i fitokanabinoida, derivate endokanabinoida ili potpuno nove kemijske spojeve koji pokazuju visoki afinitet za kanabinoidne receptore.⁴⁰

2.9.1. Tetrahidrokanabinol i kanabidiol u tretmanu nuspojava kemoterapije

Otprilike 70 do 80% pacijenata koji su podvrgnuti kemoterapiji doživjeli su mučnine i povraćanje izazvano kemoterapijom (engl. *chemotherapy-induced nausea and vomiting*, CINV). Refleks povraćanja rezultat je koordinacije dviju regija u produženoj moždini, CTZ (engl. *chemoreceptor trigger zone*) i centra za povraćanje, te aksona u tankom crijevu.

Kemoterapeutici inhibiraju sintezu DNA i uzrokuju smrt stanice u bilo kojem stadiju staničnog ciklusa. Umiruće enterokromafine stanice, smještene u epitelu tankog crijeva, oslobađaju serotonin koji se veže na 5-HT₃ receptore aferentnih živčanih stanica što uzrokuje prijenos signala do CTZ-a. Signal se obrađuje u centru za povraćanje, a zatim se odašilje eferentni signal prema abdominalnim mišićima, želucu i dijafragmi, što zajedno s oslobađanjem neurotransmitera poput dopamina rezultira mučninom i povraćanjem. CINV se može klasificirati u pet grupa ovisno o vremenskom periodu u kojem nastupa: akutni CINV nastupa unutar 24 sata od tretmana, odgođeni CINV nastupa nakon 24 sata, preuranjeni CINV nastupa prije ponovnog tretmana kao posljedica prethodnog negativnog iskustva, prodorni CINV nastupa unatoč administraciji antiemetika, a ustrajani CINV javlja se sa novim tretmanom nakon što su se antiemetici u prethodnom tretmanu pokazali neefikasima. Iako antiemetici mogu pomoći u većini navedenih slučajeva, pojavnost CINV-a i dalje je vrlo visoka, a u slučaju preuranjenog CINV-a antiemetici ne djeluju.³ Iz tog razloga provdena su brojna istraživanja o utjecaju kanabinoida na posljedice kemoterapije. Dobar model za ovakva istraživanja je azijska rovkica (*Suncus murinus*), životinja koja za razliku od miševa i štakora ima sposobnost povraćanja. U istraživanju Parker *i sur.* rovkice su tretirane litijevim kloridom ili fiziološkom otopinom (proba) nakon čega su smještane u kontekstualne komore gdje je snimana i bilježena učestalost povraćanja. Nakon procesa uvjetovanja reakcije, rovkice su podvrgnute testu u kojem su tretirane prvo sa THC, CBD ili OND (ondasteron, antagonist 5-HT₃), a zatim fiziološkom otopinom i stavljene u komoru gdje je mjerena učestalost povraćanja. Rezultati su pokazali da THC i CBD smanjuju pojavu i učestalost povraćanja, dok OND, koji se prethodno pokazao uspješnim antiemetikom kod toksinima uzrokovanog povraćanja, nije pokazao efekta kod uvjetovanog povraćanja, što je potvrdilo ranija istraživanja da 5-HT₃ antagonisti nisu efikasni antiemetici kod uvjetovanog CINV-a.⁴¹

Česta nuspojava kemoterapije je kemoterapijom izazvana periferna neuropatija (engl. *chemotherapy-induced peripheral neuropathy*, CIPN). Kemoterapeutski agensi induciraju disfunkciju mitohondrija i interferiraju sintezu DNA što uzrokuje oksidativni stres i upale te neuropatiju.³ U svom istraživanju King *i sur.* rasporedili su miševe u grupe te ih tretirali različitim kemoterapeutskim agensima (paclitaxelom, oxaliplatinom i vincristinom), a 15 minuta prije tretmana miševi su primili dozu CBD-a, THC-a ili kombinacije THC/CBD. Rezultati su pokazali značajno smanjenje mehaničke osjetljivosti kod miševa tretiranih THC-

om ili CBD-om, dok je taj učinak kod miševa tretiranih kombinacijom kanabinoida bio sinergistički.⁴²

Veliki gubitak mase i apetita još je jedna posljedica kemoterapije. Nekoliko istraživanja pokazalo je da oralna konzumacija THC-a kod osoba s anoreksijom uzrokovanom posljedicama karcinoma izaziva stimulaciju apetita i porast tjelesne mase.⁴³ Kanabinoidi stimuliraju aktivnost AMPK (AMP ovisnih protein-kinaza) u hipotalamusu, enzima koji regulira sintezu i oksidaciju masnih kiselina. Aktivirane AMPK fosforiliraju acetyl-CoA karboksilaze (ACC) što uzrokuje inhibiciju sinteze masnih kiselina i stimulira njihovu oksidaciju. Pojačana oksidacija masnih kiselina uzrokuje smanjenje lipidnih zaliha, što rezultira stimulacijom apetita.⁴⁴

2.9.2. Antitumorska djelovanja tetrahidrokanabinola i kanabidiola

Munson *i sur.* 1975. godine ispitali su djelovanje Δ -9-THC, Δ -8-THC, CBD i kanabinola (CBN) na tri različita tumorska sustava u miševima (*in vivo* i *in vitro* u stanicama tumora i koštane srži): Lewisovom karcinomu pluća, leukemiji 1210 i FLV-u (*B-tropic Friend Leukemia Virus*). Svi navedeni kanabinoidi, osim CBD-a, inhibirali su rast tumora.⁴⁵ Ovakva i slična istraživanja, koja su dokazala antineoplastična svojstva kanabidiola, potaknula su brojna daljnja ispitivanja potencijalnih antitumorskih aktivnosti i mehanizama kod navedenih spojeva.

CBD pokazuje antitumorska svojstva kod glioblastoma, leukemije, raka pluća, dojke, maternice, prostate i kod melanoma. Svojstva koja CBD pokazuje su inhibicija staničnog rasta i stanične migracije, indukcija apoptoze u tumorskim stanicama te sprečavanje njihovih invazija susjednih tkiva i nastanka metastaza. Također usporava samoobnavljanje GSC stanica (*glioma stem cells*) i angiogenezu kod glioblastoma. Inhibicija angiogeneza odvija se kroz više mehanizama kao što su citostaza endotelnih stanica, inhibicija migracija endotelnih stanica i inhibicija proangiogenih faktora. Djelovanje CBD-a najbolje je proučavano na primjeru glioblastoma.⁴⁰ Istraživanje koje su proveli Massi *i sur.* pokazalo je da iako CBD pokazuje jako slabi afinitet za CB1 i CB2 receptore, sposoban je izazvati apoptozu i aktivirajuću kaskadu kaspaza na sličan način kao i ostali kanabinoidi. Nakon tretiranja stanica glioma CBD-om, pojačano je otpuštanje citokroma c, što je prethodilo maksimalnoj aktivaciji kaspaza-9. Također, povećala se i aktivnost kaspaza-8, a zajednička aktivnost kaspaza-8 i kaspaza-9 dovodi do aktivacije kaspaza-3. Budući da je kaspaza-8 glavna inicijatorska kaspaza aktivirana putem receptora smrti (Fas, TNF), djelovanje CBD-a sugerira preklapanje intrinzičnog i ekstrinzičnog apoptotičkog puta, odnosno apoptoze uzrokovane mitohondrijskim putem i

putem receptora smrti. CBD također inducira značajnu produkciju ROS-ova (*Reactive oxygen species*) i potrošnju glutationa (GSH) u vremenskom periodu prije aktivacije kaspaza što sugerira da apoptozu inducira oksidativni stres.⁴⁶

Poput CBD-a, THC također pokazuje antitumorska svojstva kod glioblastoma, raka dojke, raka usne šupljine, raka pluća, limfoma i leukemije. THC inhibira proliferaciju, a potiče apoptozu tumorskih stanica, inhibira angiogenezu, inducira autofagiju te inhibira stanične migracije i nastanak metastaza. Antitumorska svojstva THC-a direktna su posljedica njegove sposobnosti da se veže na CB1 i CB2 receptore čija ekspresija je pojačana u brojnim tumorskim stanicama.⁴⁰ Aktivacija ovih receptora uzrokuje sintezu i akumulaciju ceramida, što inducira autofagiju i apoptozu. Sinteza ceramida uzrokuje stres endoplazmatskog retikuluma, što rezultira UPR-om (engl. *unfolded protein response*) i pojačanom fosforilacijom eIF2 α , α podjedinice proteinskog kompleksa faktora inicijacije translacije eIF2 koji regulira sintezu proteina. Fosforilacija eIF2 α rezultira utišavanjem translacije proteina generalno, ali i aktivacijom p8 proteina i njegovih meta (ATF4, CHOP i TRB3). Aktivirani TRB3 interagira s Akt (protein-kinaza B) i inhibira njenu fosforilaciju i aktivaciju, što rezultira inhibicijom mTORC1 i aktivacijom autofagije. Indukcija autofagije dio je mehanizma aktivacije mitohondrijskog proapoptotskog slijeda uzrokovanog djelovanjem kanabinoida što u konačnici uzrokuje smrt tumorskih stanica.⁴⁷

2.10. Kanabinoidi u tretmanu raka debelog crijeva

Budući da je rak debelog crijeva jedno od najčešćih tumorskih oboljenja u svijetu¹, brojna istraživanja s ciljem otkrića novih potencijalnih lijekova provode se upravo na CRC stanicama, pa tako i ispitivanja mnogobrojnih indicija da kanabinoidi posjeduju antitumorska svojstva. U ovom odlomku opisano je nekoliko primjera antitumorskih djelovanja kanabinoida (fitokanabinoida, sintetičkog kanabinoida i endokanabinoida) na CRC modelima. Honarmand *i sur.* ispitali su utjecaj kanabidiola (CBD) na angiogenezu i staničnu smrt kod miševa s injiciranim CT26 tumorskim staničnim linijama. Angiogeneza je proces koji zahtjeva brojne faktore kao što su vaskularni endotelni faktori rasta (VEGF), fibroblastni faktori rasta (FGF), angiopoietini i interleukini (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8). Osim navedenih faktora, istraživanje je obuhvatilo i mjerenje parametara oksidativnog stresa jer oksidativni stres i manjak enzima s antioksidativnim djelovanjem potiču kancerogenezu. Rezultati istraživanja pokazali su da CBD stumulira apoptozu i reducira veličinu tumora, utišava ekspresiju VEGF, a time i angiogenezu

te smanjuje razinu interleukina IL-6 i IL-8 koji igraju važnu ulogu u poticanju upalnih procesa, proliferaciji i rastu tumora. Također, kod miševa tretiranih CBD-om uočena je povećana aktivnost antioksidansnih enzima, a smanjena je koncentracija MDA (malondialdehid), reaktivnog lipida koji predstavlja marker oksidativnog stresa.⁴⁸

Santoro *i sur.* predstavili su istraživanje rimonabanta, sintetičkog kanabinoida koji djeluje kao CB1 antagonist i njegovog djelovanja na proliferaciju triju CRC staničnih linija (DLD-1, Caco-2 i SW620). Ustanovljeno je da rimonabant uzrokuje smrt CRC stanica neapoptotičkim putem, odnosno da inducira mitotičku katastrofu i inhibira kancerogenezu *in vivo*. Mitotička katastrofa rezultat je zastoja u G2/M tranziciji zbog inhibicije Chk1 (*checkpoint*-kinaza 1). Ovaj događaj obilježava ulazak stanica u mitozu unatoč oštećenjima DNA te porast broja poliploidnih stanica kao posljedice oštećenja diobenog vretena, što je uočeno analizom mitotičkog indeksa, kromosomskih aberacija i poliploidije. Također, istražena su i kemopreventivna svojstva rimonabanta na preneoplastične lezije indukcijom ACF-a pomoću azoksimetan. Ustanovljeno je da je primjenom rimonabanta broj ACF kriпти smanjen što sugerira njegovu sposobnost zaštite od kemijski inducirane kancerogeneze.⁴⁹

Svojstvo izazivanja neapoptotske stanične smrti istražili su Patsos *i sur.* na primjeru CRC staničnih linija tretiranih anandamidom (N-arahidonoiletanolamid, AEA), prvog otkrivenog endokanabinoida. Anandamid se metabolizira putem ciklooksigenaze-2 (COX-2). Budući da je COX-2 prekomjerno eksprimiran u 85% CRC tumorskih stanica, ispitana je pretpostavka da upravo te stanice mogu biti meta antitumorskog djelovanja anadamida. Svojstvo anadamida da izaziva staničnu smrt neapoptotičkim putem vrlo je bitno za tretiranje uznapredovalog karcinoma koji je izgradio rezistenciju na kemoterapijom induciranu apoptozu. Nadalje, anandamid iskazuje svoja antitumorska svojstva unatoč prisustvu CB1/CB2 antagonista što znači da djeluje neovisno o CB receptorima te njegova eventualna klinička aplikacija neće ovisiti o njihovoj ekspresiji. Još jedna zanimljiva činjenica je da neapoptotska stanična smrt koju uzrokuje anandamid nije posredovana ROS-ovima. To je važno iz razloga što u tom slučaju L-GSH ne može zaštititi stanice od oksidacije, a budući da je L-GSH eksprimiran u jetri, anandamid i dalje može biti potencijalni lijek u tretiranju raka debelog crijeva koji je metastazirao na jetru.⁵⁰ Navedeni primjeri opisuju samo mali dio bogatog spektra svojstava kanabinoida i potencijalnih mehanizama njihovog djelovanja te opravdavaju rastući interes za njihova istraživanja.

2.11. Interakcije irinotekana i Δ -9-tetrahidrokanabinola u tretmanu raka debelog crijeva

Kao što je već ranije opisano, kanabinoidi su vrlo uspješni u tretmanu nuspojava kemoterapije, kao što su mučnine, povraćanje i neuropatija. Nizozemska, zemlja s velikim brojem „coffee shopova“ u kojima se mogu kupiti i konzumirati laki opijati poput kanabisa, suočila se s problemom pacijenata koji sve češće posjećuju navedena mjesta, zbog čega su 2003. godine uveli legalni medicinski kanabis, koji je za razliku od ilegalnih preparata standardiziran i bez mikrobioloških i kemijskih onečišćenja. Kako bi se ustanovilo utječe li medicinski kanabis na farmakokinetiku kemoterapeutskih agensa, provedeno je istraživanje na pacijentima koji primaju terapiju irinotekana i docetaxela, dvaju citostatika koji su supstrati CYP3A, enzima podložnih djelovanju kanabinoida. Istraživanje je pokazalo da ispitivani medicinski kanabis (konzumiran u obliku herbalnog čaja) ne utječe na izloženost navedenim citostaticima niti na njihovo izlučivanje iz organizma, a također ne pojačava njihovu hematološku toksičnost. Ipak, ovo istraživanje nije univerzalno – dobiveni rezultati ne vrijede za druge preparate kanabisa niti za drugi način administracije kanabisa. Za razliku od oralne primjene, kao u ovom slučaju, gdje samo 10-20% THC-a ulazi nepromijenjeno u cirkulaciju, inhalacijom se apsorbira i do 50% THC-a.⁴ Nadalje, zbog slabe učestalosti propisivanja medicinskog kanabisa od strane liječnika, cijene preparata i manjeg sadržaja THC-a što se povezuje sa slabijom efikasnošću, nezanemarliv broj pacijenata i dalje poseže za ilegalnim preparatima kod kojih je sadržaj THC-a i do nekoliko puta veći od onoga u medicinskim preparatima. Novija istraživanja ipak sugeriraju da veće doze THC-a mogu i negativno međudjelovati sa irinotekanom.

Na muškim Wistar štakorima provedena je preliminarna studija u kojoj je promatran utjecaj zajedničke primjene THC-a i irinotekana na funkcije jetre i evaluirana je njihova potencijalna genotoksičnost. Gubitak tjelesne mase i mase jetre štakora potvrdio je sinergističko pojačanje toksičnosti irinotekana kada se primjenjuje zajedno s THC-om. Kombinacija irinotekana s THC-om pokazala je povišenje markera oksidativnog stresa (povećana aktivnost SOD i katalaze) u usporedbi s tretmanom bez THC-a. Također, analiza pomoću alkalnog komet testa pokazala je kako kontinuirano izlaganje THC-u uzrokuje manja oštećenja DNA u hepatocitima.⁵ Sljedeće istraživanje na Wistar štakorima ispitalo je utjecaj velike doze THC-a (usporedivo s udjelom THC-a u ilegalnim preparatima) na moždane i krvne stanice. Alkalni komet test pokazao je detektabilna oštećenja DNA u bijelim krvnim stanicama (leukocitima) i moždanim stanicama, s time da su se veće razine oštećenja u ovim stanicama javile puno ranije

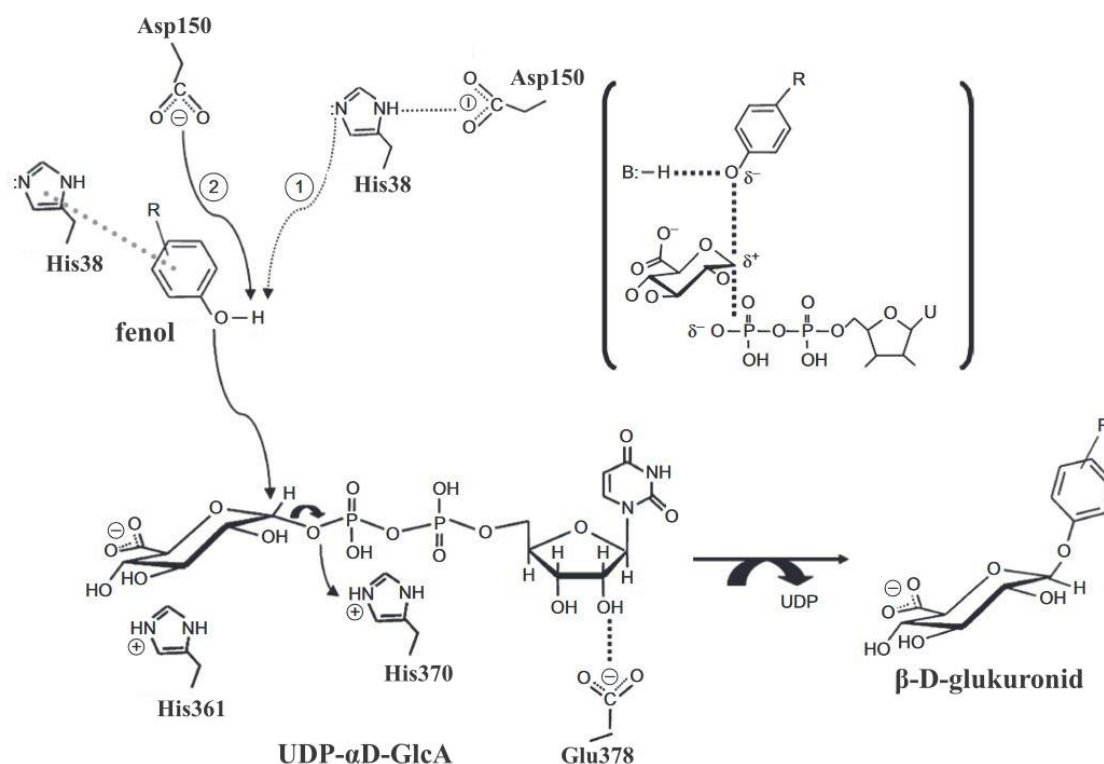
nego u stanicama hepatocita ispitanim u ranijem istraživanju. Oštećenja DNA u moždanim stanicama popraćena su i značajno povišenom razinom produkata lipidne peroksidacije koji ukazuju na oksidativni stres u stanicama, te povišenom aktivnošću katalaze.⁶ Rezultati istraživanja Prester *i sur.* provedenih također na Wistar štakorima ukazali su na umjereni stupanj leukopenije (smanjen broj leukocita), ali i na ozbiljnu neutropeniju (smanjen broj neutrofila) kod štakora tretiranih THC-om i irinotekanom. Niži broj leukocita i apsolutni broj neutrofila u kombiniranoj grupi u odnosu na grupu tretiranu samo irinotekanom uočeni su treći dan terapije, što upućuje na interakcije između irinotekana i THC-a. Na interakcije također upućuje povećano izlučivanje metabolita THC-a (THC-COOH) u mokraći u kombiniranoj grupi u odnosu na grupu tretiranu samo THC-om.⁷

Nekoliko je potencijalno opasnih interakcija irinotekana i THC-a u organizmu. Irinotekan i THC u fazi I metaboličkih reakcija oksidiraju se pomoću citokroma P450. Nije poznato kompetiraju li za isti enzim, no dva slučaja su izgledna: ako THC i irinotekan kompetiraju za isti enzim, umjesto da se irinotekan oksidira u svoje inaktivne metabolite APC i NPC, zbog kompeticije s THC-om prevladavat će njegova konverzija u toksični SN-38, a ukoliko THC aktivira odgovarajući CYP, prevladat će konverzija irinotekana u njegove inaktivne metabolite što bi, na kraju, umanjilo učinak terapije. U fazi II metaboličkih reakcija, THC i irinotekan glukuronidiraju isti enzimi UGT. UGT1A1 glukuronidira SN-38 i THC-COOH, a UGT1A9 uz SN-38 glukuronidira i 11-OH-THC. Ukoliko se metaboliti THC-a i SN-38 natječu za isti enzim, rezultat je slabija glukuronidacija SN-38 i produljenje njegove toksičnosti. Irinotekan, THC i njihovi metaboliti iz tijela se izlučuju, između ostalog, putem žuči, a u tom procesu veliku ulogu igraju ABC transporteri. Alternacije u radu jetrenih transportera mogu uzrokovati slabiju eliminaciju ksenobiotika putem žuči i rezultirati toksično po jetru. Ukoliko velika količina THC-a kompetira s irinotekanom za transporter, eliminacija irinotekana i njegovih metabolita bit će puno manja što može produljiti prisustvo toksičnog SN-38 u organizmu i rezultirati dugoročnim oštećenjima epitelnih stanica crijeva i jetre. Nadalje, enzimi odgovorni za aktivaciju irinotekana u SN-38 su karboksilesteraze, ali i butirilkolinesteraza (BChE). Na modelu štakora pokazano je da visoke doze ekstrakta *Cannabisa* bogatog THC-om inhibiraju BChE. Ukoliko visoke doze THC-a imaju isti efekt na ljudsku BChE, istovremena primjena irinotekana i THC-a rezultirala bi smanjenom razinom SN-38, a time i slabijim antitumorskim djelovanjem.⁵⁰

Zbog navedenih i brojnih drugih potencijalnih interakcija THC-a i citostatika, uzimajući u obzir da su količine THC-a u ilegalnim preparatima zbilja i dovoljne da kompetiraju s lijekovima u organizmu, važno je provesti daljnja istraživanja kako bi se rasvijetlile moguće posljedice konzumacije nepropisanih i nestandardiziranih kanabinoidnih dodataka.

2.12. UDP-glukuroniltransferaze

Uridin-5'-difosfoglukuronoziltransferaza (UDP-glukuroniltransferaza, UGT; EC 2.4.1.17)) je mikrosomalni enzim koji sudjeluje u reakcijama faze II biotransformacije lijekova i igra važnu ulogu u detoksikaciji organizma od ksenobiotika. Reakcije faze I su nesintetske i odnose se na cijepanje molekula (oksidacija, redukcija, hidroliza) i stvaranje nove molekule ili modifikacije postojeće funkcionalne skupine. Reakcije faze II su sintetske i odnose se na spajanje molekule lijeka s endogenom tvari, pri čemu nastaju polarniji metaboliti koji se brže izlučuju urinom i žuči nego metaboliti nastali u reakcijama faze I.⁵¹ Enzimi UGT kataliziraju reakcije konjugacije glikozilne skupine nukletidnog šećera i egzogenog spoja. Konjugacija se odvija na nukleofilnom centru poput kisika (hidroksilna skupina, karboksilna skupina npr.), dušika (primjerice amini), sumpora (tioli) ili na ugljiku.⁵² Reakcije glukuronidacije koje kataliziraju enzimi UGT su bisupstratne reakcije koje se odvijaju SN2 mehanizmom između supstrata UGT i donora glukuronske kiseline (UDP- α -glukuronska kiselina), a oslobađaju se UDP i β -D-glukuronid (prikazano na slici 8). Enzimi UGT mogu glukuronidirati širok spektar akceptorskih supstrata, od velikih i sterički zahtjevnijih molekula poput bilirubina, steroida, žučnih kiselina i retinoida do malih molekula poput fenola. Veliki broj raznovrsnih supstrata omogućava postojanje različitih izoformi enzima UGT, među kojima su i enzimi UGT1A, zaslužni za glukuronidaciju metabolita irinotekana i THC-a.⁵³



Slika 8. Reakcijski mehanizam glukuronidacije fenola katalizirane humanim enzimom UGT1A6. Predložena su 2 reakcijska mehanizma: 1) Asp150 interagira sa susjednim His38 i povećava njegovu bazičnost kako bi mogao deprotonirati hidroksilnu skupinu akceptorskog supstrata (uloga katalitičke baze) čiji kisik zatim nukleofilno napada C1 atom donorskog supstrata (UDP- α -glukuronska kiselina, UDP- α D-GlcA); 2) Asp150 ima ulogu katalitičke baze, a His38 interagira s akceptorskim supstratom. His361, His370 i Glu378 stabiliziraju izlaznu skupinu. (preuzeto i prilagođeno iz reference 53).

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- RIPA pufer (0,1% natrijev deoksikolat, 150 mmol L⁻¹ natrijev klorid (NaCl), 1% nonil fenoksipolietoksietanol (NP-40), 0,1% natrijev dodecil-sulfat (SDS), 25 mmol L⁻¹ tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorid (Tris-HCl), pH 7,6, Milli-Q voda (MQ H₂O))
- inhibitor proteaza (cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail)
- 30% akrilamid
- 10% SDS
- 1,5 mol L⁻¹ Tris pufer (pH 8,8); 1,0 mol L⁻¹ Tris pufer (pH 6,8)
- amonijev persulfat (APS)
- *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED)
- 6x Loading Buffer SDS (pufer za nanošenje u sastavu: 375 mmol L⁻¹ Tris-HCl (1,0 mmol L⁻¹, pH 6,8), 9% SDS, 50% glicerol, 0,03% bromfenol plavo, 9% β-merkaptoetanol)
- *PageRuler™, Prestained Protein Ladder*, 10 – 180 kDa
- Transfer pufer (sastav za 1L: 5.82g Tris-baza, 2.93g glicin, 200 ml metanol, 10% SDS)
- *amidoschwarz* (0,1% amido black 10B (natrijev 4-amino-5-hidroksi-3-((E)-(4-nitrofenil)diazenil)-6-((E)-fenildiazenil)naftalen-2,7-disulfonat), 40% metanol (MeOH), 10% octena kiselina, MQ H₂O))
- *amidoschwarz* destain (20% MeOH, 7,5% octena kiselina, MQ H₂O), mlijeko u prahu, albumin goveđeg seruma (BSA)
- 1x TBS (20 mmol L⁻¹ Tris, 150 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,6 podešen dodatkom HCl); 1x TBS-T (dodan Tween-20 do 0,1% u 1x TBS)
- Bradfordov reagens (Coomassie G-250)

3.1.2. Komercijalni kompleti

- *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (Thermo ScientificTM) korišten je za određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorcima mišje jetre prije analize Western blot-om
- *UGT Activity Assay / Ligand Screening Kit (Fluorimetric)* (BioVision) korišten je za mjerenje aktivnosti enzima UGT u uzorcima mišje jetre
- *ClarityTM Western ECL Substrates* (Bio-Rad) korišten je za kemiluminiscentnu detekciju proteina na membrani

3.1.3. Protutijela

- *Anti-UGT1A1 antibody* (ab194697) – zečje poliklonalno anti-UGT1A1 (primarno) protutijelo
- *Recombinant Anti-GAPDH antibody [EPR16891] – Loading Control* (ab181602) – zečje monoklonalno anti-GAPDH (primarno) protutijelo
- *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)* (ab6721) – kozje anti-zečje protutijelo s konjugiranom HRP (peroksidaza iz hrena)

3.1.4. Uređaji i dodatna oprema

- *Sorvall LYNX 4000 Superspeed* centrifuga
- *Thermo Scientific Pico21* mikrocentrifuga
- *BeadBug Microtube* Homogenizator (Benchmark Scientific)
- *Trans-Blot Turbo Transfer System*
- *C-Digit Blot Scanner* (LI-COR Biosciences)
- Spektrofotometar *UV-1600PC*, VWR
- Spektrofluorimetar *Infinite 200 PRO* (Tecan)
- Spektrofotometar za mikrotitarske pločice *Multiskan EX* (Thermo Labsystems)
- *Benchmark Scientific D1031-10 Prefilled 2.0 mL Tubes, Acid Washed Silica (Glass) Beads, 1.0 mm; 50/pk*
- Teflonski „Douncer“ homogenizator
- Heidolph *RZR 1* miješalica
- Mikrotitarske pločice za 96 uzoraka, prozirne i crne
- Sustav za gel-elektroforezu

3.2. Eksperimenti na životinjama

Istraživanje provedeno u radu vezano je na projekt „Istraživanje međudjelovanja irinotekana i tetrahidrokanabinola na laboratorijskim glodavcima integriranjem biokemijskih, molekularno-bioloških, patohistoloških i analitičkih metoda; voditeljica prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMROH), Zagreb. Eksperimenti su provedeni na mužjacima miševa soja BALBc, starosti 10 tjedana, tjelesne mase $30 \text{ g} \pm 10 \%$, uzgojenih u Pogonu laboratorijskih životinja Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska. Miševima je induciran rast singeničnog tumora debelog crijeva subkutanom aplikacijom stanične linije CT26WT. Tijekom eksperimenta životinje su boravile u makrolonskim kavezima pod kontroliranim uvjetima (periodična izmjena svjetla svakih 12 sati, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$) sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Eksperimenti su provedeni u Jedinici za laboratorijske životinje, IMROH, Zagreb u skladu s odobrenjem Etičkog povjerenstva IMROH i Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Ministarstvo poljoprivrede.

U pokusu je korišten Δ -9-tetrahidrokanabinol (Dronabinol; CAS 1972-08-3) proizvođača THC Pharm GmbH (Frankfurt, Njemačka) i irinotekan (CAS 100286-90-6) proizvođača LC Laboratories (Woburn, SAD). Deset dana nakon inokulacije životinje su nasumično podijeljene u skupine po deset miševa koje su tretirane na sljedeći način:

- a) Skupina 1 (kontrola): jedinke s tumorom koje nisu bile izložene nikakvim tretmanima
- b) Skupina 2 (IRI): miševi s tumorom koji su prvi i peti dan intraperitonealno (i.p.) primili irinotekan u dozi 60 mg kg^{-1} tjelesne težine (tj. t.). Navedena doza odabrana je prema literaturi, a odgovara $\sim 1/3 \text{ LD}_{50}$ (*lethal dose*) dozi za miševe.⁵⁴
- c) Skupina 3 (THC): miševi s tumorom koji su tijekom pokusa svakodnevno dobivali THC otopljen u sezamovom ulju (Bio Primo, Ulm, Njemačka) putem intragastrične sonde u dozi 7 mg kg^{-1} tj. t. Navedena doza odgovara količini u preparatima s visokim udjelom THC-a.⁵⁵
- d) Skupina 4 (IRI + THC): miševi s tumorom koji su prvi i peti dan i.p. primili irinotekan u dozi 60 mg kg^{-1} tj. t., a uz to su svakodnevno tijekom 7 dana dobivali i THC putem intragastrične sonde u dozi 70 mg kg^{-1} tj. t.

Tijekom pokusa životinjama je redovito praćena tjelesna težina, ponašanje i opći zdravstveni status te se mjerio promjer ksenografta tumora (maksimalni dopušteni volumen tumora je

1000 mm³). Životinje su žrtvovane u vremenskim intervalima od 4 i 24 sata te nakon 7 dana. Neposredno prije žrtvovanja životinje su anestetizirane (Narketan, 80 mg/kg tjelesne mase + Xylapan, 12 mg/kg tjelesne mase, i.p.). U svrhu provođenja daljnjih analiza provedena je razudba pokusnih životinja s uzorkovanjem ciljanih tkiva/organa. Uzorci tkiva jetre namijenjeni za ciljane analize ovog rada isprani su u hladnom PBS puferu, nakratko su uronjeni u tekući dušik kako bi se zaustavila aktivnost proteaza te su pohranjeni na -80 °C.

3.3. Mjerenje ekspresije enzima UGT1A1 Western blot analizom

Tkiva jetre homogenizirana su na dva načina. Dio uzoraka homogeniziran je smrzavanjem u tekućem dušiku i mehaničkim drobljenjem, dok je ostatak homogeniziran pomoću *BeadBug* homogenizatora. U potonjem slučaju, komadići jetre (100–200 mg) prebačeni su u tubice napunjene zrcima od silike te je dodan ~1 mL RIPA pufera. Sadržaj je kratko vorteksiran nakon čega je tekućina odbačena kako bi se iz uzora uklonilo što više krvi. Zatim je u tubicu sa zrcima i uzorkom dodano 1,4 mL RIPA pufera u kojem je prethodno otopljena tableta koja sadrži inhibitore proteaza (cOmplete™ ULTRA Tablets) te su tkiva homogenizirana dva puta po tri minute korištenjem *BeadBug* homogenizatora. Dobiveni lizati nakon toga centrifugirani su 15 minuta na 20000 g pomoću *Sorvall LYNX 4000 Superspeed* centrifuge ohlađene na 4 °C kako bi se istaložili zaostali komadi tkiva u lizatu.

Koncentracija ukupnih proteina u dobivenim lizatima određena je pomoću *Pierce™ BCA Protein Assay* komercijalnog kompleta. BCA test bazira se na redukciju Cu²⁺ iona u Cu⁺ ione djelovanjem proteina u bazičnom mediju te na biuretskoj reakciji u kojoj bicinhonska kiselina (BCA) tvori tamnoljubičaste komplekse s nastalim Cu⁺ ionima. Nastali kompleksi apsorbiraju pri 562 nm.⁵⁶ Uzorci su razrijeđeni s RIPA puferom u omjeru 1:25, a zatim je 10 µL svakog uzorka otpipetirano u jažice prozirne mikrotitarske pločice te im je dodano po 200 µL radne otopine (reagens A i reagens B pomiješani u omjeru 50:1). Također, osim uzoraka, u zasebne jažice otpipetirano je po 10 µL BSA standarda (koncentracija 0,125 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹, 0,75 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹ i 1,5 mg mL⁻¹) te slijepa proba, odnosno 10 µL RIPA pufera, kojima je također dodano po 200 µL radne otopine kako bi se pomoću izmjerenih vrijednosti mogao konstruirati baždarni pravac. Pločice s uzorcima i standardima su zatim prekrivene folijom i inkubirane 30 minuta na 37 °C nakon čega im je pomoću spektrofotometra očitana apsorbancija pri 562 nm te izračunata koncentracija ukupnih proteina pomoću Beer – Lambertovog zakona.

Koncentracija proteina u uzorcima podešena je na $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$. 10 μL uzorka pomiješano je s 5 μL pufera za nanošenje, 5 minuta grijano na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ te nanoseno na 10% SDS-poliakrilamidni gel (SDS-PAGE) zajedno s *PageRulerTM (Prestained Protein Ladder)* markerom veličina. SDS PAGE gel sastoji se od dva dijela, 5% gela za sabijanje (za 5 mL otopine: 3,4 mL MQ H₂O, 830 μL 30% akrilamid, 630 μL 1,0M Tris (pH 6,8), 50 μL 10% SDS, 50 μL APS, 5 μL TEMED) i 10% gela za razdvajanje (za 15 mL otopine: 5,9 mL MQ H₂O, 5 ml 30% akrilamid, 3,8 mL 1,5M Tris (pH 8,8), 150 μL 10% SDS, 150 μL APS, 6 μL TEMED). Proteini su na gelu razdvojeni elektroforezom pri 140V u trajanju 1h. Do razdvajanja proteina dolazi u gelu za razdvajanje nakon što se prethodno ukoncentriraju u gelu za sabijanje. Proteini vežu molekule SDS-a zbog čega svi imaju konstantan omjer naboja i mase te sličan izduženi oblik. Zbog negativnog naboja kreću se prema anodi pri čemu se poliakrilamidni gel ponaša kao molekulsko sito, odnosno usporava kretanje većih molekula, dok manje brže i lakše prolaze kroz gel te se na taj način proteini razdvajaju na temelju različitih molekulskih masa. Razdvojeni proteini s gela se prenose na poliviniliden-fluorid (PVDF) membranu pomoću *Bio-Rad TransBlot* sustava za polusuhi transfer. Prije transfera membrana se aktivira u 100% metanolu. Zatim se celulozni listići (složeni u grupe od po 7 listića) namoče u puferu za transfer, ocijede i slaže se tzv. „transfer-sendvič“ u kojem se celulozni listići nalaze na dnu, zatim se na njih slaže aktivirana membrana, pa SDS-PAGE gel i na vrhu ponovno celulozni listići, nakon čega se sve unosi u *TransBlot* sustav (program prijenosa u trajanju 7 minuta) što na kraju rezultira prijenosom proteina s gela na membranu. Nakon prijenosa, membrana je nekoliko minuta inkubirana u *amidoschwarz* boji, a zatim odbojana *amidoschwarz* destain otopinom. Nakon ispiranja 5 minuta u 10x TBS-T puferu membrana je blokirana u otopini za blokiranje (5% otopina nemasnog mlijeka u prahu ili 5% otopina BSA u 10x TBS-T) preko noći na $4 \text{ }^\circ\text{C}$, a onda je prerezana skalpelom tako da se vezani UGT proteini (~60 kDa) i GAPDH (~37 kDa) nalaze na zasebnim membranama. Membrane su potom isprane tri puta po 10 minuta u TBS-T puferu te inkubirane s anti-UGT1A1 primarnim protutijelom razrijeđenim 5000x u otopini za blokiranje, odnosno anti-GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) razrijeđenim 3000x u otopini za blokiranje, sat vremena na sobnoj temperaturi. Korišteno anti-UGT1A1 primarno protutijelo je poliklonalno zečje protutijelo, dok je anti-GAPDH monoklonalno zečje protutijelo, a vežu se na proteine od interesa (antigene), dok ostatak membrane blokira kazein iz mlijeka ili BSA kako ne bi došlo do nespecifičnog vezanja. Nakon inkubacije membrane su isprane tri puta po 10 minuta u 10x TBS-T, a zatim inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi sa sekundarnim

protutijelom (kozje anti-zečje protutijelo) vezanim uz peroksidazu iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) razrijeđenim 5000x u otopini za blokiranje. Nakon završnog ispiranja tri puta po 10 minuta u 10x TBS-T puferu uslijedila je detekcija kemiluminiscentnog signala. Na membrane je nanescna otopina supstrata za HRP, dobivena miješanjem otopina peroksida i luminola u volumnom omjeru 1:1 (*Clarity™ Western ECL Substrates*) te su skenirane pomoću Li-Cor skenera i pripadajućeg ImageStudio softvera. Intenziteti specifičnih signala te pozadinski signal određeni su pomoću *ImageStudioLite* programskog alata.

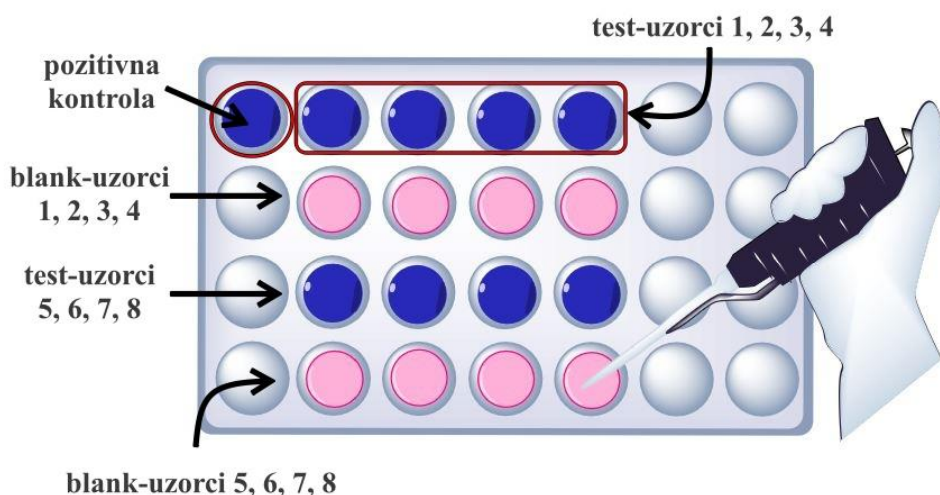
3.4. Mjerenje aktivnosti farmakološki relevantnih izoenzima UGT korištenjem *UGT Assay* komercijalnog kompleta

Aktivnost izoenzima UGT u tkivima mišje jetre izmjerena je korištenjem *UGT Activity Assay* komercijalnog kompleta prema uputama proizvođača. Komplet se sastoji od UGT kofaktora UDPGA (uridin difosfat glukuronska kiselina), fluorescentnog supstrata UGT, UGT pozitivne kontrole, alameticina i inhibitora UGT (diklofenak) koje je potrebno razrijediti do određenih koncentracija u *UGT Assay* puferu. Analiza se bazira na vremenskom praćenju smanjenja fluorescencije UGT supstrata s velikim Stokesovim pomakom ($Ex/Em = 415/502$ nm) uslijed konverzije supstrata u nefluorescentni glukuronid katalizirane farmakološki relevantnim UGT1A i UGT2B enzimima (prikazano na slici 9). Specifična aktivnost enzima UGT računa se usporedbom smanjenja fluorescencije u reakciji koja se odvija potpomognuta UDPGA kofaktorom i kontrolnoj reakciji bez UDPGA. Alameticin je peptidni antibiotik čije molekule međusobnom agregacijom tvore ionske kanale u staničnoj membrani. Dodatak alameticina u reakcijsku smjesu omogućava difuziju UGT supstrata i UDPGA kroz lipidne membrane i njihov dolazak do aktivnog mjesta UGT enzima u lumenu mikrosoma.⁵⁷



Slika 9. Reakcija glukuronidacije fluorescentnog supstrata UGT u nefluorescentni metabolit katalizirana izoenzimima UGT (prilagođeno iz reference 57)

Komadići jetre (~50 mg) homogenizirani su u 500 μL UGT *Assay* pufera pomoću teflonskog „douncer“ homogenizatora pričvršćenog na Heidolph *RZR 1* miješalicu. Lizati su inkubirani 5 minuta na ledu, a zatim 15 minuta centrifugirani na 15000 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja dobiveni supernatant otpipetiran je u ohlađenu Eppendorf tubicu od 1,5 mL. Koncentracija ukupnih proteina u lizatima određena je Bradfordovim testom. Bradfordov reagens sadrži Coomassie Brilliant Blue G-250 boju koja je u kiselim uvjetima u kationskom obliku koji je crvene boje, a vezanjem na proteine nastaje nekovalentni kompleks i boja postaje plava s maksimumom apsorpcije pri 595 nm. Uzorcima razrijeđenima 100x u Bradfordovom reagensu izmjerena je apsorbanca pri 595 nm, kao i standardnim otopinama BSA također razrijeđenih Bradfordovim reagensom (standardi su sadržavali 0, 3, 6, 12 i 24 μg BSA) kako bi se mogao konstruirati baždarni pravac. Koncentracije ukupnih proteina izračunate su pomoću Beer – Lambertovog zakona. Zatim su priređene sljedeće otopine: *Sample Premix* (2X) otopina koja sadrži 0,05 mg mL^{-1} proteina (lizat razrijeđen u UGT *Assay* puferu), *Positive Control Premix* (2X) koju čini ishodna otopina UGT pozitivne kontrole razrijeđena u UGT *Assay* puferu u omjeru 1:50, 10x radna otopina UGT supstrata (250x ishodna otopina supstrata UGT razrijeđena u UGT *Assay* puferu u omjeru 1:25) te 5x otopina UDPGA (50x ishodna otopina UDPGA razrijeđena u UGT *Assay* puferu u omjeru 1:50). 2x *Premix* otopinama dodan je alameticin (1 μL na 200 μL *Premix*-a) te su inkubirane 15 minuta na ledu. U jažicama crne mikrotitarske pločice priređeni su test i blank uzorci te pozitivna kontrola (sastav opisan u tablici 2, shema pločice s uzorcima prikazana na slici 10).



Slika 10. Shematski prikaz organizacije uzoraka u mikrotitarskoj pločici (slika izrađena pomoću online programa *ChemDrawDirect*²⁶)

Pločica s otopinama inkubirana je 5 minuta na 37 °C. Reakcija je započeta dodatkom UDPGA u test-uzorke i pozitivnu kontrolu pomoću multikanalne pipete kako bi se maksimalno skratio *lag period* od dodatka kofaktora do početka snimanja. Uzorci su snimani pomoću *Infinite 200 PRO (Tecan)* spektrofluorimetra. Postavke snimanja namještene su pomoću programa Tecan *i-control 1.10.4.0.*, a bile su sljedeće: odabir odgovarajuće mikrotitarske pločice, odabir područja pločice (jažica) na kojima će se snimanje vršiti, valne duljine pobude i emisije fluorescencije ($\lambda_{em} = 415 \text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 415 \text{ nm}$), mjerenje kinetičkog ciklusa u trajanju 40 minuta s intervalima snimanja od 40 ili 60 sekundi te očitavanje fluorescencijskog signala s donje strane pločice. Prije snimanja uzoraka izmjeren je intenzitet fluorescencije standarada odnosno supstrata UGT (koncentracije 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2, 1,6 i 2,0 nmol/jažica) i slijepe probe (*UGT Assay* pufer) nanesenim u jažice crne mikrotitarske pločice. Standardi su priređeni razrjeđenjem 0,1 nmol μL^{-1} otopine supstrata UGT (prethodno pripravljena razrjeđenjem ishodne otopine UGT supstrata u *UGT Assay* puferu u omjeru 1:50).

Tablica 2. Sastav reakcijskih smjesa test i blank uzoraka te pozitivne kontrole

	Test uzorak	Blank uzorak (– UDPGA)	Pozitivna kontrola
<i>Sample Premix (2X)</i>	50 µl	50 µl	/
<i>UGT Pos. Control Premix (2X)</i>	/	/	50 µl
Supstrat UGT radna otopina (10X)	10 µl	10 µl	10 µl
Diklofenak otopina 5mM	/	/	/
UGT Assay pufer	20 µl	40 µl	20 µl
V ukupno	80 µl	100 µl	80 µl
Početak reakcije – dodatak 5X UDPGA	20 µl	-	20 µl

Kako bi se izračunala specifična aktivnost enzima UGT, za svaku reakcijsku jažicu (test-uzorak) potrebno je odabrati dvije vremenske točke (T_1 i T_2) u linearnoj fazi reakcijske krivulje, očitati pripadajuće intenzitete fluorescencije u danim točkama (RFU_1 i RFU_2) te odrediti apsolutnu vrijednost promjene fluorescencije u danom intervalu ($\Delta F = |RFU_1 - RFU_2|$). Oduzimanjem ΔF vrijednosti izračunatih za test i blank uzorke dobiva se vrijednost G_t , odnosno specifična fluorescencija smanjena glukuronidacijom supstrata ($G_t = \Delta F_t - \Delta F_{\text{blank}}$). Vrijednosti G_t pridružuju se jednadžbi baždarnog pravca kako bi se dobila vrijednost B (u nmolima). Specifična aktivnost UGT enzima izračunata je pomoću sljedeće formule:

$$\text{UGT specifična aktivnost} = \frac{B}{\Delta T \times P} = \text{nmol/min/mg} = \text{mU/mg}$$

B = količina utrošenog supstrata (nmol)

ΔT = vremenski period $T_2 - T_1$ u linearnoj fazi reakcijske krivulje (min)

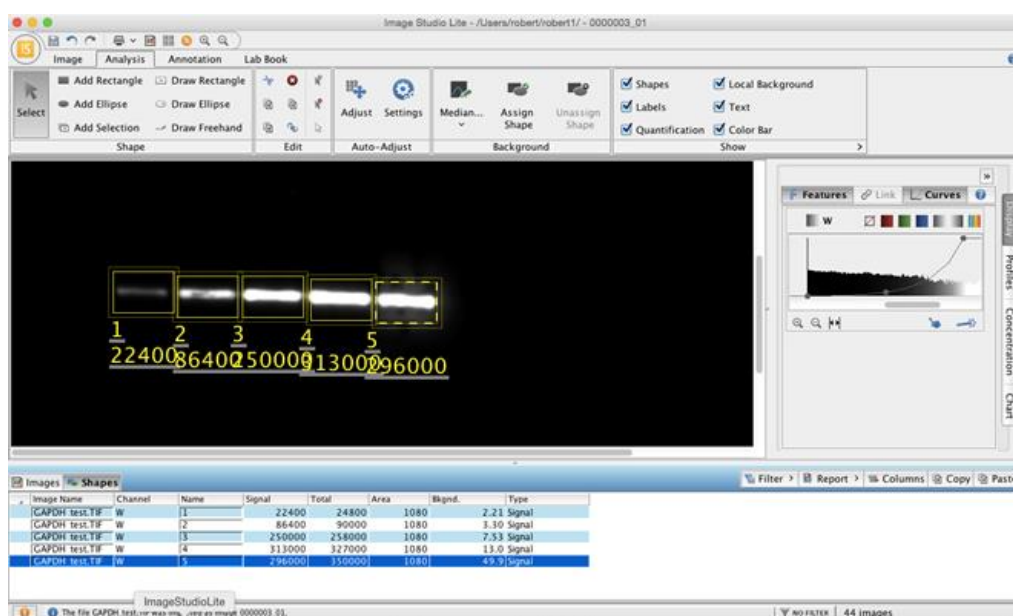
P = količina proteina u jažici (mg)

Za testiranje normalnosti distribucije rezultata mjerenja aktivnosti UGT korišten je Shapiro-Wilk W test. Deskriptivna statistika je učinjena uporabom sedam parametara: aritmetička sredina, medijan, minimum, maksimum, prva kvartila (Q1), treća kvartila (Q3) i standardna devijacija. Razlika između skupina za aktivnost UGT unutar jednog vremenskog perioda testirana je uporabom Kruskal-Wallis testa i post-hoc Dunnova testa. Mijenjanje varijable u vremenu testirano je uporabom Friedmanovog testa. Svi primjenjeni testovi bili su dovosmjerni. P vrijednosti $\leq 0,05$ smatrane su statistički značajnima. Analiza podataka i grafički prikaz podataka učinjeni su uporabom programa GraphPad Prism (verzija 8.3.0; GraphPad Software, SAD) i Statistica for Windows (verzija 13; StatSoft, SAD).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

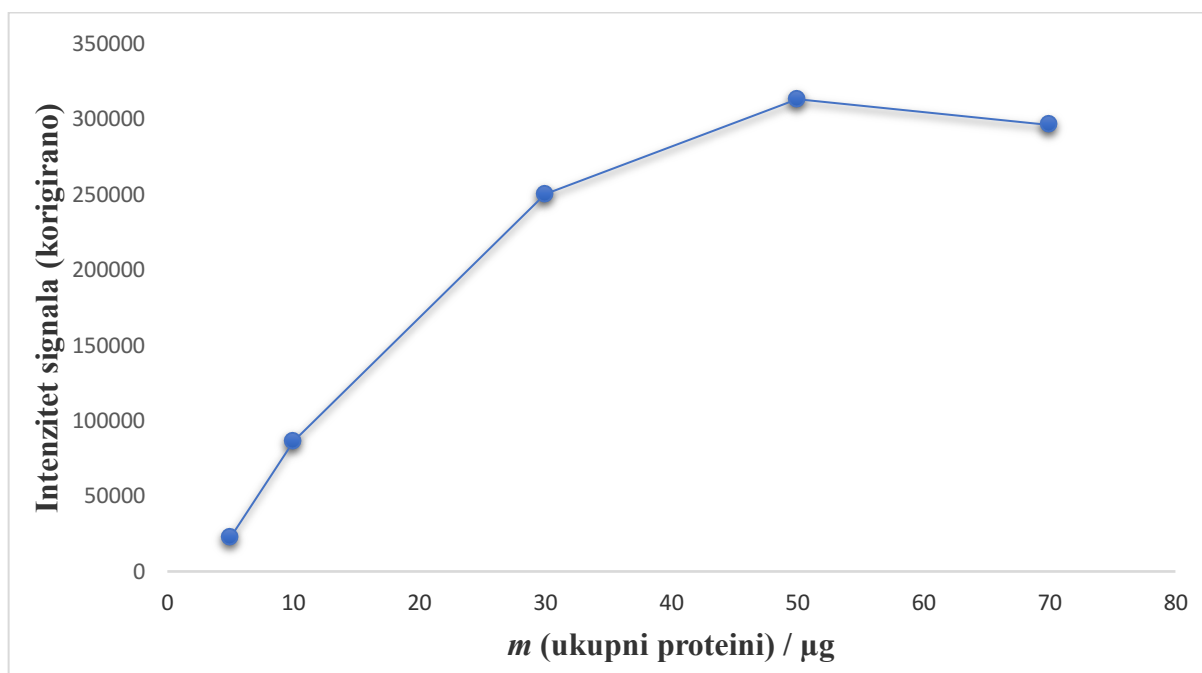
4.1. Ekspresija enzima UGT1A1

Razina ekspresije UGT1A1 proteina izmjerena je u odnosu na ekspresiju enzima GAPDH. *GAPDH* gen je *housekeeping* gen, odnosno gen koji je zadužen za održavanje osnovnih staničnih funkcija. Ekspresija većine *housekeeping* gena je konstantna i u pravilu ne ovisi o eksperimentanim uvjetima, zbog čega se koriste za normalizaciju razina ekspresije ispitivanih gena. Kako bi se odredila količina proteina odnosno staničnog lizata za analizu, provedena je optimizacija količine proteina nanešenih na gel. Na gel su nanesene količine lizata koje sadrže redom 5, 10, 30, 50 i 70 µg ukupnih proteina. Nakon provedene elektroforeze i Western blot analize uz detekciju GAPDH proteina, dobivene vrpce analizirane su u *ImageStudioLite* programu. Analiza u navedenom programu omogućava kvantifikaciju signala i oduzimanje pozadinskog signala (prikazano na slici 11). Očekivane vrijednosti signala trebale bi biti proporcionalne količini proteina u određenom rasponu koncentracija, dok kod jako niskih i jako visokih koncentracija taj odnos nije linearan. Da bi se izbjeglo prezasićenje signala važno je odabrati količinu koja odgovara linearnom dijelu grafa/krivulje, što nam nadalje omogućava pouzdanu kvantifikaciju ciljanog proteina.



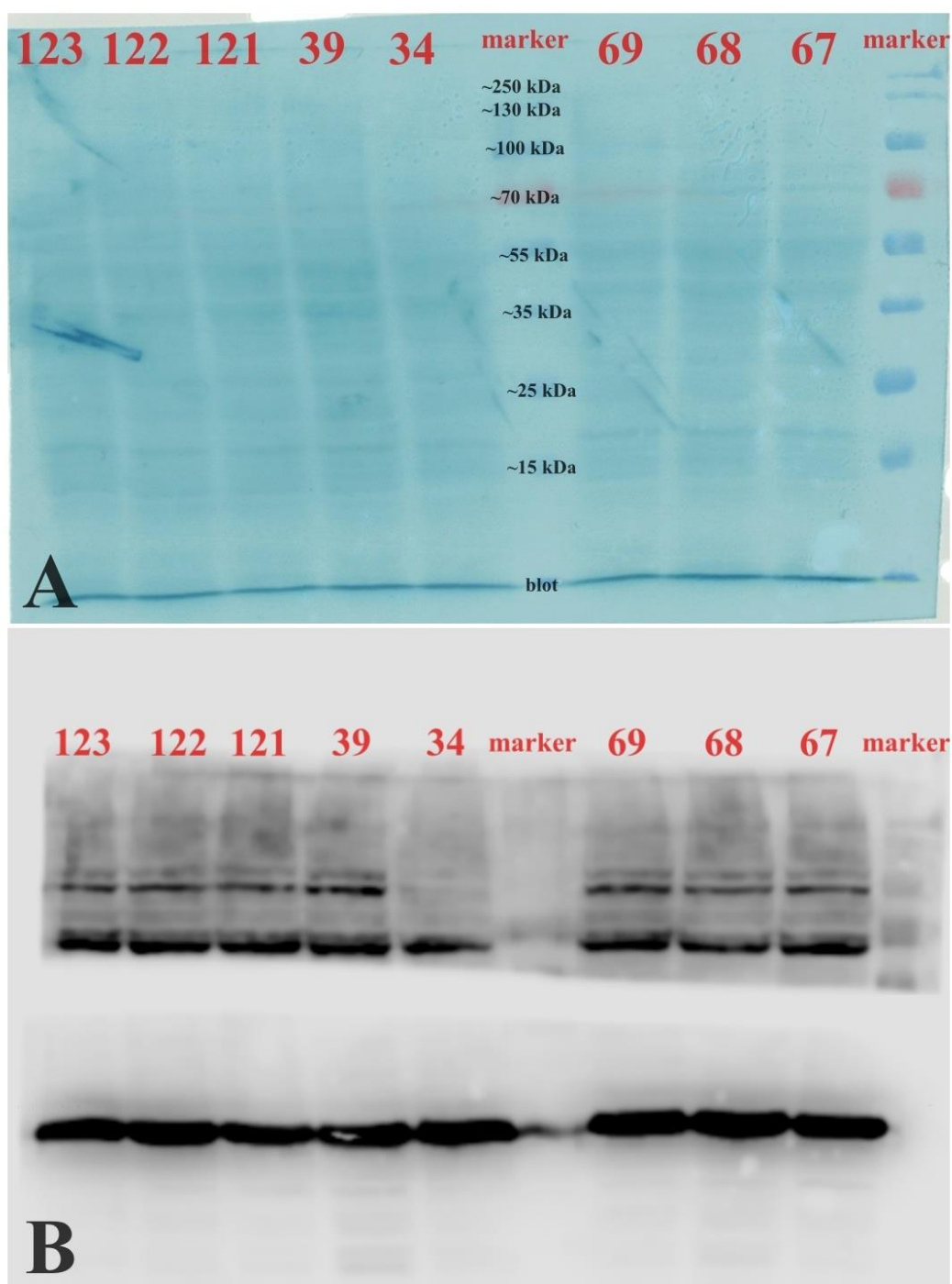
Slika 11. Optimizacija količine proteina za nanošenje na gel u *ImageStudioLite* programu.

Na slici 11 vidljive su vrpce koje odgovaraju enzimu GAPDH u nanesenim lizatima te pripadajući intenziteti signala korigirani za pozadinski signal. Graf ovisnosti jačine korigiranog signala o koncentraciji proteina u lizatu prikazan je na slici 12. Sekundarno protutijelo konjugirano je s HRP, a veže se specifično na primarno anti-GAPDH protutijelo. Peroksid oksidira luminol pri čemu nastaje međuprodukt u pobuđenom stanju koji se u stanje niže energije (osnovno stanje) relaksira emisijom svjetlosti (425 nm). Reakcija je katalizirana HRP enzimom te je rezultatni intenzitet signala direktno proporcionalan proteinima na koje su protutijela vezana. Iz grafa na slici 12 vidljivo je da se intenzitet signala povećava proporcionalno s količinom proteina u rasponu masa od 10 do 30 μg . Iz tog razloga masa od 25 μg odabrana je kao optimalna količina proteina za nanošenje na gel s obzirom na intenzitet signala koji potječe od proteina i relativno nizak pozadinski signal.

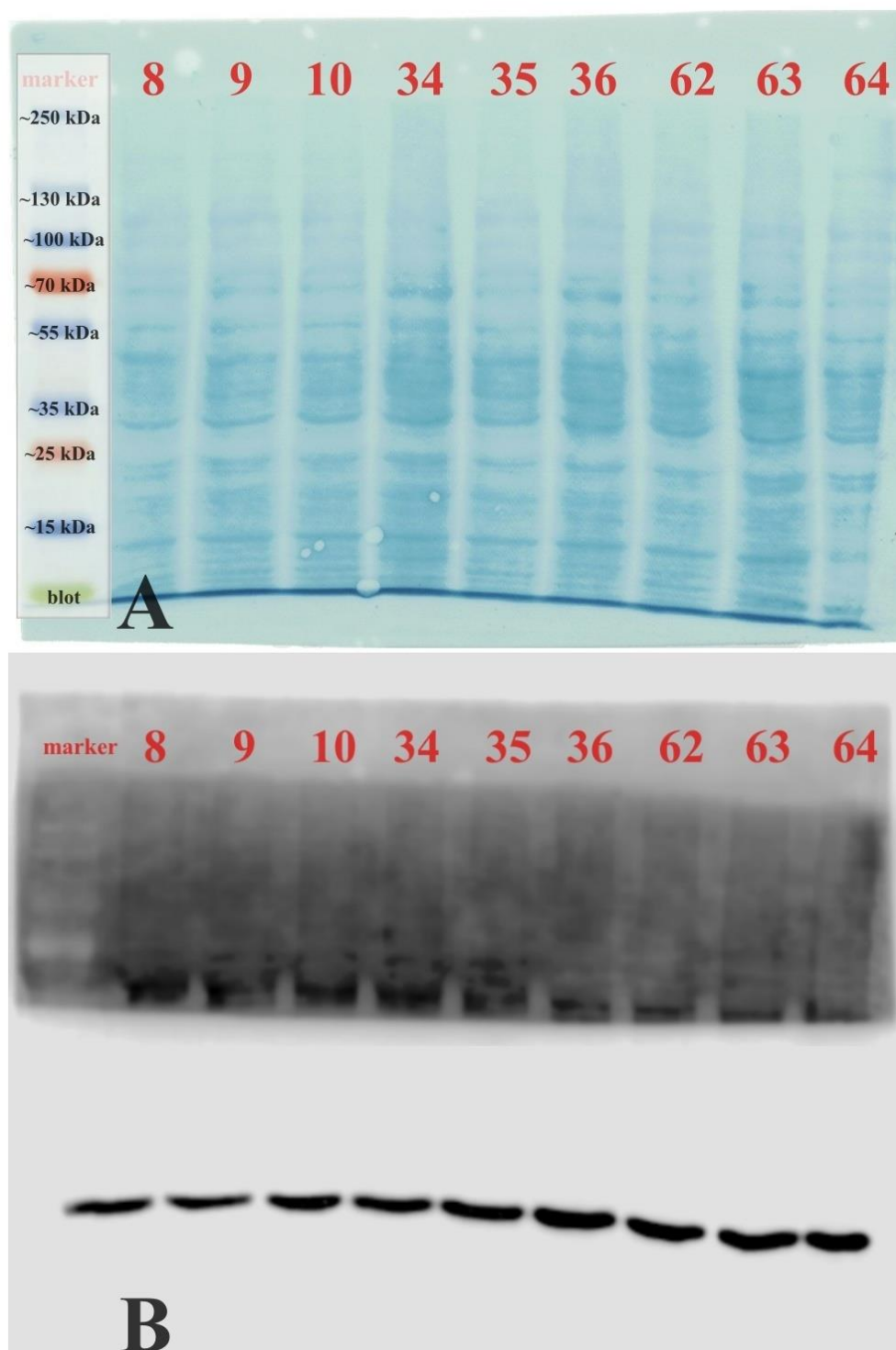


Slika 12. Ovisnost intenziteta kemiluminiscentnog signala o količini proteina u lizatu.

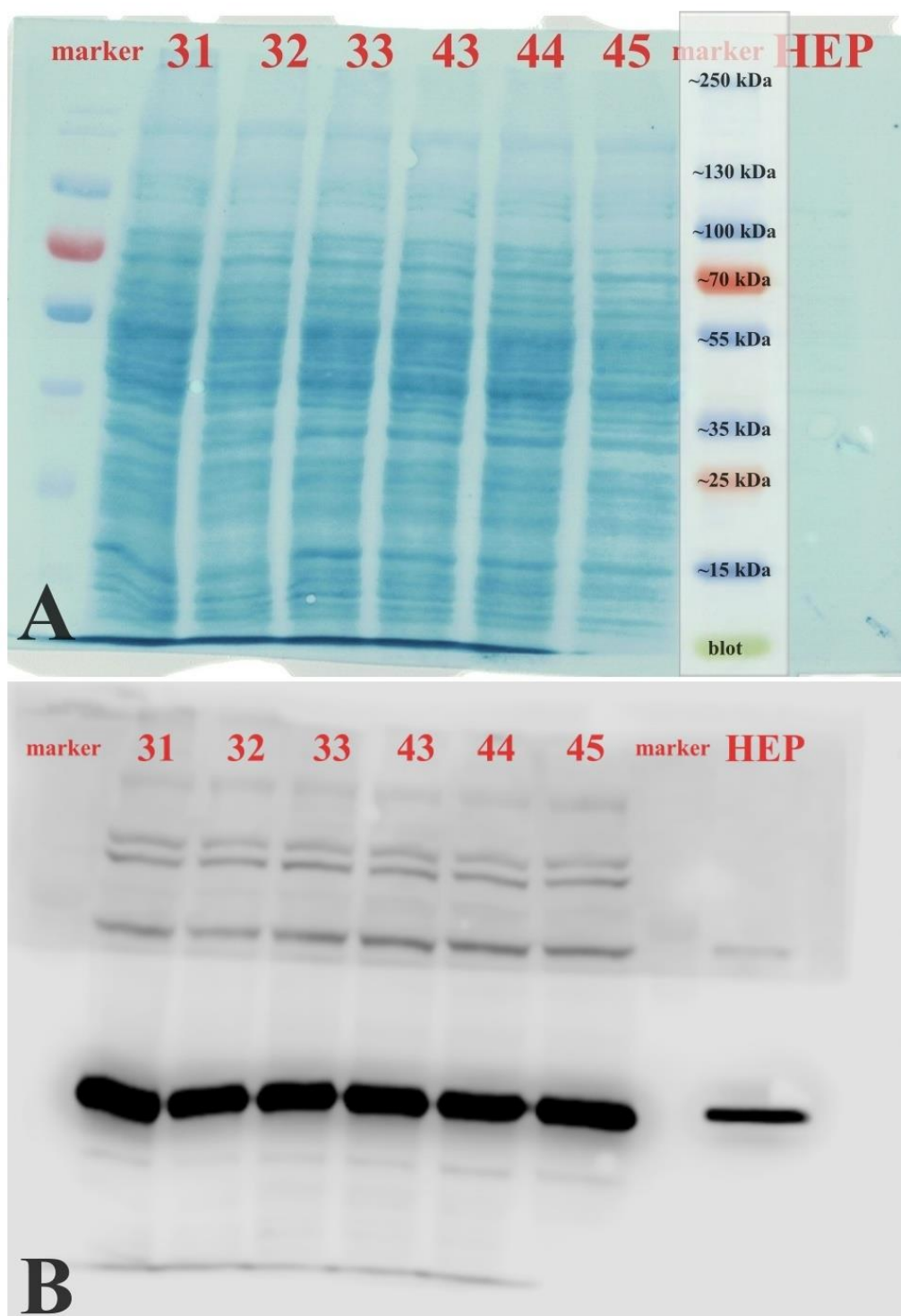
Nakon provedene Western blot analize lizata jetri uspješno je detektiran enzim UGT1A1 što je vidljivo iz položaja vrpca na membranama (malo ispod 70 kDa). Primjeri membrana i obojenih gelova nakon provedene elektroforeze prikazani su na slikama 13, 14 i 15.



Slika 13. A) SDS PAGE gel nakon bojanja *amidoschwarz* bojom. Oznake uzoraka odgovaraju sljedećim tretmanima: 34 i 39 grupa IRI + THC, 67–69 grupa THC, 121–123 kontrolna grupa (netretirane životinje s tumorom). B) Membrana skenirana pomoću Li-Cor instrumenta i *ImageStudioLite* programa.



Slika 14. A) SDS PAGE gel nakon bojanja *amidoschwarz* bojom. Oznake uzoraka odgovaraju sljedećim tretmanima: 8–10 grupa IRI, 34–36 grupa IRI + THC, 62–64 grupa THC. B) Membrana skenirana pomoću Li-Cor instrumenta i *ImageStudioLite* programa.



Slika 15. A) SDS PAGE gel nakon bojanja *amidoschwarz* bojom. Uzorci 31–33 i 43–45 spadaju u grupu IRI + THC. Oznaka HEP odnosi se na lizat HepG2 staničnih linija. B) Membrana skenirana pomoću Li-Cor instrumenta i *ImageStudioLite* programa.

Uz očekivanu vrpcu također su detektirani i proteini većih molekularnih masa (vidljivo na slikama 14 i 16). Budući da je korišteno anti-UGT protutijelo specifično za izoformu UGT1A1, a vrpce viših molekularnih masa ne sugeriraju degradaciju proteina, pretpostavlja se da je došlo do nespecifičnog vezanja protutijela. Ovu pretpostavku podržava i činjenica da je riječ o poliklonskom protutijelu. Poliklonska protutijela su mješavina heterogenih protutijela koja prepoznaju i vežu se na različite epitope istog antigena, dok monoklonska protutijela prepoznaju isti epitop antigena. Iz tog su razloga poliklonska protutijela podložnija nespecifičnom vezanju.

Glavni problem Western blot analize bila je optimizacija detekcije enzima UGT1A1 za kvantitativnu analizu. Pozadinski signal u svim uvjetima bio je vrlo visok i varijabilan. Membrana na slici 14 inkubirana je u koncentriranijoj otopini protutijela za enzim UGT1A1 (primarno protutijelo razrijeđeno u omjeru 1:3000 u otopini za blokiranje, a sekundarno u omjeru 1:4000), dok su membrane na slikama 13 i 15 inkubirane u manje koncentriranoj otopini UGT1A1 protutijela (i primarno i sekundarno protutijelo razrijeđeni u omjeru 1:5000 u otopini za blokiranje). U ovom slučaju vidljivo je smanjenje intenziteta pozadinskog signala, no on je i dalje ostao iznimno velik. Daljnje varijacije uvjeta nisu rezultirale značajnim smanjenjem pozadinskog signala (blokiranje membrana u 5% otopini mlijeka u 10x TBS-T puferu, variranje koncentracije Tweena u 10x TBS-T puferu (0,1% i 0,5%), varijacije trajanja inkubacije s primarnim protutijelima (1h ili 3h na sobnoj temperaturi, preko noći na 4°C), duga ispiranja u 10x TBS-T puferu između svakog koraka, promjena supstrata za HRP, nitrocelulozna membrana umjesto PVDF) te su uvjeti opisani u poglavlju Eksperimentalni dio odabrani kao optimalni. Na gelu i membrani prikazanim na slici 16 analiziran je i lizat HepG2 staničnih linija (stanične linije tumora jetre). Budući da je matrica lizata tkiva, unatoč centrifugiranju i odvajanju supernatanta, kompleksnijeg sastava od lizata staničnih linija, ideja je bila provjeriti hoće li visoki pozadinski signal izostati kod uzorka staničnih linija i, ako da, pripisati visoki pozadinski signal nečistoćama kao što su krv i lipidi u lizatima tkiva. Intenzitet pozadinskog signala i dalje je ostao visok i u slučaju HepG2 uzorka te je stoga zaključeno da kompleksna matrica uzorka ne igra ključnu ulogu u stvaranju visokog pozadinskog signala.

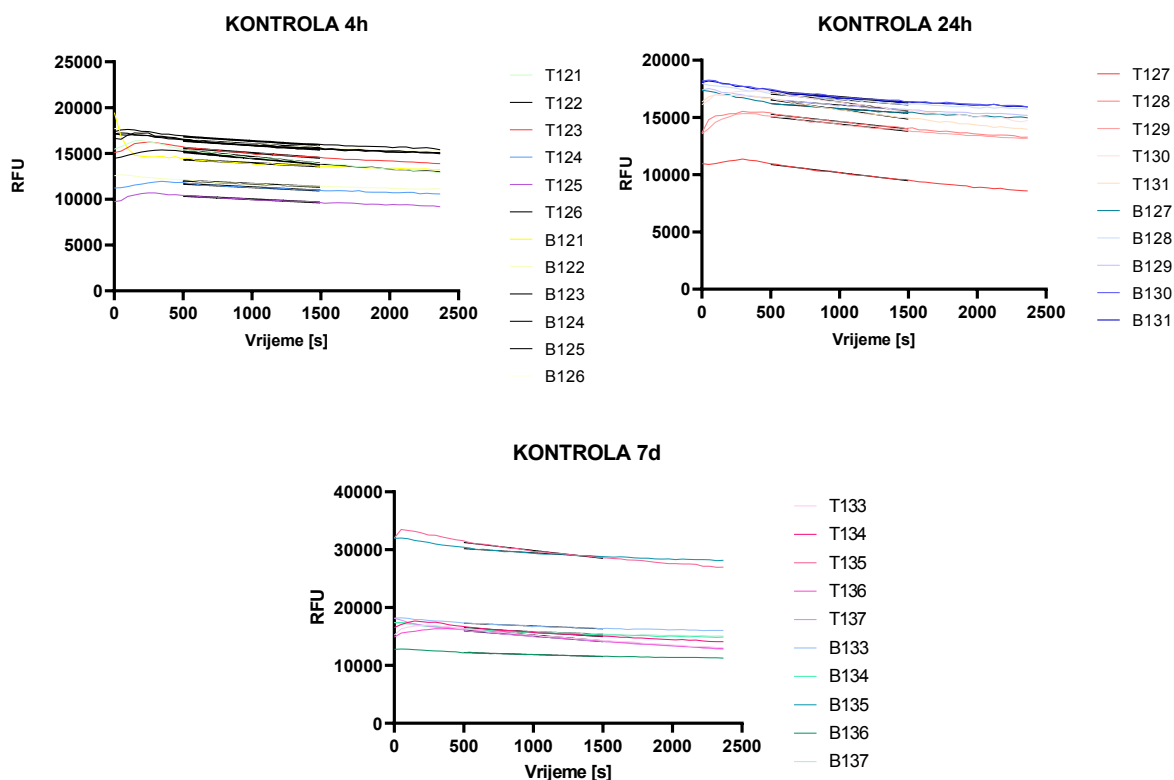
Na prikazanim membranama, na kojima su analizirani primjerci iz svih grupa uzoraka, vizualno nije primijećena značajna promjena u ekspresiji, no zbog lošeg omjera signala ne može se isključiti postojanje malih promjena neprimjetnih golom oku. S obzirom na već raniju konstataciju da u fazi II metaboličkih reakcija i SN-38 i THC-COOH glukuronidira UGT1A1⁹,

očekivano je da bi njihova eventualna kompeticija za isti enzim mogla rezultirati promjenjenama u njegovoj ekspresiji. Istraživanje Gagnon *i sur.* pokazalo je da ekspresija enzima UGT1A1 varira u uzorcima tumora debelog crijeva (u 82% uzoraka količina UGT1A1 mRNA je vrlo niska ili nezamjetna, a u 18% dolazi do prekomjerne ekspresije) te da važnu ulogu u represiji transkripcije igra metilacija *UGT1A1* promotora. Metilacija promotora odražava se na djelotvornost irinotekana, jer u slučaju metiliranog i reprimiranog promotora i nedostatka enzima UGT1A1 SN-38 se ne može prevesti u inaktivnu formu glukuronidacijom.⁵⁸ Basseville *i sur.* dokazali su da SN-38 aktivira nuklearni receptor SXR (*steroid and xenobiotic receptor*) u staničnim linijama tumora debelog crijeva i tumora jetre što rezultira stimulacijom ekspresije *CYP3A4* i *UGT1A1* gena te posljedično može rezultirati pojačanom rezistencijom na djelovanje irinotekana.⁵⁹ Iako ekspresija izmjerena u ovom radu naočigled ne ovisi o tretmanu, ili promjene nisu detektirane zbog prevelike pozadine, koncentracija i aktivnost enzima nisu regulirane samo njegovom ekspresijom, već i posttranslacijskim modifikacijama, alosteričkim modulatorima, interakcijom enzima s njegovim metabolitima (npr. negativni *feedback*) i sličnim parametrima koji u ovom slučaju nisu proučavani, a mogli bi imati utjecaja.

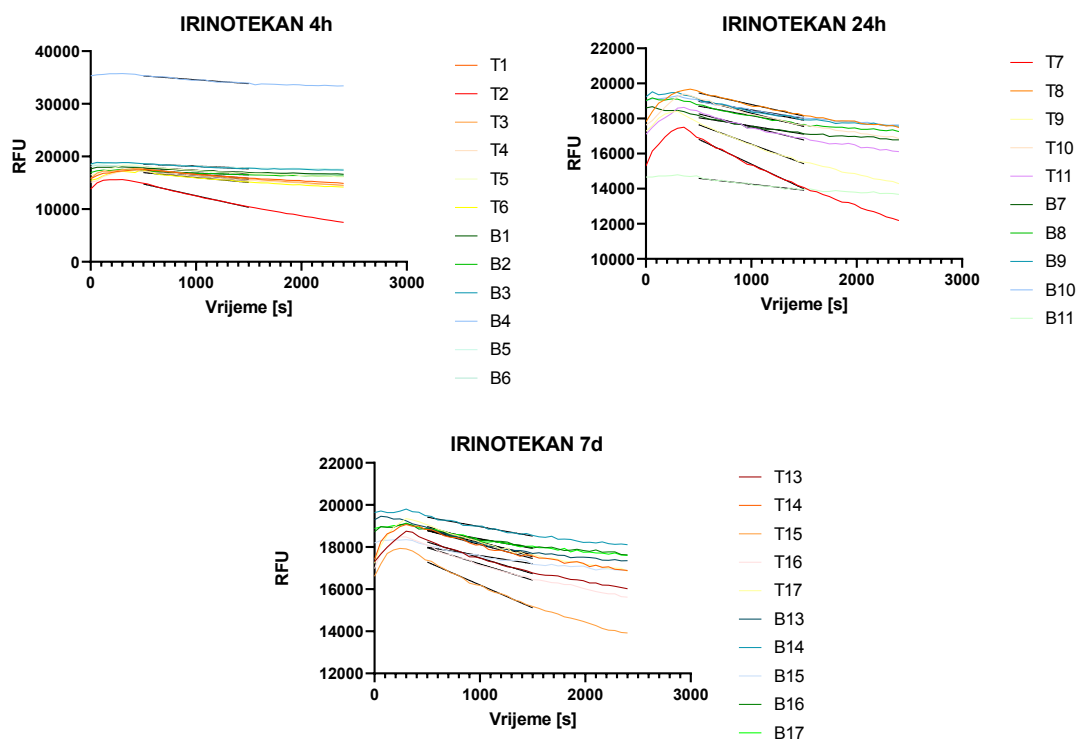
Na temelju GAPDH vrpce i signala prikazanih na slici 11 i pripadajućeg grafa na slici 12, može se zaključiti da je količina od 25 µg proteina pogodna za nanošenje na gel i daljnju elektroforetsku i Western blot analizu. Kvalitetan signal proteina i nizak pozadinski signal sugeriraju da su uzorci pravilno priređeni. Također, potvrđeno je da je anti-GAPDH protutijelo ispravno i dobro radi. S druge strane, anti-UGT1A1 protutijelo nije pružilo zadovoljavajuće rezultate. Zbog previsokog i varijabilnog pozadinskog signala nije moguće kvantificirati signal enzima niti dati procjenu jeli došlo do promjene ekspresije u jetri miševa nakon tretmana irinotekanom, THC-om i njihovom kombinacijom. U budućim analizama bilo bi dobro isprobati anti-UGT1A1 protutijelo drugog proizvođača. Osim toga, mogla bi se ispitati ekspresija gena mjerenjem razine mRNA q-PCR-om (kvantitativni ili real-time PCR).

4.2. Relativna aktivnost izoenzima UGT

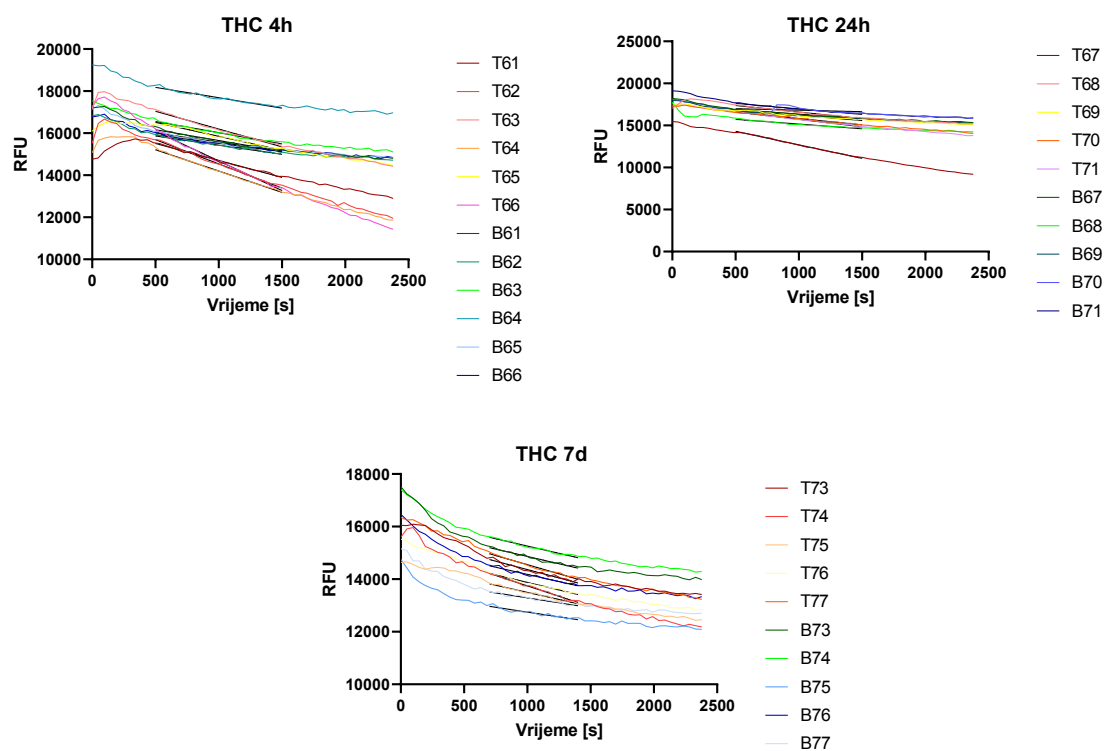
Vremenski tijek smanjenja intenziteta fluorescencije supstrata UGT praćen je kako bi se odredila relativna aktivnost izoenzima UGT u tkivima jetre tretiranih miševa. Na slikama 16, 17, 18 i 19 prikazane su reakcijske krivulje izmjerenih intenziteta fluorescencije u vremenu od 40 minuta s označenim područjem linearnosti nakon računalne obrade za sve skupine.



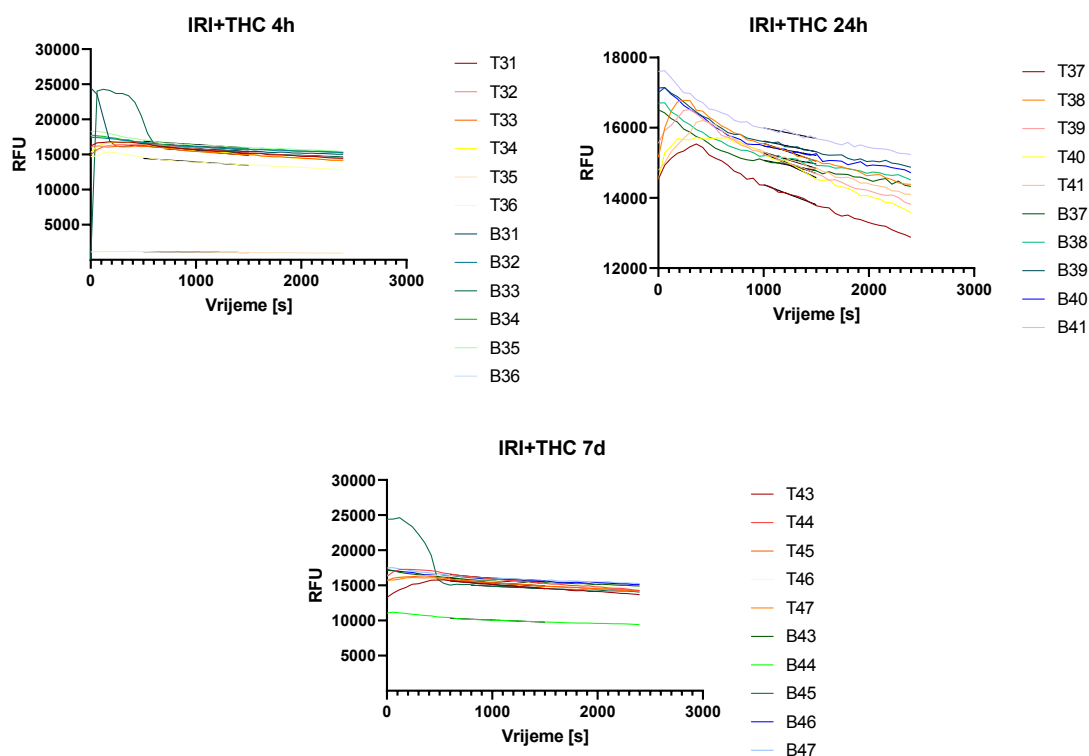
Slika 16. Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije supstrata UGT određena u uzorcima jetri kontrolnih miševa žrtvovanih 4 sata, 24 sata i 7 dana nakon početka tretmana. Koristeći programski paket GraphPad Prism za svaku reakcijsku krivulju određeno je područje linearnosti. T – test uzorak; B – blank uzorak



Slika 17. Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije supstrata UGT određena u uzorcima jetri miševa tretiranih irinotekanom i žrtvovanih 4 sata, 24 sata i 7 dana nakon prve primjene irinotekana. Koristeći programski paket GraphPad Prism za svaku reakcijsku krivulju određeno je područje linearnosti. T – test uzorak; B – blank uzorak



Slika 18. Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije supstrata UGT određena u uzorcima jetri miševa tretiranih Δ -9-tetrahidrokanabinolom (THC) i žrtvovanih 4 sata, 24 sata i 7 dana nakon prve primjene irinotekana. Koristeći programski paket GraphPad Prism za svaku reakcijsku krivulju određeno je područje linearnosti. T – test uzorak; B – blank uzorak.



Slika 19. Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije supstrata UGT određena u uzorcima jetri miševa tretiranih kombinacijom irinotekana i Δ -9-tetrahidrokanabinola (IRI+THC) i žrtvovanih 4 sata, 24 sata i 7 dana nakon prve primjene irinotekana. Koristeći programski paket GraphPad Prism za svaku reakcijsku krivulju određeno je područje linearnosti. T – test uzorak; B – blank uzorak.

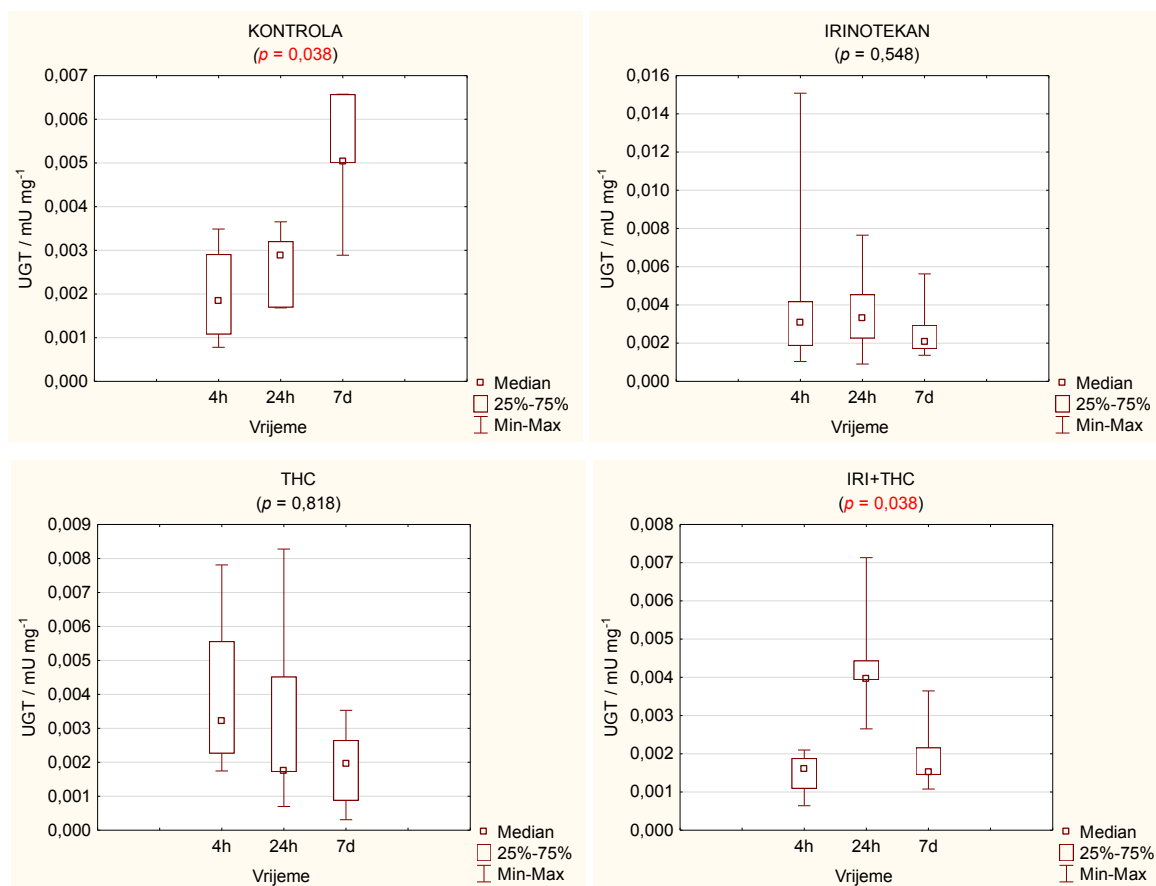
Kako bi se ostvario precizniji izračun G_t (specifični intenzitet fluorescencije) vrijednosti od principa navedenog u uputstvima proizvođača korištenog komercijalnog kompleta (*UGT Activity Assay / Ligand Screening Kit*), dobiveni podaci analizirani su u programu GraphPad Prism. Na reakcijskim krivuljama provedena je linearna regresija u linearnom području krivulje koje se nalazi između 500 i 1500 sekundi (iznimke su krivulje dobivene setom podataka iz skupina THC (7 dana) i IRI+THC (24h). Oduzimanjem vrijednosti nagiba pravca uzorka (T) i vrijednosti nagiba pravca njemu pripadajuće kontrolne reakcije odnosno blanka (B) dobivene su G_t vrijednosti za svaki uzorak. Vrijednost G_t pridružena je jednadžbi baždarnog pravca (prikazan na slici 21) kako bi se izračunala količina utrošenog supstrata te u konačnici relativna aktivnost UGT izoenzima u uzorcima u kojima je ukupna koncentracija proteina iznosila $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$. Vrijednosti relativnih aktivnosti izoenzima UGT za uzorke iz pojedine skupine prikazane su u tablici D1 u Dodatku.

Za podatke iz iste skupine (set uzoraka iz pojedine skupine koji su prikupljeni u istom vremenskom periodu od početka tretmana) učinjena je deskriptivna statistika uporabom sedam parametara: aritmetička sredina, medijan, minimum, maksimum, prva kvartila (Q1), treća kvartila (Q3) i standardna devijacija. Dobiveni podatci prikazani su u tablici D2 u Dodatku.

Normalnost distribucije rezultata mjerenja UGT aktivnosti unutar pojedinog seta uzoraka testirana je Shapiro-Wilkovim W testom. Shapiro-Wilk test provjerava nultu hipotezu da su analizirani uzorci normalno distribuirani (prema Gaussovoj krivulji). Za grupu uzoraka računa se vrijednost p (u slučaju Shapiro-Wilkova testa ta vrijednost se još označava i s W) koja se uspoređuje s prethodno definiranom α vrijednošću koja predstavlja razinu značajnosti. Za vrijednost α najčešće se uzima 0,05. Ukoliko je vrijednost p veća od α , potvrđuje se nulta hipoteza i za uzorke se pretpostavlja normalna distribucija. Ako je vrijednost p manja od α , nulta hipoteza se odbacuje te se smatra da uzorci nisu distribuirani u skladu s Gaussovom krivuljom. Histogrami pomoću kojih je vizualizirana distribucija UGT aktivnosti unutar pojedine skupine uzoraka prikazani su na slikama D1, D2, D3 i D4 u Dodatku. Za sve grupe, osim grupe IRI 4h, vrijednost p veća je od 0,05 te distribuciju vrijednosti unutar tih uzoraka možemo smatrati normalnom. Obzirom na navedeni rezultat analize Shapiro-Wilkovim W testom i činjenicu da je svaka skupina sadržavala 4 do 6 uzoraka što je relativno mali broj uzoraka, za daljnju statističku obradu podataka odabrani su neparametrijski testovi.

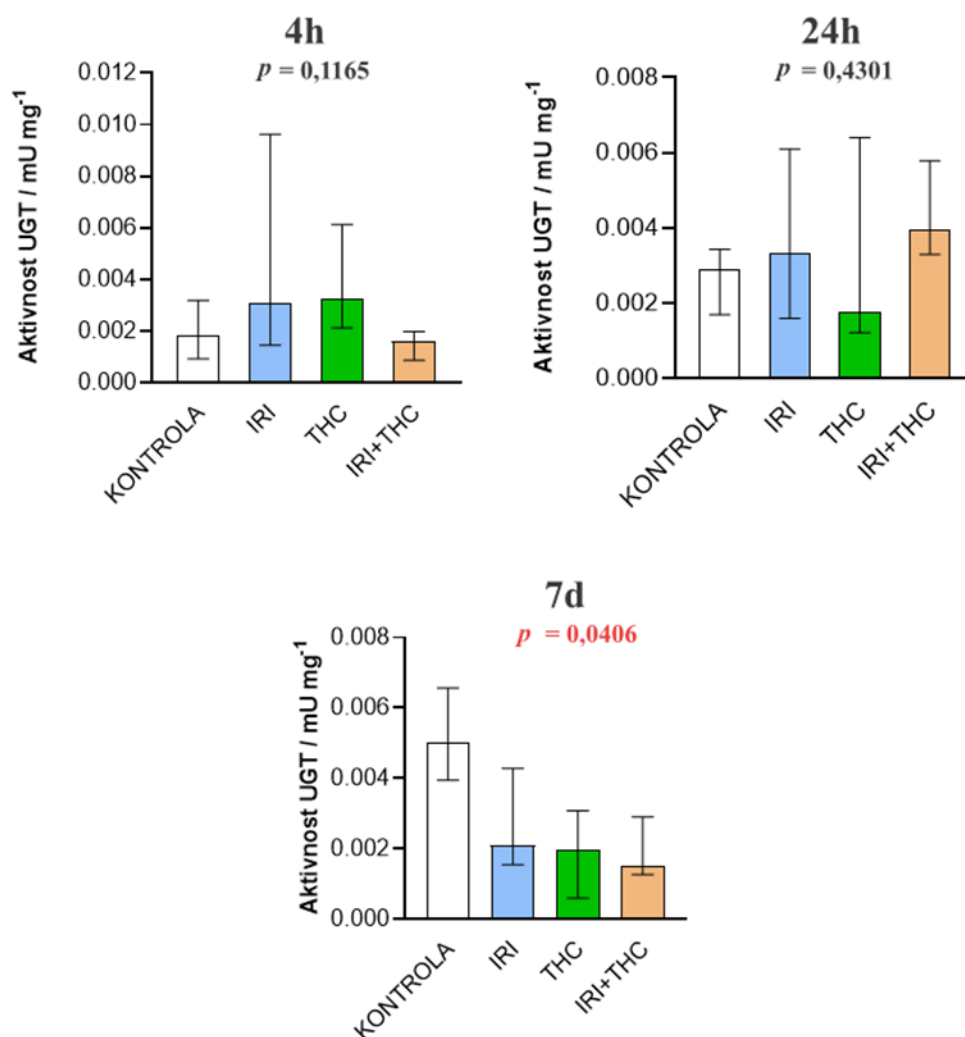
Friedmanovim testom analizirane su razlike unutar pojedine skupine (tretmana) s obzirom na vremensku točku u kojoj je uzorak prikupljen. Sve vrijednosti rangiraju se od

najmanje prema najvećoj, a potom se rangovi iz istog seta zbroje. Ukoliko se sume rangova pojedine skupine bitno razlikuju, vrijednost p će biti vrlo mala i može se zaključiti da se barem jedan set uspoređivanih podataka značajno razlikuje od ostalih. Na slici 20 prikazani su vremenski nizovi za svaku skupinu (tretman). Statističkom analizom utvrđena je vrijednost p manja od 0,05 za kontrolnu skupinu i skupinu miševa tretiranih kombinacijom irinotekana i THC te se medijani aktivnosti UGT između vremenskih perioda znatno razlikuju. Aktivnost UGT enzima kontrolne skupine kontinuirano je rasla u razdoblju od 7 dana. Budući da miševi u kontrolnoj skupini nisu primili nikakav tretman, povećana aktivnost enzima mogla bi se pripisati progresiji tumora. Ipak, aktivnost enzima UGT u tumorskim tkivima najčešće se spominje u kontekstu smanjene ekspresije i aktivnosti tih enzima zbog činjenice da ti enzimi sudjeluju u detoksifikaciji organizma od, između ostalog, i antitumorskih lijekova.^{58,60} U skupini miševa tretiranih kombinacijom irinotekana i THC-a aktivnost enzima UGT bila je najveća nakon 24 sata, a nakon toga pada, te je nakon 7 dana uočena niža vrijednost od vrijednosti određenih nakon tretmana samo irinotekanom ili samo THC-om. Ovakav rezultat podržava ideju da međudjelovanje THC-a i irinotekana može dovesti do sinergičnog pojačanja toksičnosti irinotekana jer će se smanjenjem aktivnosti enzima UGT u organizmu dulje zadržavati toksični SN-38. Naime, poznato je da je faza glukuronidacije vrlo važna u biotransformaciji irinotekana jer regulira uklanjanje aktivnog metabolita SN-38 dok su nedavno objavljene studije pokazale da bilo kakva izmjena aktivnosti UGT1A1, bilo genetskog podrijetla ili na neki drugi način, određuje ravnotežu između kliničke učinkovitosti i tolerancije na irinotekan.⁶¹



Slika 20. Aktivnost izoenzima UGT u jetri miševa s induciranim singeničnim tumorom crijeva u vremenskim intervalima od 4 sata do 7 dana. Značajnost promjena aktivnosti UGT za svaku skupinu životinja testirana je uporabom Friedmanovog testa ($p < 0,05$).

Kruskal-Wallisov test korišten je kako bi se ispitalo postoji li razlika između grupa (tretmana) za aktivnost UGT unutar jednog vremenskog perioda. Kao i kod Friedmanovog testa, vrijednosti iz svakog seta podataka se rangiraju, a zatim se rangovi istog seta podataka sumiraju. Što se više vrijednosti suma razlikuju, to je p manji. Kruskal-Wallisov test utvrđuje razlikuju li se medijani dviju ili više skupina te postoji li značajna razlika između grupa. No, ukoliko razlika između grupa postoji, ovaj test ne ukazuje na to koje točno grupe se međusobno značajno razlikuju. Kako bi se utvrdilo koje točno grupe se značajno razlikuju, potrebno je provesti post-hoc test, poput Dunnovog testa i Mann-Whitneyevog U testa. Na slici 21 prikazana je usporedba aktivnosti UGT između različitih tretmana unutar istog vremenskog perioda. Kruskal-Wallisovim testom utvrđena je vrijednost p manja od 0,05 za vremenski period od 7 dana što ukazuje na postojanje statistički značajnih razlika između pojedinih skupina u toj vremenskoj točki. Post-hoc Dunnov test nije ukazao na stohastičku dominaciju ijedne grupe nad drugom za vremenski period od 7 dana (tablica D3 u Dodatku), dok je Mann-Whitneyevim U testom utvrđeno da aktivnosti UGT u miševa tretiranih THC-om i kombinacijom irinotekana i THC-a značajno odstupaju od aktivnosti UGT kontrolnih miševa (tablica D4 u Dodatku).



Slika 21. Relativna promjena aktivnosti uridin-difosfat glukuroniltransferaza (UGT) u jetri miševa s induciranim singeničnim tumorom crijeva nakon primjene irinotekana (IRI; i.p. 60 mg kg⁻¹), Δ -9-tetrahidrokanabinola (THC; p.o. 7 mg kg⁻¹) i kombinacije irinotekana i Δ -9-tetrahidrokanabinola (IRI+THC). Skupina koja nije bila izložena nikakvim tretmanima služila je kao kontrola. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (N = 4–6). Razlika između tretiranih skupina unutar svakog vremenskog perioda testirana je uporabom Kruskal-Wallisova testa ($p < 0,05$).

Kao što je već ranije spomenuto, faza glukuronidacije izuzetno je važna za metabolizam SN-38 jer regulira njegovo uklanjanje. Što se tiče kanabinoida, u odnosu na metaboličke reakcije faze I, vrlo malo se zna o fazi II metabolizma klasičnih kanabinoida. Mazur *i sur.* navode da Δ -9-tetrahidrokanabinol nije supstrat enzima UGT što sugerira da su prethodne biotransformacije THC-a nužne kako bi se dobiveni metaboliti mogli glukuronidirati,⁶² a za te reakcije zaduženi su citokromi CYP2C9 i CYP3A4.⁶³ Glavni produkt metabolizma CYP2C9, THC-OH, glukuronidira se pomoću UGT1A9 i UGT1A10 enzima, dok THC-COOH glukuronidiraju UGT1A1 i UGT1A3 enzimi. Budući da THC posjeduje skupinu OH, ali nije supstrat enzima UGT, čini se da dodatna skupina OH služi kao mjesto glukuronidacije ili utječe na vezanje supstrata u aktivno mjesto enzima i potiče katalizu. Oksidacijom dodatne skupine OH u skupinu COOH dobiveni metabolit više nije supstrat 1A9 i 1A10 enzima UGT nego ga prepoznaju UGT1A1 i UGT1A3. Ovi enzimi stoga moraju biti tolerantniji na uvođenje negativnog naboja. Glukuronidacijom THC-COOH nastaje *O*-esterski glukuronid, glavni metabolit THC-a u urinu,⁶² što znači da navedeni enzimi imaju važnu ulogu u izlučivanju THC-a iz organizma. Unatoč općem mišljenju da je glukuronidacija proces inaktivacije lijekova, neki spojevi, poput glukuronida morfija su aktivni spojevi te se stoga ne može isključiti mogućnost da su neki metaboliti faze II metabolizma kanabinoida također aktivni spojevi.⁶² U svom radu, Bouquie *i sur.* navode da pojedini kanabinoidi *in vitro* mogu inhibirati članove obitelji UGT.⁶¹ Istraživanja su pokazala da CBD može inhibirati UGT1A9 i UGT2B7, dok CBN inhibira 1A8, 1A9 i 1A10, a aktivira 2B7 enzime UGT.⁶⁴ U odnosu na THC, dostupno je puno više podataka za CBD od kada je 2018. godine FDA odobrila lijek baziran na CBD-u za liječenje epilepsije kod djece, što je dovelo do povećanog interesa za ovaj kanabinoid.⁶⁵

Rezultati nedavno objavljene pilot studije ukazali su na pojačano izlučivanje THC-COOH u urinu štakora koji su tretirani kombinacijom irinotekana i THC-a u odnosu na one tretirane samo THC-om. Istodobno je utvrđeno sinergističko pojačanje toksičnosti (sistemske toksičnosti, hepatotoksičnosti, genotoksičnosti) irinotekana nakon istovremenog unosa THC-a^{5,6,7}. Navedeni rezultati ukazali su na postojanje potencijalno zanimljivih interakcija, poput kompeticije irinotekana i THC-a za UGT enzime, koje bi trebalo dodatno istražiti i razjasniti.

U postojećoj literaturi nema dostupnih izvještaja o međudjelovanju preparata bogatih THC-om i citostatika. Svi dosad provedeni klinički pokusi podrazumijevali su da se pripravci kanabisa daju kao “add-on” terapija uz istovremenu primjenu standardnih lijekova te su koncentracije THC-a u tim pripravcima sukladne medicinskom kanabisu, ali ne i ilegalnim

preparatima. Iako u ovakvim ispitivanjima nisu uočene relevantne interakcije između preparata medicinskog kanabisa i standardnih lijekova (kao što je to navedeno u istraživanju Englsa *i sur.*)⁴, za pretpostaviti je da će veće oralne doze THC-a rezultirati većom sustavnom izloženošću, a time i većim rizikom za interakcije.

Istraživanje provedeno u ovom radu, gdje je količina THC-a u preparatu i nekoliko puta veća od one u medicinskom kanabisu, dio je studije koja uključuje i histopatološke analize tumorskog tkiva i tkiva jetre te analitičko određivanje koncentracije testiranih spojeva u krvi miševa sa singeničnim tumorom debelog crijeva. Budući da navedene analize još nisu završene, u obzir treba uzeti da su moguće metastaze, posebice na jetri, mogle imati utjecaja na dobivene rezultate mjerenja ekspresije i relativne aktivnosti UGT enzima. Premda su transplantabilni animalni modeli često označavani kao „nemetastatski“⁶⁶, injektiranje stanične linije CT26 može rezultirati i lokalnim tumorom i metastazama.⁶⁷

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu mjerena je razina ekspresije enzima UGT1A1 Western blot analizom i relativna aktivnost izoenzima UGT u uzorcima jetri miševa sa singeničnim tumorom debelog crijeva koji su bili podijeljeni u nekoliko skupina: kontrolna skupina (miševi koji nisu primili nikakav tretman), miševi tretirani irinotekanom, miševi tretirani THC-om i miševi tretirani kombinacijom irinotekana i THC-a.

Na razini ekspresije nije uočena primjetna razlika između tretmana, no korišteno primarno protutijelo za UGT1A1 nije bilo adekvatno te je dobiven visok i varijabilan pozadinski signal koji je onemogućio kvantifikaciju signala. Ne može se isključiti mogućnost da je razlika u ekspresiji prisutna, ali nije detektirana u uvjetima u kojima su provedeni eksperimenti te bi, za bolji uvid u ekspresiju enzima UGT1A1, trebalo provesti q-PCR analizu (kvantitativni ili real-time PCR) kojom bi se ustanovila količina mRNA ispitivanog enzima u uzorku.

Relativna aktivnost izoenzima UGT izmjerena je korištenjem komercijalnog kompleta *UGT Activity Assay* (BioVision) te su dobiveni podaci statistički obrađeni. Rezultati su pokazali da je medijan aktivnosti izoenzima u skupini tretiranoj kombinacijom THC-a i irinotekana nakon 7 dana najniži u odnosu na aktivnost u ostalim skupinama. Ovaj rezultat sugerira da kombinirana primjena irinotekana i preparata bogatih THC-om kroz duži vremenski period može dovesti do smanjenja aktivnosti enzima UGT, a posljedično i povećanja toksičnosti irinotekana. Šira slika i uvid u moguće razloge ovakvih rezultata bit će dobiveni nakon histopatoloških analiza tumorskog tkiva i tkiva jetre te određivanja koncentracije testiranih spojeva u krvi miševa.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. *WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE., WORLD CANCER REPORT : Cancer research for cancer development.* IARC, 2020., str. 344–354.
2. <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-raka-2020/> (datum pristupa 22. siječnja 2020.)
3. T. L. Mortimer, T. Mabin, A. M. Engelbrecht, *Future Oncol.* **15** (2019) 1035–1049.
4. F. K. Engels, F. A. de Jong, A. Sparreboom, R. A. A. Mathot, W. J. Loos, J. J. E. M. Kitzen, P. de Bruijn, J. Verweij, R. H. J. Mathijssen, *Oncologist* **12** (2007) 291–300.
5. A. Lucić Vrdoljak, N. Fuchs, A. Mikolić, S. Žunec, I. Brčić Karačonji, A. Jurič, L.J. Prester, V. Micek, M. Neuberg, S. Čanović, G. Mršić, N. Kopjar, *Molecules* **23** (2018) 1–25.
6. N. Kopjar, N. Fuchs, S. Žunec, A. Mikolić, V. Micek, G. Kozina, A. Lucić Vrdoljak, I. Brčić Karačonji, *Molecules* **24** (2019) 1–18.
7. L. Prester, A. Mikolić, A. Jurič, N. Fuchs, M. Neuberg, A. Lucić Vrdoljak, I. Brčić Karačonji, *Chem. Biol. Interact.* **294** (2018) 1–29.
8. R. H. J. Mathijssen, R. J. Van Alphen, J. Verweij, W. J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, *Clin. Cancer. Res.* **7** (2001) 2182–2194
9. N. Kopjar, N. Fuchs, I. Brčić Karačonji, S. Žunec, A. Katić, G. Kozina, A. Lucić Vrdoljak, *Clin. Drug Investig.* **40** (2020) 775–787
10. E. R. Fearon, B. Vogelstein, *Cell* **61** (1990) 759–767
11. R. L. Johnson, J. C. Fleet, *Cancer Metastasis Rev.* **32** (2013) 39–61
12. *Encyclopedia of Cancer*, 1957–1957, doi:10.1007/978-3-642-16483-5_3241
13. <https://www.healthline.com/health/digestive-health/how-long-are-your-intestines> (datum pristupa 5. siječnja 2021.)
14. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/familial-adenomatous-polyposis/> (datum pristupa 5. siječnja 2021.)
15. H. F. Lodish, A. Berk, C. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, 2008, poglavlja 14, 15 i 23

16. <https://slideplayer.com/slide/12419291/74/images/54/The+Multistep+Model+of+Cancer+Development.jpg> (datum pristupa 5. siječnja 2021.)
17. S. E. Gould, M. R. Junttila, F. J. de Sauvage, *Nat. Med.* **21** (2015) 431–439
18. R. C. Oliveira, A. M. Abrantes, J. G. Tralhão, M. F. Botelho, *Animal Model. Exp. Med.* **3** (2020) 1–8.
19. F. Bürtin, C. S. Mullins, M. Linnebacher, *World J. Gastroenterol.* **26** (2020) 1394–1426.
20. D. Golovko, D. Kedrin, Ö. H. Yilmaz, J. Roper, *Expert Opin Drug Discov.* **10** (2015) 1217–1229.
21. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/colorectal-cancer-cell-lines.html> (10. siječnja 2021.)
22. A. R. Moser, H. C. Pitot, W. F. Dove, *Science* **247** (1990) 322–324.
23. M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **88** (1966) 3888–3890.
24. G. G. Chabot, *Clin. Pharmacokinet.* **33** (1997) 245–259.
25. Y. H. Hsiang, L. F. Liu, *Cancer Res.* **48** (1988) 1722–1726.
26. <https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html> (pristup 13.01.2021.)
27. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2005, poglavlje 24, 935–938.
28. Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg, *Biochim. Biophys. Acta* **1400** (1998) 83–106.
29. Y. H. Hsiang, M. G. Lihou, L. F. Liu, *Cancer Res.* **49** (1989) 5077–5082.
30. M. R. Redinbo, L. Stewart, P. Kuhn, J. J. Champoux, W. G. J. Hol, *Science* **279** (1998) 1504–1513.
31. <https://en.wikipedia.org/wiki/Camptothecin> (datum pristupa 13. siječnja 2021.)
32. S. Marsh, J. M. Hoskins, *Pharmacogenomics* **11** (2010) 1003–1010.
33. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/gilbert-syndrome/> (datum pristupa 14. siječnja 2021.)
34. C. Fuchs, E. P. Mitchell, P. M. Hoff, *Cancer Treat. Rev.* **32**. (2006) 491–503.
35. D. Machover, *Cancer* **80** (1997) 1179–1187.
36. L. B. Saltz, J. V. Cox, C. Blanke, L. S. Rosen, L. Fehrenbacher, M. J. Moore, J. A. Maroun, S. P. Ackland, P. K. Locker, N. Pirota, G. L. Elfring, L. L. Miller, *N. Engl. J. Med.* **343** (2000) 905–913.

37. U. Vanhoefer, A. Harstrick, W. Achterrath, S. Cao, S. Seeber, Y. M. Rustum, *J. Clin. Oncol.* **19** (2001) 1501–1518.
38. F. Gao, Q. Yuan, L. Gao, P. Cai, H. Zhu, R. Liu, Y. Wang, Y. Wei, G. Huang, J. Liang, X. Gao, *Biomaterials* **35** (2014) 8854–8866.
39. W. E. Hardman, M. P. Moyer, I. L. Cameron, *Br. J. Cancer.* **86** (2002) 983–988.
40. O. Kovalchuk, I. Kovalchuk, *Cell Cycle* **19** (2020) 961–989.
41. L. A. Parker, M. Kwiatkowska, R. Mechoulam, *Physiol. Behav.* **87** (2006) 66–71.
42. K. M. King, A. M. Myers, A. J. Soroka–Monzo, R. F. Tuma, R. J. Tallarida, E. A. Walker, S. J. Ward, *Br. J. Pharmacol.* **174** (2017) 2832–2841.
43. D. Walsh, K. A. Nelson, F. A. Mahmoud, *Support Care Cancer* **11** (2003) 137–143.
44. B. Kola, E. Hubina, S. A. Tucci, T. C. Kirkham, E. A. Garcia, S. E. Mitchell, L. M. Williams, S. A. Hawley, D. G. Hardie, A. B. Grossman, M. Korbonits, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 25196–25201.
45. A. E. Munson, L. S. Harris, M. A. Friedman, W. L. Dewey, R. A. Carchman, *J. Natl. Cancer. Inst.* **55** (1975) 597–602.
46. P. Massi, A. Vaccani, S. Bianchessi, B. Costa, P. Macchi, D. Parolaro, *Cell. Mol. Life Sci.* **63** (2006) 2057–2066.
47. M. Salazar, A. Carracedo, I. J. Salanueva, S. Hernández–Tiedra, M. Lorente, A. Egia, P. Vázquez, C. Blázquez, S. Torres, S. García, J. Nowak, G. M. Fimia, M. Piacentini, F. Cecconi, P. P. Pandolfi, L. González–Feria, J. L. Iovanna, M. Guzmán, P. Boya, G. Velasco, *J. Clin. Investig.* **119** (2009) 1359–1372.
48. M. Honarmand, F. Namazi, A. Mohammadi, S. Nazifi, *Comp. Clin. Path.* **28** (2019) 165–172.
49. A. Santoro, S. Pisanti, C. Grimaldi, A. A. Izzo, F. Borrelli, M. C. Proto, A. M. Malfitano, P. Gazzero, C. Laezza, M. Bifulco, *Int. J. Cancer* **125** (2009) 996–1003.
50. H. A. Patsos, A. Greenhough, D. J. Hicks, M. Al Kharusi, T. J. Collard, J. D. Lane, C. Paraskeva, A. C. Williams, *Int. J. Oncol.* **37** (2010) 187–193.
51. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/farmakokinetika/metabolizam> (pristup 20. siječnja 2020.)
52. C. D. King, G. R. Rios, M. D. Green, T. R. Tephly, *Curr. Drug Metab.* **1** (2000) 143–161.
53. J. Magdalou, S. Fournel–Gigleux, M. Ouzzine, *Drug Metab. Rev.* **42** (2010) 159–166.

54. W. J. Aston, D. E. Hope, A. K. Nowak, B. W. Robinson, R. A. Lake, W. Joost Lesterhuis, *BMC Cancer* **17** (2017) 1–10.
55. M. H. Meier, *Drug Alcohol Depen.* **179** (2017) 25–31.
56. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Catalog Numbers 23225 and 23227, Doc. Part No. 2161296, Pub. No. MAN0011430, Rev. B.0), datum pristupa 10. veljače 2021.
57. <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K692.pdf> (*UGT Activity Assay / Ligand Screening Kit (Fluorometric)* 2/16 (Catalog # K692-100; 100 Reactions; Store at -20°C), datum pristupa 10. veljače 2021.
58. J. F. Gagnon, O. Bernard, L. Villeneuve, B. Têtu, C. Guillemette, *Clin. Cancer Res.* **12** (2006) 1850–1858.
59. A. Basseville, L. Preisser, S. de Carné Trécesson, M. Boisdron–Celle, E. Gamelin, O. Coqueret, A. Morel, *Mol. Cancer* **10** (2011) 1–12.
60. M. Michael and M. M. Doherty, *J. Clin. Oncol.* **23** (2005) 205–229.
61. R. Bouquié, G. Deslandes, H. Mazaré, M. Cogné, J. Mahé, M. Grégoire, P. Jolliet, *Fundam Clin Pharmacol* **32** (2018) 462–484.
62. A. Mazur, C. F. Lichti, P. L. Prather, A. K. Zielinska, S. M. Bratton, A. Gallus–Zawada, M. Finel, G. P. Miller, A. Radomínska–Pandya, J. H. Moran, *Drug Metab. Dispos.* **37** (2009) 1496–1504.
63. K. Watanabe, S. Yamaori, T. Funahashia, T. Kimuraa, I. Yamamoto, *Life Sci.* **80** (2007) 1415–1419.
64. A. Al Saabi, D. e Allorge, F. L. Sauvage, G. Tournel, J. Gaulier, P. Marquet, N. Picard, *Drug Metab. Dispos.* **41** (2013) 568–574.
65. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms> (datum pristupa: 08. veljače 2021.)
66. C. Khanna, K. Hunter, *Carcinogenesis* **26** (2005) 513–523.
67. H. Kashtan, M. Rabau, J. B. Mullen, A. H. Wong, J. C. Roder, B. Shpitz, H. S. Stern, S. Gallinger, *Surg. Oncol.* **1** (1992) 251–256.

§ 7. DODATAK

Tablica D1. Vrijednosti relativne aktivnosti izoenzima UGT određene u jetri miševa s induciranim singeničnim tumorom crijeva nakon primjene irinotekana (IRI; i.p. 60 mg kg⁻¹), Δ-9-tetrahidrokanabinola (THC; p.o. 7 mg kg⁻¹) i kombinacije irinotekana i Δ-9-tetrahidrokanabinola (IRI+THC). Skupina koja nije bila izložena nikakvim tretmanima služila je kao kontrola.

Vremenski period nakon kojeg su životinje žrtvovane	Specifična aktivnost UGT (mU mg ⁻¹)			
	Kontrola	IRI	THC	IRI + THC
4h	0,0035	0,0031	0,0023	0,0015
4h	0,0014	0,0151	0,0056	0,0017
4h	0,0008	0,0042	0,0024	0,0021
4h	0,0023	0,001	0,004	0,0006
4h		0,0019	0,0017	
4h		0,0033	0,0078	
24h	0,0029	0,0077	0,0083	0,0044
24h	0,0017	0,0009	0,0017	0,0039
24h	0,0017	0,0045	0,0007	0,004
24h	0,0032	0,0023	0,0045	0,0071
24h	0,0037	0,0033	0,0018	0,0027
7d	0,005	0,0014	0,0009	0,0022
7d	0,0029	0,0017	0,0026	0,0036
7d	0,0066	0,0056	0,002	0,0015
7d	0,0066	0,0029	0,0003	0,0015
7d	0,005	0,0021	0,0035	0,0011

Tablica D2. Parametri deskriptivne statistike za vrijednosti relativne aktivnosti UGT.

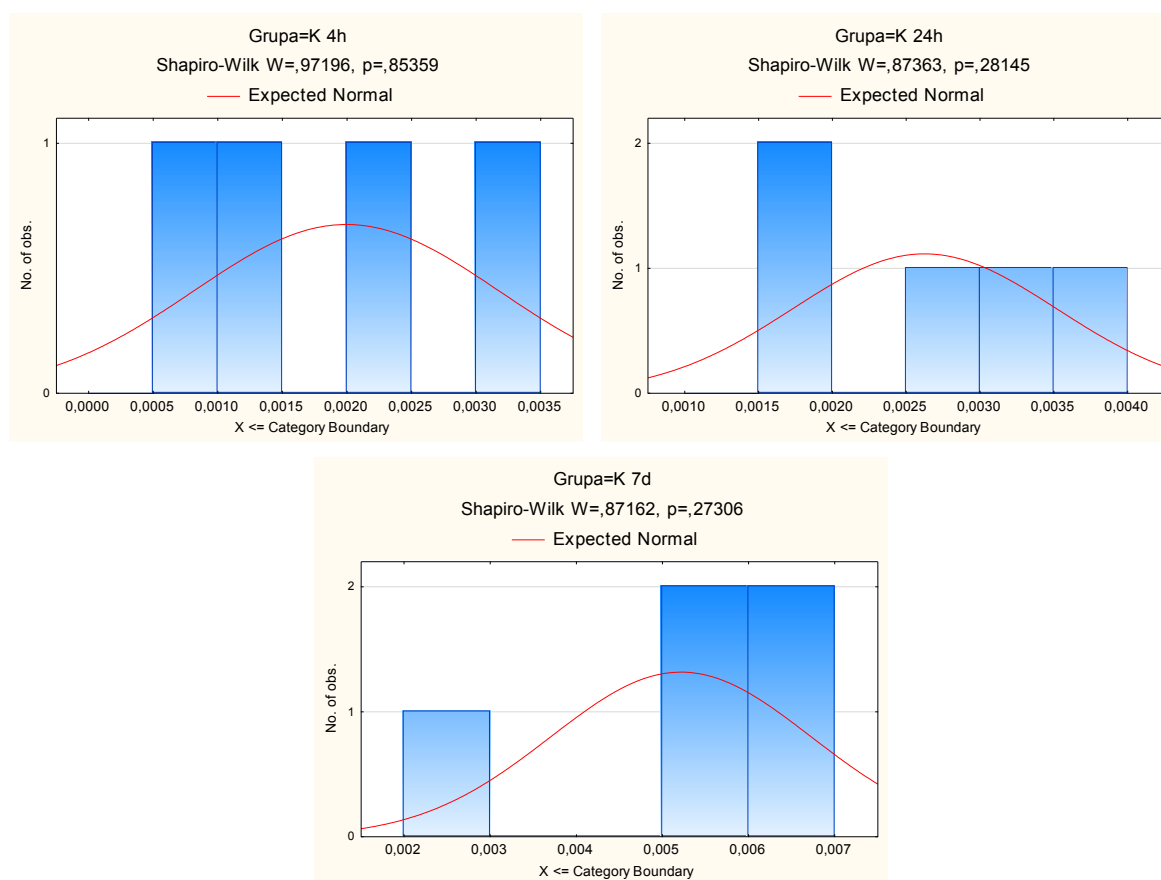
		Grupa = K 4h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	4	0,0020	0,0019	0,0008	0,0035	0,0011	0,0029	0,0012
		Grupa = K 24h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0026	0,0029	0,0017	0,0037	0,0017	0,0032	0,0009
		Grupa = K 7d						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0052	0,0050	0,0029	0,0066	0,0050	0,0066	0,0015
		Grupa = IRI 4h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	6	0,0048	0,0032	0,0010	0,0151	0,0019	0,0042	0,0052
		Grupa = IRI 24h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0037	0,0033	0,0009	0,0077	0,0023	0,0045	0,0026
		Grupa = IRI 7d						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0027	0,0021	0,0014	0,0056	0,0017	0,0029	0,0017
		Grupa = THC 4h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	6	0,0040	0,0032	0,0017	0,0078	0,0023	0,0056	0,0023
		Grupa = THC 24h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0034	0,0018	0,0007	0,0083	0,0017	0,0045	0,0031
		Grupa = THC 7d						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0019	0,0020	0,0003	0,0035	0,0009	0,0026	0,0013
		Grupa = IRI+THC 4h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	4	0,0015	0,0016	0,0006	0,0021	0,0011	0,0019	0,0006
		Grupa = IRI+THC 24h						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0044	0,0040	0,0027	0,0071	0,0039	0,0044	0,0017
		Grupa = IRI+THC 7d						
Varijabla	Broj uzoraka	Srednja vrijednost	Medijan	Minimum	Maksimum	Prva Kvartila	Treća Kvartila	Stand.Dev.
UGT (mU/mg)	5	0,0020	0,0015	0,0011	0,0036	0,0015	0,0022	0,0010

Tablica D3. Rezultati Dunnovog testa za vremenski period od 7 dana (nz = “nije značajno”).

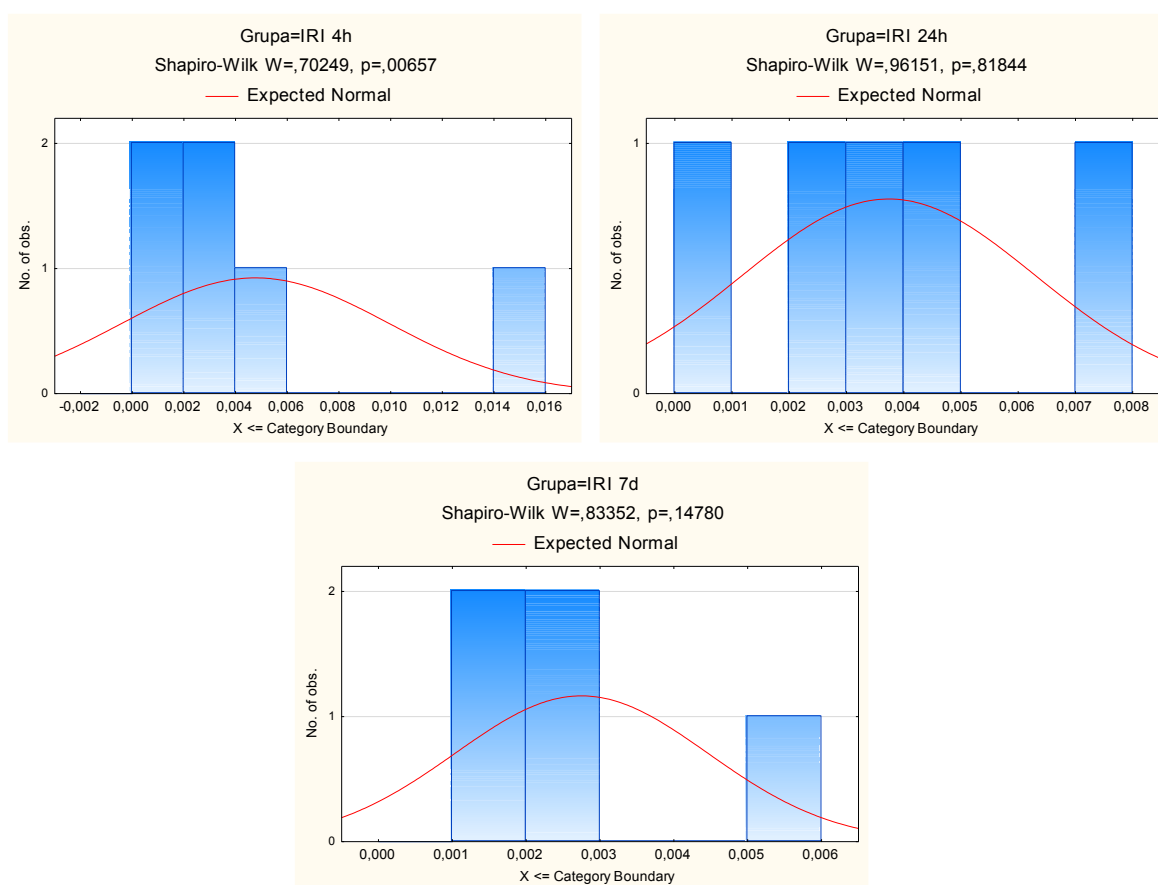
Multiple komparacije	Razlika rangova medijana	Značajnost ?	Sumarno	p
KONTROLA vs. IRI	-4,050	Ne	nz	>0,9999
KONTROLA vs. THC	-5,417	Ne	nz	0,8155
KONTROLA vs. IRI+THC	2,500	Ne	nz	>0,9999
IRI vs. THC	-1,367	Ne	nz	>0,9999
IRI vs. IRI+THC	6,550	Ne	nz	0,4963
THC vs. IRI+THC	7,917	Ne	nz	0,1758

Tablica D4. Rezultati Mann-Whitneyevog U testa za vremenski period od 7 dana.

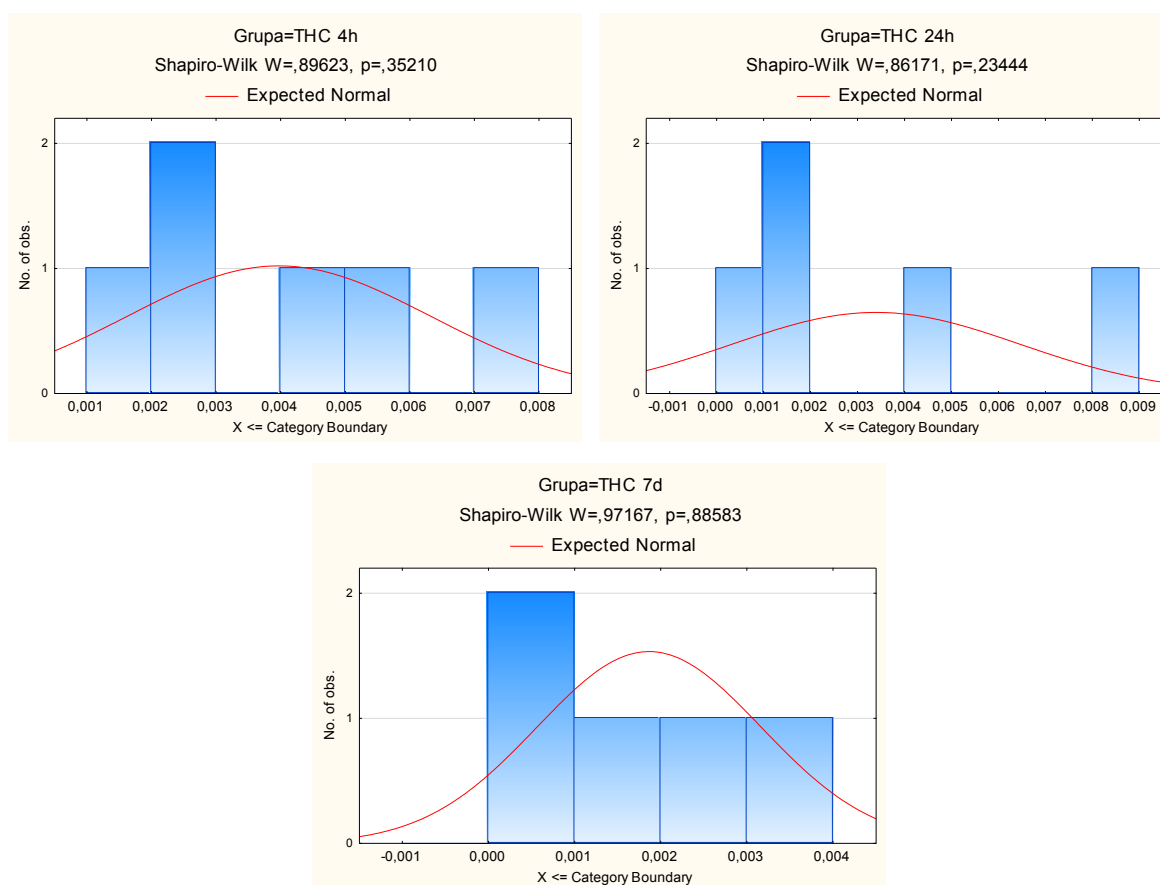
Varijabla	Mann-Whitney U Test							
	Značajnost: $p < 0,05000$							
	Suma rangova K 7d	Suma rangova IRI 7d	U	Z	p	Broj uzoraka K 7d	Broj uzoraka IRI 7d	Točan p
UGT (mU/mg)	36	19	4	1,671145	0,094694	5	5	0,095238
Varijabla	Mann-Whitney U Test							
	Značajnost: $p < 0,05000$							
	Suma rangova K 7d	Suma rangova IRI+THC 7d	U	Z	p	Broj uzoraka K 7d	Broj uzoraka IRI+THC 7d	Točan p
UGT (mU/mg)	39	16	1	2,297825	0,021572	5	5	0,015873
Varijabla	Mann-Whitney U Test							
	Značajnost: $p < 0,05000$							
	Suma rangova K 7d	Suma rangova THC 7d	U	Z	p	Broj uzoraka K 7d	Broj uzoraka THC 7d	Točan p
UGT (mU/mg)	39	16	1	2,297825	0,021572	5	5	0,015873
Varijabla	Mann-Whitney U Test							
	Značajnost: $p < 0,05000$							
	Suma rangova IRI 7d	Suma rangova IRI+THC 7d	U	Z	p	Broj uzoraka IRI 7d	Broj uzoraka IRI+THC 7d	Točan p
UGT (mU/mg)	31	24	9	0,62668	0,53087	5	5	0,547619
Varijabla	Mann-Whitney U Test							
	Značajnost: $p < 0,05000$							
	Suma rangova IRI 7d	Suma rangova THC 7d	U	Z	p	Broj uzoraka IRI 7d	Broj uzoraka THC 7d	Točan p
UGT (mU/mg)	31	24	9	0,62668	0,53087	5	5	0,547619
Varijabla	Mann-Whitney U Test							
	Značajnost: $p < 0,05000$							
	Suma rangova IRI+THC 7d	Suma rangova THC 7d	U	Z	p	Broj uzoraka IRI+THC 7d	Broj uzoraka THC 7d	Točan p
UGT (mU/mg)	29	26	11	0,208893	0,834532	5	5	0,84127



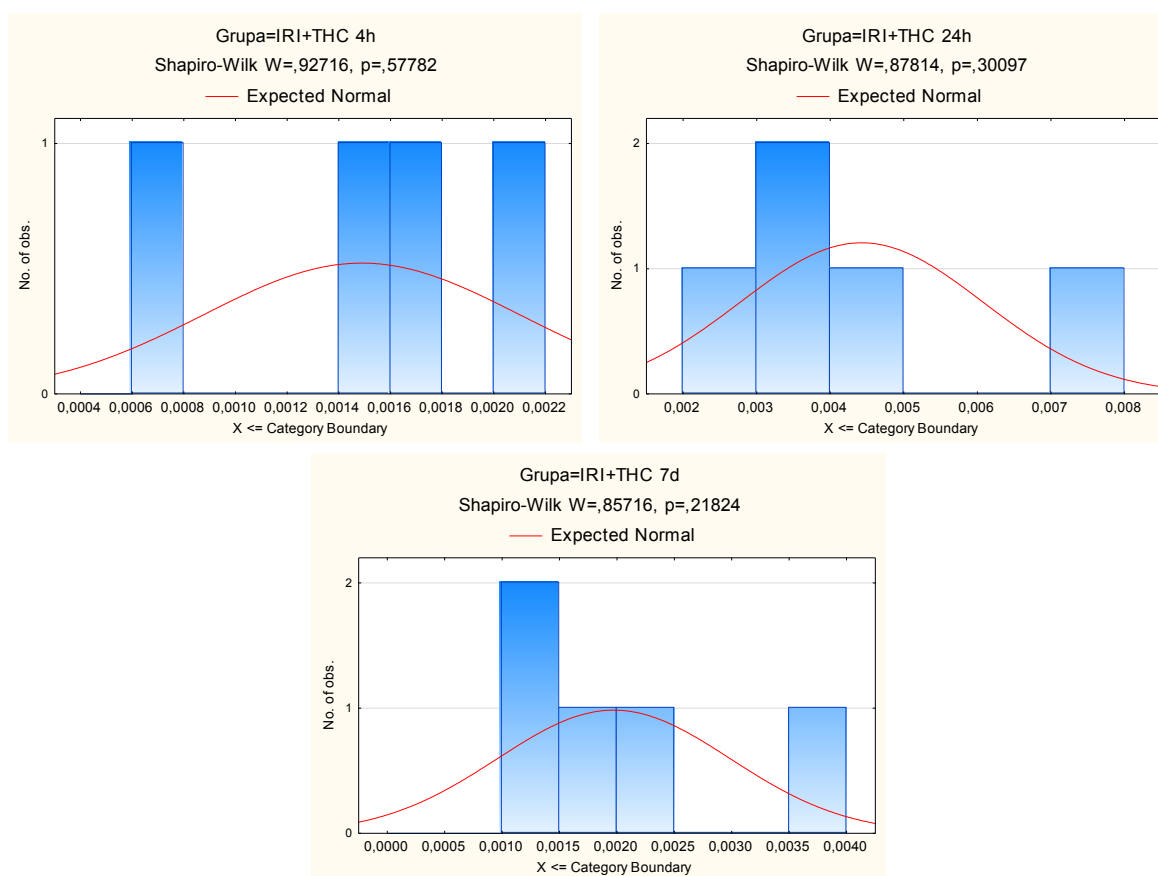
Slika D1. Histogrami distribucije aktivnosti izoenziman UGT za kontrolnu skupinu unutar svakog vremenskog perioda. Frekvencija označava u koliko uzoraka je izmjerena ista aktivnost.



Slika D2. Histogrami distribucije aktivnosti izoenzima UGT za skupinu miševa tretiranih irinotekanom unutar svakog vremenskog perioda. Frekvencija označava u koliko uzoraka je izmjerena ista aktivnost.



Slika D3. Histogrami distribucije aktivnosti izoenzima UGT za skupinu miševa tretiranih THC-om. Frekvencija označava u koliko uzoraka je izmjerena ista aktivnost.



Slika D4. Histogrami distribucije aktivnosti izoenzima UGT za skupinu miševa tretiranih kombinacijom irinotekana i THC-a unutar svakog vremenskog perioda. Frekvencija označava u koliko uzoraka je izmjerena ista aktivnost.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marija Bartolić

Datum rođenja: 8. lipnja 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Stjepana Basaričeka, Ivanić-Grad

2009.–2013. XVI. Gimnazija, Zagreb

2013.–2018. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2018.–2021. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Međunarodna studentska razmjena

9/2020.–11/2020. IAESTE stručna praksa na Institutu za biomaterijale i biomolekulske
sustave, Sveučilište u Stuttgartu, Njemačka

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015.–2019. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb