

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2018.

Lejla Joukhadar

962/USH

**GENOTOKSIČNI UČINAK  
IRINOTEKANA NA LJUDSKE  
TUMORSKE STANICE JETRE I  
CRIJEVA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo i uz pomoć asistentice Ane Huđek, mag. ing. biotechn.

*Prije svega, od srca hvala mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo na pomoći, savjetima, strpljenju, bezbolnom ukazivanju na pogreške i pristupačnosti u svakom trenutku tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i na ugodnim druženjima te pozitivnoj atmosferi koja je uvijek bila prisutna. Isto tako veliko hvala asistentici Ani Huđek, mag. ing. biotechn. na pomoći i korisnim savjetima. Također zahvaljujem dr. sc. Nevenki Kopjar, znan. savj. i dr. sc. Ireni Brčić Karačonji, znan. savj. te ostalim djelatnicima Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.*

*Neizmjereno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezgraničnoj podršci, ljubavi i razumijevanju koje su mi pružali u svakom trenutku tijekom studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### GENOTOKSIČNI UČINAK IRINOTEKANA NA LJUDSKE TUMORSKE STANICE JETRE I CRIJEVA

*Lejla Joukhadar, 962/USH*

**Sažetak:** Od ukupnog broja svih godišnje dijagnosticiranih karcinoma u svijetu, karcinomi probavnog sustava su na vodećoj poziciji. Među njima najvišu pojavnost ima kolorektalni karcinom, što ga svrstava među vodeće zdravstvene probleme kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Irinotekan (CPT-11) je polusintetski analog kamptotecina (CPT) koji je glavni lijek izbora u terapiji metastatskog kolorektalnog karcinoma. Cilj ovog rada je istražiti citotoksičnost, genotoksičnost i svojstvo indukcije slobodnih radikala različitih koncentracija irinotekana. Kao test sustavi korištene su humana stanična linija hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) i humana stanična linija adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) koje su bile izložene djelovanju irinotekana tijekom 2, 4, 24 i 48 sati. Dokazano je da irinotekan djeluje toksično produljenjem vremena tretmana na obje stanične linije. Na stanicama jetre toksičnost raste u ovisnosti o koncentraciji, dok na stanicama crijeva ovisnost o koncentraciji nije dokazana. Također je uočena povezanost citotoksičnog učinka irinotekana s indukcijom slobodnih radikala. S produljenjem vremena inkubacije dolazi do genotoksičnog učinka irinotekana na obje tretirane stanične linije.

**Ključne riječi:** *Irinotekan, citotoksičnost, indukcija slobodnih radikala, genotoksičnost, stanične linije HepG2 i Caco-2, in vitro testovi*

**Rad sadrži:** 86 stranice, 32 slike, 0 tablica, 174 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof. dr. sc. Ksenija Durgo*

**Pomoć pri izradi:** *Ana Huđek, mag. ing. biotechn.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Višnja Bačun-Družina* (predsjednik)
2. Prof.dr.sc. *Ksenija Durgo* (mentor)
3. Dr.sc. *Nevenka Kopjar*, znan. savj. (član), Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
4. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos* (zamjena)

**Datum obrane:** 30. listopada 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### GENOTOXIC EFFECT OF IRINOTECAN ON HUMAN LIVER AND COLON TUMOR CELLS

*Lejla Joukhadar, 962/USH*

**Abstract:** Of the total number of all yearly diagnosed carcinomas in the world, cancers that affect the digestive system are in a leading position. Among them, the highest incidence is colorectal cancer, which puts it among the leading health problems in the world as well as in Croatia. Irinotecan (CPT-11) is a semi-synthetic analogue of camptothecin (CPT) which is the major drug in the choice of metastatic colorectal cancer therapy. The aim of this work is to investigate the cytotoxicity, genotoxicity and induction of free radicals of different concentrations of irinotecan. As the test system the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and the human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) were exposed to irinotecan during 2, 4, 24, and 48 hours. Results have shown that irinotecan cytotoxicity is dependent on the cell line. In liver cells, toxicity is increasing depending on concentrations, while on the colon cells no dependence on the concentration has been demonstrated. Also, the association of cytotoxic effect of irinotecan with the induction of free radicals was observed. With the prolongation of incubation time, the genotoxic effect of irinotecan on both treated cell lines is reached.

**Keywords:** *Irinotecan, cytotoxicity, induction of free radicals, genotoxicity, HepG2 and Caco-2 cell lines, in vitro assays*

**Thesis contains:** 86 pages, 32 figures, 0 tables, 174 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Ksenija Durgo, Full Professor*

**Technical support and assistance:** *Ana Huđek, mag. ing. biotechn.*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Višnja Bačun-Družina*, Full professor (chairman)
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor (mentor)
3. PhD. *Nevenka Kopjar*, Permanent Scientific Advisor (member)
4. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 30 October 2018

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. KARCINOGENEZA.....	3
2.1.1. Uzroci karcinogeneze.....	3
2.1.2. Karakteristike tumorskih stanica.....	4
2.1.2.1. Stanični ciklus i stanična smrt.....	4
2.1.2.2. Onkogeni i tumor-supresor geni.....	7
2.1.2.3. Oksidacijski stres.....	9
2.2. ADENOKARCINOM DEBELOG CRIJEVA.....	11
2.3. LIJEČENJE TUMORA.....	12
2.3.1. Kemoterapija.....	12
2.4. CITOSTATICI.....	12
2.4.1. Toksičnost citostatika.....	14
2.4.2. Klasifikacija citostatika.....	15
2.5. IRINOTEKAN.....	17
2.5.1. Mehanizam djelovanja irinotekana.....	20
2.6. ALTERNATIVNI TESTOVI TOKSIČNOSTI.....	21
2.6.1. Stanične kulture.....	22
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	23
3.1. MATERIJALI.....	23
3.1.1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnih učinaka.....	23
3.1.2. Istraživani spoj.....	24
3.1.3. Kemikalije.....	25
3.1.4. Laboratorijska oprema.....	28
3.2. METODE.....	29
3.2.1. Nasađivanje i kultivacija staničnih linija HepG2 i Caco-2 u monosloju.....	29
3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra.....	30
3.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija irinotekana na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 Neutral red testom.....	31
3.2.4. Određivanje prooksidativnog učinka različitih koncentracija irinotekana na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 DCF-DA testom.....	32

3.2.5. Određivanje oštećenja DNA komet testom izazvanih različitim koncentracijama irinotekana na HepG2 i Caco-2 staničnim linijama .....	34
3.2.6. Statistička obrada podataka .....	36
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>37</b>
4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG UČINKA IRINOTEKANA.....	37
4.2. ODREĐIVANJE PROOKSIDATIVNOG UČINKA IRINOTEKANA .....	50
4.3. ODREĐIVANJE OŠTEĆENJA DNA IZAZVANIH IRINOTEKANOM.....	61
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>71</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>72</b>



# 1. UVOD

Riječ tumor (lat. *tumor* = otjecanje, oteklina) označava skup promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast. Sam proces nastanka tumora naziva se karcinogeneza te se događa na molekularnoj razini i obuhvaća oštećenje više od jednog gena koje nastaje kao posljedica vanjskih karcinogenih faktora (UV zraka, alkilirajućih agenasa, dima cigareta, kemijskih elemenata: arsen, azbest, kadmij, krom, nikal...) ili kao posljedica spontanih mutacija u organizmu (Shewach i Kuchta, 2009).

Karcinomi su maligni tumori koji nastaju od epitelnih stanica i mukoidnih stanica te parenhimatoznih organa (Štraus i Rumora, 2009). Od ukupnog broja svih godišnje dijagnosticiranih karcinoma u svijetu, karcinomi probavnog sustava su na vodećoj poziciji. Među njima najvišu pojavnost ima karcinom debelog i završnog crijeva (eng. *colorectal carcinoma* = kolorektalni karcinom, CRC), što ga svrstava među vodeće zdravstvene probleme kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Učestalost ovog oblika karcinoma ima zabrinjavajući trend porasta u populaciji iznad 50 godina starosti. Rizik od obolijevanja raste nakon 40. godine života, a 90 % svih slučajeva otkrije se iza 50. godine života. Vrhunac pojavnosti CRC-a je između 65. i 70. godine života, a češće se javlja u muškaraca (Štimac i sur., 2008).

Metode liječenja tumora u kliničkoj praksi su kirurške metode, radioterapija, hormonska terapija, imunoterapija, inhibicija angiogeneze i kemoterapija (Luqmani, 2005). Kemoterapija je terapija citostaticima koji imaju karcinogeni, mutageni i teratogeni potencijal (Krešić, 2009). Ove strategije liječenja, kada se upotrebljavaju samostalno ili u kombinaciji mogu značajno utjecati na stanje tumora, pa čak i na proizvodnju lijekova. Za mnoge tumore, kao kod karcinoma debelog crijeva, poboljšane metode za rano dijagnosticiranje i kombinirane terapije imale su važan utjecaj na preživljavanje pacijenata (Shewach i Kuchta, 2009).

Irinotekan je kemoterapeutik licenciran za liječenje metastatskog karcinoma debelog crijeva koji ujedno uzrokuje teške nuspojave. Iako je ovaj spoj licenciran, nije u potpunosti razjašnjen genotoksični učinak odnosno je li oštećenje genetičkog materijala ovisno o dozi ili nije. Stoga, ovim istraživanjem će se ispitati citotoksično, genotoksično i oksidativno djelovanje različitih terapijskih koncentracija irinotekana te koncentracija koje izazivaju letalan učinak na 50 % štakora u ovisnosti o načinu aplikacije (oralno i intravenski) u *in vitro* uvjetima. Isto tako, utvrditi će se vrijeme nakon kojeg se počinje ispoljavati citotoksični i genotoksični učinak irinotekana na tretiranim stanicama. U tu

svrhu koristit će se dvije modelne stanične linije koje će simulirati *in vivo* sustave koji doista jesu izloženi irinotekanu; metabolički aktivni humani hepatocelularni karcinom jetre (HepG2) te humani adenokarcinom epitela debelog crijeva (Caco-2). Odabir ove dvije stanične linije vezan je za činjenicu da aktivni toksični metaboliti irinotekana nastaju u jetri, a ciljno mjesto djelovanja irinotekana je epitel crijeva. Time će se utvrditi u kojoj mjeri nastali metaboliti i sam irinotekan imaju genotoksično djelovanje na stanice jetre i ciljne stanice epitela crijeva.

Rezultati ovog istraživanja pokazat će je li genotoksično djelovanje irinotekana ovisno o koncentraciji i vremenu, te da li različita vrsta stanica drugačije reagira na izloženost različitim koncentracijama ovog spoja. Isto tako, doći će se do spoznaje dolazi li do indukcije slobodnih radikala koji mogu doprinijeti genotoksičnom učinku.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KARCINOGENEZA

Tumori mogu biti benigni (adenom, papilom, polip) ili maligni (karcinom, sarkom, limfom, leukemija). Razlika između njih je u agresivnosti rasta, tj. u tome da maligni tumori metastaziraju šireći se u okolna zdrava tkiva preko krvožilnog sustava, dok benigni tumori ne stvaraju metastaze. Rak (lat. *cancer* = neizlječiva rana) predstavlja maligni oblik tumora. On nastaje istodobnim ili sukcesivnim djelovanjem većeg broja uzročnika. Rak je jedan od vodećih uzroka smrti diljem svijeta. Iako je postignut veliki napredak u liječenju tijekom proteklih 50 godina, i dalje predstavlja veliku zabrinutost za zdravlje, stoga su veliki naponi usmjereni na traženje novih terapijskih pristupa (Shewach i Kuchta, 2009).

Proces karcinogeneze obuhvaća tri stadija: inicijacija, promocija i progresija (Borchers i sur., 2004). Inicijacija je ireverzibilni proces u kojemu se od jedne maligne transformirane stanice razvije klon malignih stanica. Promocija je reverzibilni proces koji u manjem dijelu ovisi o djelovanju promotivnih, tj. karcinogenih čimbenika, dok u većem dijelu ovisi o količini čimbenika koji izazivaju inicijaciju. Progresija je ireverzibilni proces praćen uočljivim genomskim promjenama i stvaranjem primarnog tumora (Štraus, 1995).

#### 2.1.1. Uzroci karcinogeneze

Čak i pod normalnim staničnim uvjetima, integritet genomske DNA nalazi se pod konstantnom prijetnjom od oštećenja i lomova koji kontinuirano nastaju kao posljedica endogenih i egzogenih genotoksičnih agenasa čije djelovanje utječe na stanicu. Svi mehanizmi popravaka DNA koji su stanici na raspolaganju su kompleksni i dinamični procesi koji uključuju koordinaciju brojnih enzima, proteina i modifikaciju kromatina. Greške u glavnim činiteljima ili putevima uključenima u popravak oštećenja DNA dovode do raka i drugih bolesti (Boyer i Levin, 2008).

Pri povoljnim staničnim uvjetima u genomskoj DNA dolazi do spontanih endogenih promjena. Kemijske reakcije u pozadini tih promjena su hidroliza, oksidacija i elektrofilni napadi. Iako ove reakcije mogu biti izazvane izlaganjem egzogenim uzrocima ili kemikalijama, one mogu biti posljedica endogenih metaboličkih procesa (Boyer i Levin, 2008). S druge strane, djelovanjem velikog broj egzogenih agenasa mogu nastati modificirane baze, jednolančani lomovi (eng. *single strand breaks*, SSB), dvolančani

lomovi (eng. *double strand breaks*, DSB) ili se mogu formirati kovalentni mostovi između komplementarnih lanaca. Egzogeni uzroci oštećenja DNA grubo se mogu svrstati u tri grupe: fizikalni karcinogeni (UV zračenje, ionizirajuće zračenje,  $\gamma$ -zračenje), kemijski karcinogeni (azbest, aflatoksin, benzen...) i biološki karcinogeni (infekcije virusima, bakterijama ili parazitima) (Loeb i Harris, 2008).

## 2.1.2. Karakteristike tumorskih stanica

Tumorske stanice razlikuju se od normalnih stanica strukturno i funkcionalno. Tumorska masa stanica potječe od jedne jedine stanice u kojoj su se godinama nagomilavale razne mutacije u genima odgovornim za diobu i regulaciju rasta stanica (Shewach i Kuchta, 2009).

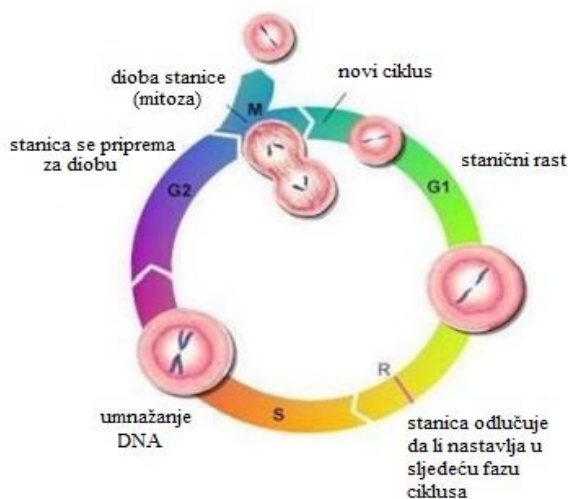
### 2.1.2.1. Stanični ciklus i stanična smrt

Stanice imaju precizno regulirani ciklus kroz koji se odvija rast stanice, sinteza DNA, popravak oštećenja DNA, dijeljenje jezgre i citoplazme što rezultira s dvjema identičnim stanicama kćeri. Stanični ciklus svih eukariotskih stanica se sastoji od četiri faze, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M, koje su precizno regulirane i prijelaz iz jedne u drugu je ograničen tzv. kontrolnim točkama (Slika 1) (Abukhdeir i Park, 2008).

U G<sub>1</sub> fazi (eng. *gap* = praznina, međuprostor, G) stanica se priprema za sintezu DNA te je pod utjecajem mitogena i faktora rasta stoga je metabolički jako aktivna pri čemu se sintetiziraju enzimi potrebni za S fazu i stanica raste. Nakon G<sub>1</sub> faze slijedi S faza (eng. *synthesis* = sinteza, spajanje, S) u kojoj dolazi do replikacije DNA i duplikacije centrosoma. U G<sub>2</sub> fazi stanica opet ubrzano raste, kromosomi u jezgri postaju sve vidljiviji te se odvija sinteza proteina potrebnih za mitozu. Tijekom M faze (eng. *mitosis* = mitoz, M) dolazi do podjele sestrinskih kromatida na dva kromosoma nakon čega slijedi i citokineza kojom se dijele jezgra, citoplazma, organeli te plazmatska membrana i nastaju dvije stanice kćeri (Abukhdeir i Park, 2008).

Rast i diferencijacija stanica su pod kontrolom pozitivne i negativne sprege. Pod tom kontrolom normalna stanica nakon određenog vremena odumire procesom stanične smrti. Hoće li stanica ući u proces stanične smrti ili će se nastaviti diferencirati ovisi prvenstveno o unutarstaničnoj komunikaciji između stanične membrane i jezgre (Štraus, 1995). Također, stanice, ovisno o signalima iz okoline, ulaze ili ne ulaze u diobu. Signale

primaju od susjednih stanica, pozitivne koji stimuliraju diobu, ili negativne koji pak sprječavaju proliferaciju (Hartwell i sur., 2000). Tijekom faze mirovanja ( $G_0$  faza) stanice ostaju metabolički aktivne, ali proliferiraju tek kada ih na to potaknu pozitivni signali (Cooper i Hausman, 2004).



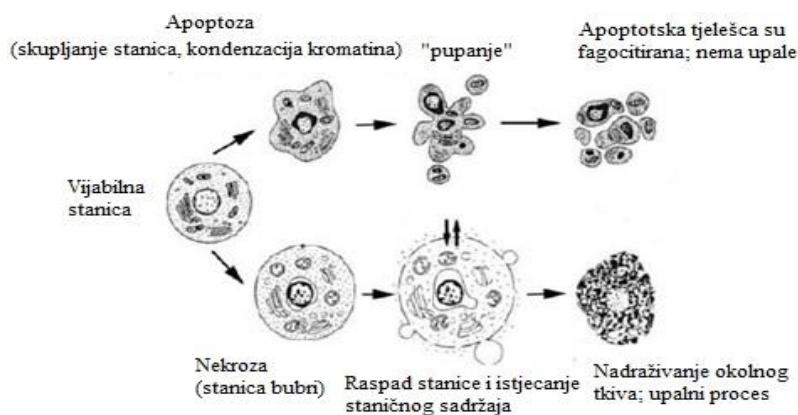
**Slika 1.** Shematski prikaz faza staničnog ciklusa ( $G_1$ , S,  $G_2$ , M) i prva kontrolna točka na kraju  $G_1$  faze (Cooper i Hausman, 2004)

Kako bi organizam ostao u ravnoteži, uz nastanak novih stanica potreban je i mehanizam uklanjanja starih, potencijalno opasnih stanica. Zato je stanična smrt jedan od najvažnijih procesa u višestaničnim organizmima. Svi oblici stanične smrti regulirani su signalnim putevima dizajniranim za uništenje stanice koji se uključuju kao odgovor na neku vrstu signala. Ti signalni putevi dijelom se mogu preklapati, dovodeći do povezanosti između različitih tipova stanične smrti (Chaabane i sur., 2013; Green i Llambi, 2015). Pokretači stanične smrti mogu biti različiti, poput lučenja TNF-a (porodica faktora nekroze tumora), izloženosti dugotrajnom stresu, virusne infekcije, inhibicije sinteze proteina, oksidativnog stresa i hipoksije. Također, staničnu smrt mogu prouzročiti reaktivni kisikovi spojevi (eng. *reactive oxygen species*, ROS). Postoje tri morfološki različita oblika stanične smrti: apoptoza (fiziološka, prirodna ili programirana smrt stanice), nekroza (slučajna, sporedna ili toksična smrt stanice) i autofagija (Slika 2) (Janković i Markotić, 2007).

Apoptoza je normalan, fiziološki oblik stanične smrti koji ima ključnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja i u održavanju odraslih tkiva. U ravnoteži je sa staničnom proliferacijom i održava konstantan broj stanica u tijelu. Također, predstavlja obrambeni mehanizam kojim se oštećene i potencijalno opasne stanice mogu ukloniti za dobrobit cijelog organizma (Cooper, 2002). Mnogobrojni aktivatori apoptoze, preko različitih

posrednika, dovode do pokretanja kaskade proteolitičkih enzima kaspaza i specifičnih morfoloških i biokemijskih promjena kao što su skupljanje stanica, kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA i formiranje apoptotskih tjelešaca koja se spajaju s makrofagima i tako razgrađuju stanicu, te je tim mehanizmom uz utrošak energije izbjegnuta aktivacija imunološkog sustava (Žlender, 2003; Edinger i Thompson, 2004).

Nasuprot apoptozi, nekroza se smatra pasivnim oblikom stanične smrti zbog bioenergetskog disbalansa (nedovoljan broj molekula ATP-a u stanici) (Edinger i Thompson, 2004). Nekroza se nikada ne javlja unutar fizioloških uvjeta, već je slijed letalnih patoloških oštećenja stanice, promjena u mitohondrijskom obliku i funkciji, kao i naglog nastanka nesposobnosti održavanja stanične homeostaze. Osim već navedenih, uzrok nekroze može biti posljedica ozljede, infekcija, tumora, začepljenja žila, djelovanja otrova ili upale. Jako oštećena stanica ne može kontrolirati ravnotežu tekućine i iona, kao ni izmjenu tvari, ona bubri, stanični organeli gube cjelovitost, a njezina membrana propušta. Raspadom i istjecanjem staničnog sadržaja često dolazi do nadraživanja okolnoga tkiva zbog oslobađanja medijatora upale te time širenja upalnog procesa na ostale stanice (Haghiac i Walle, 2005; Savill, 1994).



**Slika 2.** Obilježja apoptotičkog i nekrotičkog procesa stanične smrti (Van Cruchten i Van Den Broeck, 2002)

Autofagija je katabolički proces koji se javlja u uvjetima metaboličkog stresa poput gladovanja ili energetske kolapsa (Fulda i sur., 2010). Osobitost autofagije je pojačano oštećenje i gubljenje proteina koji su neophodni za normalnu aktivnost stanice i preživljavanje stanice pri nedostatku hranjivih tvari. Obilježava ju pojavljivanje velikog broja autofagnih vakuola u citoplazmi. Prvi korak je stvaranje vakuola s dvostrukom membranom, autofagosoma, koji nastaju od endoplazmatskog retikuluma ili od

citoplazmatskih lipida. Autofagosomi se spajaju s lizosomima nakon čega se njihov sadržaj razgrađuje lizosomalnim hidrolitičkim proteazama. Molekularni mehanizam usprkos brojnim istraživanjima nije potpuno razjašnjen. Autofagija može prethoditi apoptozi, odgoditi ili spriječiti apoptozu, mogu jedna drugu isključivati, ali i inhibicija autofagije može dovesti do apoptoze (Edinger i Thompson, 2004).

Zbog bliske povezanosti između staničnog ciklusa i apoptoze važno je prepoznati i ukloniti stanice koje pokazuju nepravilnu proliferaciju. Kontrolnim ili restriktivnim točkama regulirano je vrijeme i redoslijed zbivanja unutar staničnog ciklusa (Diaz-Moralli i sur., 2013). Ulazak u svaku novu fazu staničnog ciklusa je uvjetovan završenom i pravilnom prethodnom fazom. Kontrolne točke u G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub> fazi staničnog ciklusa otkrivaju oštećenu ili neudvostručenu DNA, osiguravaju da se u slučaju DNA oštećenja ciklus ne nastavlja i prenosi na stanice kćeri (Abukhdeir i Park, 2008; Vrdoljak i sur., 2013).

Jedno od jedinstvenih karakteristika tumorskih stanica je njihova sposobnost da izbjegnu mehanizme apoptoze (Bates i Lewis, 2013). Inhibicija apoptoze omogućuje preživljavanje i diobu stanica s oštećenjem, što je jedan od preduvjeta za zloćudnu preobrazbu i proces metastaziranja. Osim toga, zbog nemogućnosti odumiranja apoptozom, tumorske stanice ne trebaju kontakt s izvanstaničnim matriksom i drugim stanicama, koji u fiziološkim uvjetima osiguravaju signale za preživljavanje. Budući da je ukupan broj tumorskih stanica ovisan o međuodnosu brzine njihove diobe i odumiranja, inhibicija apoptoze omogućuje brži rast tumorske mase (Janković i Markotić, 2007). Razumijevanje samog procesa apoptoze moglo bi omogućiti nove načine liječenja bolesti koje su povezane s disbalansom proliferacije i smrti stanica (Demchenko, 2013). Vrijedno je napomenuti da je potrebno samo polagano povećanje stope proliferacije tumorskih stanica da postupno prerastu normalno kontrolirane populacije stanica i stvore tumorsku masu (Thurston, 2007).

#### *2.1.2.2. Onkogeni i tumor-supresor geni*

Svaki stanični gen koji sudjeluje u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica, može prijeći u mutirani oblik, tj. normalni gen kojeg nazivamo protoonkogen može se promijeniti u onkogen i izazvati maligne transformacije (Štraus, 1995). Mutacije odgovorne za nastanak tumora javljaju se u tri skupine gena: onkogenima, tumor-supresor genima i genima za provjeru i popravak DNA (Cooper, 2002).

Onkogeni su mutirani protoonkogeni čija povećana aktivnost potiče proliferaciju i nastanak tumora. Do povećanja aktivnosti može doći zbog mutacije ili deregulacije ekspresije, ovisno o tipu gena. Genetičke promjene koje ih pretvaraju u onkogene uključuju funkcionalno važne mutacije unutar kodirajućih sljedova, transkripcijsku aktivaciju insercijskom mutagenozom, kromosomsku translokaciju i umnažanje gena (Kinzler i Vogelstein, 1996). Oni izazivaju malignu transformaciju stanice mijenjajući normalne stanične signale i procese koji reguliraju ulazak stanice u G<sub>1</sub> fazu staničnog ciklusa čime se gubi kontrola rasta i proliferacije što za posljedicu ima nekontrolirano dijeljenje stanica (Thurston, 2007).

S druge strane, postoje tumor-supresor geni, normalni stanični geni. Imaju raznolike uloge u fiziologiji stanice koje uključuju regulaciju staničnog ciklusa preko kontrolnih točaka, regulaciju apoptoze, detekciju i popravak DNA, ubikvitinaciju i razgradnju proteina, diferencijaciju i migraciju stanica te mitogeno signaliziranje. Također, kodiraju produkte koji onemogućuju rast tumora i osiguravaju negativnu regulaciju staničnog ciklusa (Sherr, 2004; Cooper i Hausman, 2004; Thurston, 2007). U te su procese uključeni kao transkripcijski faktori, inhibitori staničnog ciklusa, korepresori transkripcije, proteinske kinaze, sudionici u popravku DNA molekule i dr. (Matlashewski i sur., 1984).

Za proces nastanka tumora ključna je aktivacija onkogeno točkastim mutacijama, delecijom ili djelovanjem epigenetskih čimbenika, inaktivacija tumor-supresor gena, čime se gubi kontrola nad nekim od navedenih procesa koje reguliraju, i inaktivacija gena odgovornih za sprječavanje pogrešaka u genomu što dovodi do genomske nestabilnosti, povećanja učestalosti mutacija svih gena i povećane učestalosti kromosomskih aberacija i aneuploidija (promjene strukture ili broja kromosoma) (Cooper, 2002; Hartwell i sur., 2000).

Najpoznatiji tumor-supresor gen je gen p53 koji je ujedno i jedan od najčešće mutiranih gena u tumorskim stanicama (Hollstein i sur., 1996). Produkt tog gena, protein p53, smatra se čuvarom genoma. To je tumor-supresorski transkripcijski faktor čije se izoforme nalaze u mnogim organizmima. Kontrolira ekspresiju velikog seta gena uključenih u detekciju oštećenja i popravka DNA, zastoja u staničnom ciklusu i apoptozi. U normalnim stanicama količina p53 vrlo je mala, no kada dođe do oštećenja stanice, p53 se stabilizira i njegova koncentracija u stanici raste što dovodi do aktivacije apoptotičkih mehanizama. Najčešće mutacije p53 su pogrešne (eng. *missence*) mutacije u DNA – veznoj domeni, čime je onemogućeno vezanje p53 na ciljna mjesta u genomu i aktivacija tih gena.



Takvi mutanti p53 gube tumor-supresorsku aktivnost jer ne dolazi do apoptoze, već do potencijalne transformacije stanica i posljedično do onkogeneze (Kiraz i sur., 2016).

### 2.1.2.3. Oksidacijski stres

U organizmu postoji ravnoteža između reaktivnih kisikovih spojeva, jakih oksidansa i antioksidacijskog mehanizma obrane (Fulda i sur., 2010). Pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji, pri čemu se prekomjerno stvaraju slobodni radikali i / ili reaktivni kisikovi spojevi (ROS) naziva se oksidacijski stres (Sies, 1991). Naime, za vrijeme normalnog staničnog metabolizma sustavi obrane odgovarajuće reagiraju s nastalim količinama slobodnih radikala i održava se homeostaza, no u nekim je kliničkim stanjima povećano stvaranje ROS-a tako da je kapacitet citoprotektivnih enzima i antioksidansa nedovoljan (Čepelak, 2009).

ROS je zajednički naziv za radikale kisika kao i neradikalne derivate kisika koji su oksidirajući agensi i / ili se lako prevode u radikale (Buonocore i sur., 2010). ROS kisikovi radikali su superoksid radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil radikal ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoksil radikal ( $RO^{\cdot}$ ), dok određeni spojevi koji nisu slobodni radikali su hipokloritna kiselina ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ), molekularni kisik ( $O_2$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) (Ma, 2010). Svi ROS nisu jednako reaktivni.  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$  reagiraju u uvjetima *in vivo* relativno selektivno sa samo nekoliko bioloških molekula, dok je npr.  $OH^{\cdot}$  veoma reaktivan i trenutno reagira s bilo kojom molekulom s kojom dođe u kontakt (Galli i sur., 2005). Druga različitost između ROS-a je mjesto njihove reaktivnosti. Slobodni radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ) gotovo trenutačno reagiraju na mjestu svoga nastanka, dok neradikalni oblici ( $H_2O_2$ ,  $O_2$ ) mogu prolaziti kroz biološke membrane i na taj način širiti svoju reaktivnost i moguću toksičnost van stanice u kojoj su nastali (Boots i sur., 2008). Najveći dio ROS-a u fiziološkim uvjetima nastaje transportom elektrona na unutrašnjoj membrani mitohondrija tijekom pretvorbe kisika u vodu, za vrijeme transporta elektrona u respiratornom lancu (stanično disanje). Osim u mitohondrijima, transport elektrona zbiva se na membranama endoplazmatskog retikuluma i na membrani jezgre, te ROS nastaju i na tim mjestima. Također, mogu nastati u stanici i aktivnošću enzima (NADPH-oksidaza, ksantin-oksidaza, citokrom P-450, lipooksigenaza, ciklooksigenaza), autooksidacijom malih molekula, u redoks-ciklusu ksenobiotika, uslijed djelovanja vanjskog čimbenika (poput UV zračenja, toksičnih kemikalija) ili uslijed prisutnosti nekog upalnog procesa (Rumora i sur., 2003).

ROS s jedne strane doprinose normalnoj fiziološkoj funkciji kao što su stanična diferencijacija, stanična signalizacija, apoptoza i baktericidno djelovanje, a s druge strane, oksidacijski stres uzrokuje lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina te oštećenje DNA, što dovodi do gubitka fluidnosti staničnih membrana, inaktivacije membranskih enzima, ubrzane proteolize, starenja, poremećaja prijenosa signala u stanici, malignih procesa i smrti stanice (Rossman i sur., 2013; Tangvarasittichai, 2015; Čepelak i Dodig, 2003). Razmjer oštećenja nastalog kao posljedica oksidacijskog stresa ovisi o njegovom stupnju i trajanju, mehanizmu kojim je izazvan te o vrsti zahvaćenog organskog sustava (Lee i sur, 2012). Do danas još nije u potpunosti poznata uloga koju oštećenje slobodnim radikalima ima u karcinogenezi i uloga sinergije sa drugim oblicima genetičkih događaja koji ubrzavaju preobrazbu stanica i maligne promjene. Međutim, poznato je da dugotrajan i prekomjeran oksidacijski stres može sudjelovati u inicijaciji proliferacije tumorskih stanica. Utjecaj oksidacijskog stresa na određenu fazu karcinogeneze izravno se odnosi na vrstu i reaktivnost uključenih radikala (Valko i sur., 2004). Isto tako, iako matične tumorske stanice dijele sličan fenotip s normalnim matičnim stanicama, relativno se malo zna o njihovom redoks statusu (Shi i sur., 2012). Tumorske stanice odlikuje povećana anaerobna glikoliza (Warburgov efekt) i visoka razina oksidacijskog stresa kao posljedica nakupljanja ROS-a. Visoka koncentracija ROS-a rezultat je disbalansa između njihova stvaranja i uklanjanja (Gorrini i sur., 2013). U kontekstu staničnog metabolizma, jasno je da se tumorske stanice adaptiraju na disbalans u redoks statusu koji je uzrokovan njihovim ubrzanim rastom i ograničenom dostupnošću kisika i nutrijenata. Upravo te prilagodbe i alternativne metaboličke reakcije koje se razvijaju na taj način čine ih manje osjetljivima na kemoterapiju i zračenje (Jones i Thompson, 2009). Također, iako su terapijski režimi koji povećavaju produkciju ROS-a korisni za eliminaciju većine tumorske mase, takvi pristupi mogu zakazati u konačnom cilju, tj. izlječenju pacijenta upravo zbog superiorne sposobnosti tumorskih matičnih stanica da prežive uvjete visoke razine ROS-a povećanjem produkcije enzimatskih i neenzimatskih antioksidanasa. Dodatno, takvi terapijski režimi stvaraju plodno tlo za daljnje oštećenje DNA i nastanak mutacija što u konačnici može rezultirati rezistentnim tumorskim stanicama (Guéraud i sur., 2010).

## 2.2. ADENOKARCINOM DEBELOG CRIJEVA

Debelo crijevo predstavlja završni dio probavnog sustava, duljine je oko 150 centimetara i dijeli se na debelo i završno crijevo koje završava analnim kanalom. Histološki, debelo se crijevo sastoji od sluznice, podsluznice, mišićnog sloja, subseroze i seroze (Gilroy i sur., 2011; Jass, 1995).

Tkivne izrasline koje rastu iz sluznice debelog crijeva nazivaju se polipi te mogu nastati kao rezultat poremećaja sazrijevanja sluznice ili upalnih stanja sluznice, odnosno zbog povećane proliferacije epitela s posljedičnom displazijom. Mogu biti različitih veličina, što su veći i duže vrijeme prisutni to je veća mogućnost za nastanak karcinoma (Brkić i Grgić, 2006). Adenomi su karakterizirani hiperproliferacijom genetički promijenjenih epitelnih stanica mukoznih žlijezda. Po definiciji su displastični, a u tom dinamičkom procesu razvijaju se od displazije niskog stupnja do displazije visokog stupnja koja napreduje prema karcinomu (Štraus i Rumora, 2009; Coppola i Richard, 1997).

Rak debelog crijeva se dijeli na benigne i maligne karcinome. Karcinomi debelog crijeva nastaju kao posljedica niza genetičkih promjena u epitelnim stanicama sluznice debelog crijeva koje uzrokuju napredovanje procesa od hiperproliferacije sluznice preko displazije do metastatskog karcinoma. Ukupan broj genetičkih promjena raste s pogoršanjem histopatološke slike tumora. Najčešći su benigni adenomi-polipi i maligni adenokarcinomi (Brkić i Grgić, 2006; Ruschoff i sur., 1996). Nastanak većine karcinoma debelog crijeva započinje kao benigni adenom. Proces napredovanja adenoma prema malignom karcinomu može trajati deset do petnaest godina, a poznat je pod nazivom adenom – karcinom slijed (sekvenca) (Coppola i Richard, 1997).

Karcinom može nastati u proksimalnom dijelu debelog crijeva (slijepo crijevo i uzlazni dio debelog crijeva – 15 %), glavnom dijelu debelog crijeva (poprečni dio – 10 %, silaznom dijelu – 5 %, sigmoidnom crijevu – 25 %) ili najčešće u donjem dijelu debelog crijeva (završno crijevo i čmar – 45 %). Može se pojaviti sporadično ili kao nasljedni karcinom; u oba slučaja radi se o fenotipski i genotipski vrlo heterogenoj skupini malignih tumora (Kinzler i Vogelstein, 1996). Zbog velikog utjecaja vanjskih čimbenika na njegov nastanak i razvoj (prehrana, stil života) najveći broj karcinoma debelog crijeva javlja se u sporadičnom obliku (80 %), dok na nastanak ovih karcinoma do 20 % utječu nasljedni čimbenici (Abdel-Rahman i Peltomaki, 1994).

## **2.3. LIJEČENJE TUMORA**

Najuobičajenija metoda liječenja karcinoma debelog crijeva jest operacija kojom se odstranjuje tumor zajedno s malim dijelom okolnog tkiva i susjednim limfnim čvorovima. Nakon operacije pacijenti prolaze kemoterapiju. Međutim, povećana smrtnost je najčešće uzrokovana širenjem primarnog tumora na jedno ili više drugih mjesta u tijelu, što čini kiruršku intervenciju nemogućom. U petogodišnjem periodu, stupanj preživljenja iznosi 50 % što uglavnom ovisi o stadiju tumora u vrijeme dijagnoze. Kod pacijenata s karcinomom debelog crijeva u ranom stadiju, nakon operacije stupanj preživljenja iznosi 80 % dok je on za pacijente s metastazama manji od 10 % (za petogodišnje razdoblje). Budući da je prije dijagnoze oko 50 % malignih tumora već metastazirano nužna je rana dijagnoza (Sayar i Banerjee, 2008; Thurston, 2007).

### **2.3.1. Kemoterapija**

Kemoterapija ili citostatska terapija danas je dio standardnog terapijskog procesa većine zloćudnih bolesti (Soldić, 2015). Ovisno o vrsti i uznapređalosti raka, kemoterapija može imati različite ciljeve: izliječiti rak (smatra se da je izlječenje postignuto kada bolesnik nema prisutnih zloćudnih stanica), kontrolirati rak (primjenom kemoterapeutika usporava se rast tumora i uništavaju se stanice koje se mogu proširiti u druge dijelove tijela iz ishodišnog tumora) i ublažiti simptome bolesti te produljiti život bolesnika s uznapređalom metastatskom bolesti (Onkologija.hr, 2016a).

Postoje dva načina provedbe kemoterapije: monoterapija (liječenje jednim lijekom) i polikemoterapija (kombinacija više lijekova). Vrlo često se prilikom liječenja malignih tumorskih stanica prethodno navedeni oblici kemoterapije koriste u kombinaciji s biološkom terapijom (imunoterapija, antiangiogena terapija) (Soldić, 2015).

## **2.4. CITOSTATICI**

Sva dosadašnja saznanja o citostaticima, kemoterapiji i reakcijama organizama oboljelih osoba rezultat su dugogodišnjih istraživanja koja su započela još ranih godina 20. stoljeća. Većina citotoksičnih agenasa je otkrivena slučajno (npr. cisplatina i dušikov iperit) ili kroz programe testiranja (npr. vinblastin i paklitaksel) (Devita i Chu, 2008; Thurston, 2007).

Kemoterapija podrazumijeva upotrebu citostatika, antitumorskih lijekova s malom molekulskom masom za selektivno uništavanje tumora ili barem ograničavanje njegove proliferacije (Thurston, 2007). Primjena citostatika najčešće je intravenski, bilo u bolusu ili u prolongiranoj infuziji više sati ili nekoliko dana. Osim toga, citostatici se mogu uzimati oralnim putem, intraarterijskom primjenom, instiliranjem u tjelesne šupljine te intratekalnom primjenom (konzumacija lijeka snagom vlastitog udaha) (Soldić, 2015).

Jedna od prednosti kemoterapije je da se, nakon intravenske primjene, lijekovi male molekulske mase distribuiraju u većinu tkiva u tijelu i tako uništavaju tumorske stanice u zaštićenim područjima (npr. mozgu) ili stanice koje su u procesu metastaziranja (Thurston, 2007). Međutim, nedostaci mnogih citotoksičnih agenasa uključuju neugodne nuspojave, kao što su supresija koštane srži, pojava lezija gastrointestinalnog (GI) trakta, gubitak kose i mučnina. Nuspojave se javljaju jer citotoksični agensi djeluju neselektivno kako na tumorske stanice, tako i na normalne stanice, uzrokujući apoptozu. To se događa zbog nedostatka specifičnosti antitumorskih lijekova, sustavne toksičnosti lijekova, brzog metaboliziranja lijekova, ali i zbog stjecanja otpornosti na citostatike (Kraljević i sur., 2006).

Tek nedavno je detaljnije poznavanje temeljnih biokemijskih razlika između normalnih i tumorskih stanica omogućilo dizajniranje lijekova uz racionalan pristup. Novi agensi gotovo se uvijek evaluiraju *in vitro* na tumorskim staničnim linijama. Time se ispituje citotoksičnost (tj. sposobnost ubijanja stanica) agenasa što ne daje informaciju o antitumorskoj aktivnosti *in vivo*. Međutim, proučavanjem panela različitih tipova tumorskih stanica može se utvrditi ima li agens selektivnu citotoksičnost prema određenom tumorskom tipu što omogućuje definiranje i provođenje prikladnih *in vivo* eksperimenata (Thurston, 2007).

Svaki citostatik ima jedinstven mehanizam čiji je cilj apoptoza tumorskih stanica (Soldić, 2015). Citostatici koji se danas koriste uglavnom djeluju tako da inhibiraju ili stimuliraju enzime uključene u stanični metabolizam i sintezu proteina ili djeluju na signalne puteve. Njihovi mehanizmi djelovanja uključuju značajno brži unos i toksično djelovanje u tumorskim stanicama koje se brzo dijele. Pošto se stanice koštane srži, epitela GI trakta i folikula dlake dijele brže od većine zdravih tkiva mehanizam djelovanja citotoksičnih agenasa objašnjava razlog nuspojava (Kraljević i sur., 2006; Thurston, 2007).

Antitumorska aktivnost citostatika procjenjuje se po postotku apoptotičnih tumorskih stanica. Unatoč značajnoj redukciji tumorske mase, apoptoza se ne pojavljuje uvijek u visokom postotku stanica nakon kemoterapije, što ukazuje da citostatici izazivaju i

druge oblike stanične smrti: autofagiju i nekrozu. Uzajamna veza autofagije i apoptoze nije do kraja istražena. Poznato je da nekoliko proteina koji sudjeluju u autofagiji mogu izazvati i apoptozu. Autofagija inhibira angiogenezu te na taj način smanjuje progresiju tumora i povećava učinkovitosti citostatske terapije (Apel i sur., 2009).

#### 2.4.1. Toksičnost citostatika

Toksičnost je osobina kemijskih spojeva da u organizmu na neposredan ili posredan način uzrokuju toksični učinak. Toksičnost neke tvari ovisi o toksičnim svojstvima, upotrijebljenoj dozi, te o vremenu i uvjetima izlaganja. Određivanje razine toksičnosti temelji se na *in vivo* i *in vitro* testovima toksičnosti. Odabir testa toksičnosti razlikuje se ovisno o vrsti spoja, očekivanoj upotrebi i propisima u zemlji u kojoj se ta tvar treba registrirati, a osnovni principi na kojima se temelje testovi toksičnosti su izlaganje pokusnih životinja ili drugih test sustava potencijalnom toksikantu te razmatranje epidemioloških podataka (Klaassen, 1986). U procjeni toksičnih učinaka citostatika značajnu ulogu imaju različiti citogenetički i molekularno-biološki testovi pomoću kojih se u kratkom vremenskom razdoblju može otkriti i procijeniti razina oštećenja stanične DNA i pratiti dinamika njenog popravka. Posebnu važnost imaju tehnike poput komet testa koje omogućavaju osjetljivo otkrivanje primarnih oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama, neovisno o fazi staničnog ciklusa (Kenna i Jones, 1995).

Citotoksičnost je svojstvo nekih tvari da pri određenim koncentracijama značajno smanje preživljavanje stanica nekog test sustava. Citotoksičnost citostatika određuje se pomoću klasičnih (istraživanja na životinjama) i alternativnih testova toksičnosti (istraživanja na mikroorganizmima ili staničnim linijama). Osnovna uloga citotoksičnosti je prepoznavanje i uništavanje unutarstaničnih patogena (npr. virusa) i tumorskih stanica (Pacadi, 2015). Međutim, citotoksičnost citostatika očituje se i na zdravim stanicama. Omjer između odgovora tumorskih stanica i normalnih stanica na dozu lijeka naziva se terapijski indeks. Smanjeni terapijski indeks ograničava upotrebljivost mnogih kemoterapijskih lijekova. Toksičnost za zdravo tkivo koje sprječava povećavanje doze naziva se toksičnost u vezi sa smanjenjem doze. Tkiva koja proliferiraju (koštana srž i sluznica probavnog sustava) najosjetljivija su na toksičnost citostatika jer brzo dijeljenje i sinteza DNA tumorskih stanica povećava učinkovitost citostatika (Hegarty i Chidholm, 2002). Citostatici se uglavnom metaboliziraju preko citokrom P-450 enzimskog sustava u jetri i u nekim drugim tkivima. Ukoliko ne dođe do bioaktivacije u jetri, ulazak citostatika

u stanicu ne mora dovesti do citotoksične aktivnosti. Kada se aktiviraju citostatici, njihovi metaboliti se izlučuju putem urina te bubrežna funkcija mora biti očuvana, a istodobno davanje drugih nefrotoksičnih lijekova može pojačati toksičnost citostatika (Kenna i Jones, 1995). Niske koncentracije citostatika ne dovode do citotoksičnosti, dok povećanje koncentracije citostatika potiče smrt stanica ovisno o dozi i vremenu izlaganja kemoterapijskom lijeku (Hegarty i Chidholm, 2002).

#### 2.4.2. Klasifikacija citostatika

Zahvaljujući brojnim i dugotrajnim istraživanjima, znanstvenici su opisali i klasificirali pozamašan broj citostatika. Prema njihovom mehanizmu djelovanja, klasificirani su na antimetabolite, antitubulinske agense, DNA interaktivne agense, ciljane molekularne agense, hormone, monoklonska antitijela i druge biološke agense. U daljnjem tekstu razmatraju se najčešće korišteni antitumorski lijekovi (tj. klasični citotoksični agensi) (Thurston, 2007).

**Antimetaboliti** su jedna od najstarijih skupina antitumorskih lijekova čiji se mehanizam djelovanja temelji na interakciji s bitnim putevima biosinteze. Strukturni analozi pirimidina (5-fluorouracil) i purina (merkaptopurin) ugrađuju se u stanične komponente kako bi poremetili sintezu nukleinskih kiselina, dok analozi folne kiseline (metotreksat) ometaju sintezu tetrahidrofolata vežući se u aktivno mjesto enzima tetrahidrofolat reduktaze i time ometaju sintezu DNA (Thurston, 2007; Luqmani, 2005). Ovi lijekovi se primjenjuju u liječenju akutne limfoblastične, mijeloične i limfatične leukemije, ne-Hodgkinova limfoma, karcinoma dojke, testisa ili bronha (Onkologija.hr, 2016b).

**Antitubulinski agensi** (inhibitori tubulina) utječu na dinamiku mikrotubula, tj. oblikovanje ili rastavljanje diobenog vretena, blokiraju podjelu jezgre i dovode do stanične smrti. Isto tako, inhibiraju glikolizu i smanjuju količinu NAD enzima u tumorima i ostalim tkivima koja brzo proliferiraju. Glavni predstavnici ove skupine su taksani (paclitaxel i docetaxel) i vinka alkaloidi (vinkristin, vinblastin i vinorelbin) (Thurston, 2007).

**DNA interaktivni agensi** čine jednu od najvećih i najvažnijih skupina lijekova protiv malignih tumora djelujući različitim mehanizmima. Pod njih spadaju alkilirajući agensi, agensi za ukriženo povezivanja, interkalirajući agensi, agensi čije vezanje uzrokuje cijepanje lanca DNA i inhibitori topoizomeraze (Thurston, 2007). Najvažniji citotoksični

učinci ovih lijekova su onemogućena transkripcija i replikacija DNA, ometanje metabolizma proteina i aktivnosti enzima (Onkologija.hr, 2016b).

*Alkilirajući agensi*, kao što su dakarbazin, prokarbazin i temozolomid, dovode do alkiliranja baza bilo u malim ili velikim utorima DNA (Thurston, 2007). Otpornost tumorskih stanica na alkilirajuće agense posljedica je pojačanog popravka DNA, smanjenja stanične propusnosti za lijek te povećanja inaktivacije lijeka (Onkologija.hr, 2016b).

*Agensi za ukriženo povezivanje* (eng. *cross-linking agents*) djeluju vezanjem na DNA što rezultira povezivanjem DNA unutar istog lanca (eng. *intrastrand*) ili povezivanje između suprotnih lanaca dvolančane DNA (eng. *interstrand*). Međulančano povezivanje predstavlja daleko najtoksičniju od svih alkilacijskih reakcija, budući da rezultira blokiranjem nastanka replikacijske vilice te potpunim zaustavljanjem replikacije. Dvije glavne skupine ove podgrupe antitumorskih lijekova su kompleksi platine (cisplatin, karboplatin, oksaliplatin) i dušikovi iperiti (ciklofosfamid i ifosfamid) (Thurston, 2007). Agensi za ukriženo povezivanje obuhvaćaju izuzetno važnu vrstu agenasa ne samo u liječenju malignih tumora, već i za bolesti poput psorijaze i raznih anemija (Rajski i Williams, 2008).

*Interkalirajući agensi* (interkalatori) su planarne aromatske strukture te se ugrađuju u dvostruku uzvojniju DNA između susjednih parova baza bez ometanja dušikovih veza komplementarnih baza. Uzrokuju odmotavanje dvostruke uzvojnice, produženje DNA i inhibiciju enzima topoizomeraza II tijekom replikacije. Prisutnost neke elektrofilne skupine u strukturi interkalatora doprinosi njegovoj genotoksičnosti (Nafisi i sur., 2007). S povećanjem koncentracije interkalatora dolazi do prijelaza iz B-DNA, koji je najučestaliji strukturni oblik u kojoj se DNA nalazi u stanicama živih bića, u A-DNA strukturni oblik. Takve promjene na DNA uzrokovane interkalatorima sprječavaju replikaciju DNA i time inhibiraju daljnji rast ili uzrokuju apoptozu tumorskih stanica. Ova skupina obuhvaća antracikline (doksorubicin, epirubicin), mitoksantron i aktinomicin-D (Yuzaki i Hamaguchi, 2004; Watson i Crick, 1953; Thurston, 2007).

*Agensi čije vezanje uzrokuje cijepanje lanca DNA* (eng. *DNA-cleaving agents*) dolaze u interakciju s DNA i uzrokuju njene lomove. Glavni predstavnik, bleomicin, veže se na DNA te nakon stvaranja kompleksa sa željezom izaziva brojne jednonančane i dvolančane lomove koji dovode do fragmentiranja DNA. Osim toga, aktivira kisik pri čemu nastaje superoksid radikal. Uzrokuje inhibiciju sinteze DNA, a u manjoj mjeri utječe na inhibiciju sinteze RNA i proteina (Thurston, 2007; Povirk i Austin, 1991). Akumulira se



u skvamoznim (pločastim) stanicama i stoga je pogodan za liječenje tumora glave i vrata, Hodgkinove bolesti i karcinoma testisa (Zhang i sur., 2001).

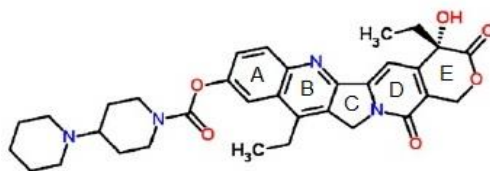
*Inhibitori topoizomeraze* su agensi dizajnirani da ometaju djelovanje topoizomeraznih enzima I i II (Thurston, 2007). Inhibicija topoizomeraza ometa transkripciju i replikaciju uzrokujući oštećenje DNA, inhibiranje replikacije DNA, neuspjeh popravljivanja lomljenja lanaca i potom staničnu smrt. Derivati kamptotecina (irinotekan, topotekan) vrše svoj citotoksični učinak inhibiranjem topoizomeraze I, dok derivati epipodofilotoksina (etopozid, tenipozid) inhibiraju topoizomerazu II (Freres i sur., 2016).

## **2.5. IRINOTEKAN**

Irinotekan (CPT-11) je polusintetski analog kamptotecina (CPT), kinolinskog alkaloida izoliranog iz kora kineskog stabla *Camptotheca acuminata* (Jaxel i sur., 1989; Wall i sur., 1996). Sedamdesetih godina prošlog stoljeća pokazalo se da izlaganje CPT-u uzrokuje jednolančane lomove DNA koji nestaju čim se lijek ukloni, a desetak godina kasnije da su ti lomovi lanaca povezani s inhibicijom topoizomeraze I (Horwitz i Horwitz, 1971; Hsiang i sur., 1985). Klinička upotreba kamptotecina je ograničena zbog slabe topljivosti u vodi uslijed čega se javljaju toksične nuspojave kao što su mijelosupresija i hemoragični cistitis. Da bi se izbjegle ove nuspojave sintetizirano je nekoliko derivata kamptotecina topljivih u vodi. Danas su za kliničku upotrebu odobreni topotekan i irinotekan (Thurston, 2007; Mathijssen i sur., 2001; Saltz, 1997).

Irinotekan se prvi puta počeo koristiti u Japanu 1994. godine u liječenju raka pluća, jajnika i grlića maternice. U Europi odobrenje za upotrebu dobiva 1995. godine kao pomoćni pripravak za liječenje raka debelog crijeva, gdje se i danas najviše upotrebljava. Osim toga ima široku primjenu u liječenju malignih tumora želuca, jednjaka, glave i vrata, središnjeg živčanog sustava, te leukemije, limfoma i mezotelioma (Takimoto i sur., 1998; Xu i Villalona-Calero, 2002; Pizzolato i Saltz, 2003). Prospektivna studija je pokazala da pacijenti sa metastatskim kolorektalnim karcinomom pod terapijom irinotekana imaju višu stopu tumorskog odgovora i smanjen rizik progresije (Toffoli i sur., 2006). Irinotekan se daje u malim dozama kontinuirano ili s određenim razmacima tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Može se primjenjivati u obliku monoterapije ili kombinirane terapije (Saltz 1997; Takimoto i sur., 1998).

Molekula irinotekana, molekulske mase 677,19 g mol<sup>-1</sup>, građena je od molekule kamptotecina uz dvije dodatne supstitucije: etilna skupina na prstenu B i 4-iperidinopiperidinska skupina na prstenu A (Slika 5) (Jaxel i sur., 1989; Pizzolato i Saltz, 2003).

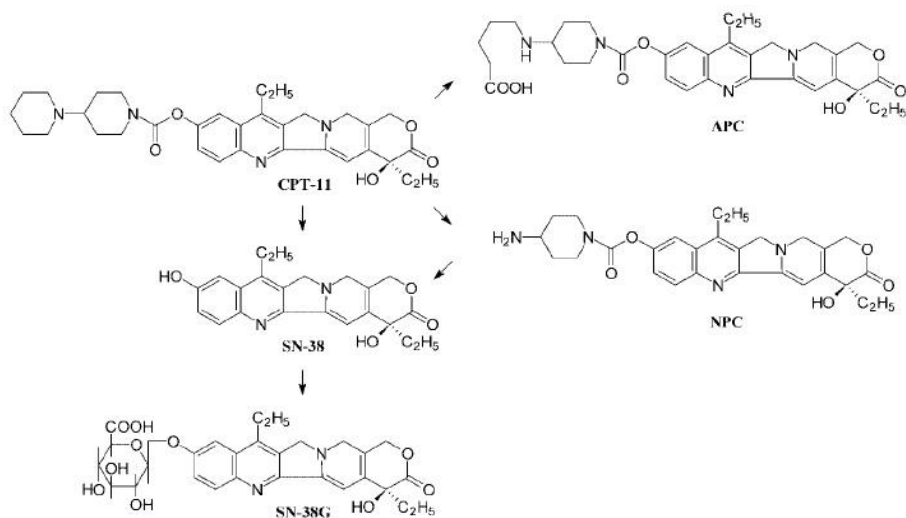


**Slika 5.** Molekula irinotekana (Thurston, 2007)

CPT-11 ima izrazito složen farmakološki profil, koji ovisi o nizu enzima koji su uključeni u metaboličku transformaciju i aktivne transportne proteine, koji reguliraju crijevnu apsorpciju i mehanizme lučenja hepatobilijarnih stanica. Nadalje, CPT-11 je kemijski jedinstven zbog prisutnosti velikog bočnog lanca na strukturi kemijskog spoja, čije je enzimsko cijepanje uvjet za farmakološku aktivnost te je odgovaran za povećano antitumorsko djelovanje, kao i za topljivost irinotekana u vodi. Osim toga, CPT-11 je poznat u dva različita oblika, aktivnom  $\alpha$ -hidroksi- $\delta$ -laktan obliku prstena i neaktivnom karboksilatnom obliku, između kojih postoji pH-ovisna ravnoteža koja značajno utječe na kinetički profil spoja (Gelderblom i sur., 1999).

Sam CPT-11 služi kao prolijek (Slika 6). Metabolizira se karboksilesterazom u jetri, probavnom sustavu, tumorima i drugim tkivima u više aktivni lipofilni metabolit, SN-38 (7-etil-10-hidroksi-kamptotecin) za koji se smatra da je primarno odgovoran za citotoksičnost CPT-11 (Tsuji i sur., 1991; Pommier i sur., 1998). SN-38 ima 100 do 1000 puta veću antitumorsku aktivnost od irinotekana, međutim, kod ljudi je samo 2 – 8 % primijenjene doze CPT-11 prevedeno u SN-38 (Iyer i sur., 1998; Senter i sur., 2001). U jetri enzim uridin difosfat glukuronoziltransferaza (UGT1A1) dalje metabolizira SN-38 putem konjugacije u sekundarni inaktivni metabolit, SN-38 glukuronid (SN-38G), koji je glavni put eliminacije SN-38 u žuč i urin. Dok gotovo svako tkivo može aktivirati irinotekan, samo ga jetra može detoksificirati glukuronidacijom. Zbog toga ovaj lijek nije preporučljivo koristiti kod pacijenata s povišenim bilirubinom ili bilo kakvim drugim poremećajem u funkciji jetre (Iyer i sur., 1998; Mathijssen i sur., 2001). Irinotekan se također metabolizira u jetri putem CYP3A4/5 pri čemu nastaju inaktivni metaboliti APC i NPC. Dolazi do reakcije oksidacije bipiperidinskog bočnog lanca koja je katalizirana

pomoću CYP3A4/5. NPC, ali ne i APC, se biotransformira u SN-38 humanim hepatijskim i plazma karboksilesterazama u *in vitro* modelu (Mathijssen i sur., 2001; Dodds i sur., 1998).



**Slika 6.** Kemijska struktura CPT-11 i njegovih glavnih metabolita (Jinno i sur., 2003)

Pošto irinotekan ostaje u velikoj mjeri nepromijenjen u obliku prolijeke prevladavajuća je frakcija u plazmi. Aktivni metabolit, SN-38, doseže maksimalnu koncentraciju u plazmi 0,5 – 2 sata nakon infuzije nakon čega se konjugira u oblik glukuronidnog metabolita koji se izlučuje s krajnjim poluživotom lijeka od 21 sat (Pommier, 2009). U usporedbi s SN-38, koncentracije SN-38G u plazmi su relativno visoke, te bi ovaj metabolit mogao biti uključen u farmakodinamiku lijeka, npr. u pogledu intestinalne toksičnosti ili u smislu izlaganja aktivnom metabolitu SN-38 koji će biti izlučen brže ili sporije, ovisno o brzini stvaranja njegovog glukuronida (Gupta i sur., 1994).

Smatra se da je SN-38 povezan s teškom dijarejom, jednom od glavnih nuspojava CPT-11, kao rezultat izravne crijevne ozljede uzrokovane SN-38. Stoga, detoksifikacija posredovana UGT1A1 bi mogla imati značajnu ulogu u zaštiti od nuspojava CPT-11 (Araki i sur., 1993; Ando i sur., 2000). Osim teške dijareje, nuspojave uključuju mijelosupresiju te GI poremećaje kao što su astenija, alopecija i anoreksija. Navedene komplikacije mogu rezultirati smanjenjem doze ili prekinućem terapije irinotekanom (Thurston, 2007; Lankisch i sur., 2008).

### 2.5.1. Mehanizam djelovanja irinotekana

Topoizomeraze su enzimi koji imaju sposobnost mijenjanja topologije, odnosno trodimenzionalne strukture DNA kataliziranjem lomljenja i ponovnog povezivanja fosfodiesterske okosnice DNA lanaca tijekom normalnog staničnog ciklusa, bez mijenjanja njene kemijske strukture (Freres i sur., 2016; Holden, 2001). Ljudski genom sadrži sedam topoizomeraznih gena koji kodiraju nuklearnu topoizomerazu I (TOP1), mitohondrijsku topoizomerazu I (TOP1 mt), topoizomeraze II  $\alpha$  i  $\beta$  (TOP2  $\alpha/\beta$ ), topoizomeraze III  $\alpha$  i  $\beta$  (TOP3  $\alpha/\beta$ ) i Spo11. Mogu se podijeliti u dvije vrste ovisno o lomljenju / ponovnoj ligaciji jednog (tip I) ili oba (tip II) DNA lanca. Stoga, enzimi tipa I su TOP1, TOP1 mt i TOP3  $\alpha/\beta$ , dok su enzimi tipa II TOP2  $\alpha/\beta$  i Spo11 (Champoux, 2001; Zhang i sur., 2001; Nitiss, 2009).

Topoizomeraza I je enzim odgovoran za kontrolu i modifikaciju molekule DNA tijekom replikacije i translacije genetičkog materijala. Posjeduje ATP-neovisnu jednolančanu endonukleolitičku aktivnost DNA, kao i funkciju ligaze. Ona smanjuje torzijsku napetost stvarajući reverzibilne jednolančane lomove (Berger, 1998; Kaufman, 1998; Kingma i Osernhoff, 1988; Champoux, 2001). Tirozin koji je u aktivnom mjestu TOP1 reagira s jednim DNA lancem i omogućava enzimu kovalentno vezanje na 3'-kraj DNA fosfodiesterske okosnice te generira DNA jednostruki lom pri čemu nastaje kompleks topoizomeraza I-DNA (TOP1-cc). Privremeno oštećeno mjesto omogućava da se odlomljeni dio DNA lanca rotira oko netaknutog komplementarnog lanca („kontrolirana rotacija“), što dovodi do učinkovite relaksacije DNA molekule bez utroška ATP-a ili  $Mg^{2+}$ . Čim se DNA relaksira, TOP1 re-ligira jednolančane DNA krajeve, poništava svoje kovalentno vezanje i disocira sa DNA. Pod fiziološkim uvjetima, ravnoteža je pomaknuta u korist netaknute DNA i nevezane TOP1 jer je brzina re-ligacije mnogo brža od brzine cijepanja, osiguravajući nisku koncentraciju TOP1-cc u stabilnom stanju (Stivers i sur., 1997; Alsner i sur., 1992; Champoux, 2001).

TOP1 ekspresija je neovisna o proliferaciji te je jednaka u mitotski aktivnim stanicama kao i u mitotski inaktivnim stanicama (metabolički aktivne stanice u fazi mirovanja,  $G_0$ ) (Baker i sur., 1995). Iako topoizomeraze nisu tumor-specifične, ekspresija TOP1 enzima je veća u tumorskom tkivu nego u istom normalnog tkiva. Pokazalo se da je razina ekspresije TOP1 povezana s povišenom transkripcijom tijekom cijelog staničnog ciklusa (Husain i sur., 1994).

Genotoksičnost irinotekana očituje se u njegovoj sposobnosti inhibicije enzima TOP1 (Xu i Villalona-Calero, 2002; Pizzolato i Saltz, 2003). Irinotekan i njegov aktivni metabolit SN-38 vežu se na TOP1-cc, sprečavajući time re-ligaciju tih jednolančanih lomova. Kad replikacijska vilica dođe do kompleksa irinotekan-TOP1-cc, jednolančani lomovi postaju reverzibilni dvolančani lomovi, te nastupa apoptoza. Iz toga možemo zaključiti da su irinotekan i njegov metabolit SN-38 specifični za S fazu staničnog ciklusa jer za svoj citotoksični učinak trebaju aktivnu DNA replikaciju (Baguley i Ferguson, 1998; Takimoto i sur., 1998). Međutim, pokazuju relativno nizak afinitet za TOP1-cc jer se ne vežu kovalentno, već putem vodikovih veza u kompleks. To znači da unatoč visokoj selektivnosti moraju biti aplicirani pri mikromolarnim koncentracijama te moraju biti dugo prisutni tijekom terapije kako bi „zarobili“ kompleks (Pommier, 2006). Isto tako, jedan od mehanizama za otklanjanje zarobljenog enzima u prisutnosti inhibitornog lijeka je proteolitička razgradnja TOP1 kovalentno vezanog na DNA, što se smatra procesom popravka DNA. Dakle, u tumorskom tkivu, učinkovitost razgradnje „zarobljenih“ TOP1-cc međuprodukata može odrediti razinu otpornosti ili osjetljivosti na terapiju baziranom na CPT-u. Čimbenici koji potiču razgradnju TOP1 još uvijek nisu sasvim jasni, međutim klinički je dokazano da neki tumori koji imaju funkcionalni stanični tumorski antigen p53 bolje odgovaraju irinotekan-induciranom oštećenju DNA od onih s neispravnim staničnim tumorskim antigenom p53. Stoga, stanje p53 čini se važnim za klinički ishod terapije s TOP1 inhibitorima (Tomicic i Kaina, 2013). Dodatno važno farmakološko obilježje je da irinotekan stabilizira samo dio postojećih TOP1-cc, odnosno onih s gvaninom na 5'-kraju loma (položaj +1), dok drugi TOP1-cc nisu meta lijeka. To objašnjava zašto je ukupna katalitička aktivnost TOP1 relativno slabo inhibirana derivatima CPT-a (Jaxel i sur., 1991; Pommier, 2009).

## 2.6. ALTERNATIVNI TESTOVI TOKSIČNOSTI

Alternativni testovi toksičnosti ili *in vitro* testovi toksičnosti uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva ili kulturama organa. Navedeni *in vitro* sustavi se uglavnom koriste kao pretestovi za odabir ciljeva i za stvaranje što iscrpnijih toksikoloških profila (Kniewald i sur., 2005; Eisenbrand i sur., 2002). Korištenje *in vitro* testova toksičnosti služi za bolje razumijevanje toksičnih učinaka kemikalija, za određivanje raspona toksične koncentracije, a korisni su i za određivanje odnosa koncentracije prema vremenu izlaganja te mehanizma djelovanja

određene tvari. Upotrebljavaju se u ispitivanjima mutagenosti, iritacije, reproduktivne toksičnosti, toksičnosti na ciljne organe, imunotoksičnosti, endokrine toksičnosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti, citotoksičnosti i karcinogenosti (Eisenbrand i sur., 2002; Tice i sur., 2000).

Pošto je mjerenje toksičnosti *in vitro* stanični događaj postiže se dobra reproducibilnost rezultata, ali je vrlo teško na staničnoj razini opisati farmakokinetiku ispitivane tvari odnosno njeno kretanje kroz organizam, od apsorpcije do eliminacije. Mora se utvrditi da ispitivani spoj do *in vitro* i *in vivo* stanica dolazi u istom aktivnom obliku, te je važno da se na temelju rezultata bilo kojeg *in vitro* testa može zaključivati o mogućim učincima u *in vivo* uvjetima (Freshney, 2010; Eisenbrand i sur., 2002).

### 2.6.1. Stanične kulture

Stanične kulture imaju široku primjenu kao bitan dio laboratorijskih tehnika za proučavanje biokemijskih i fizioloških procesa, a najčešće se koriste za praćenje djelovanja ispitivanog spoja. Pogodni su modelni sustavi za testiranje antitumorskih lijekova, za predviđanje uspješnosti terapije, za izučavanje molekularnih mehanizama kojima tumorske stanice postaju otporne na lijekove itd. U kulturi se mogu uzgajati različiti tipovi stanica, poput stanica tumora, stanica koštanog tkiva, stanice srčanog tkiva, fibroblasti i brojne druge. Sve dok im se osiguravaju hrana i optimalna atmosfera, stanice će rasti i umnažati se (Roche Diagnostics GmbH, 2012; Ban i Osmak, 1996).

Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) je 1990. godine predložio primjenu tumorskih staničnih linija za ispitivanje različitih tvari od kojih se očekuje antitumorsko djelovanje. Utemeljen je test u kojem se primjenjuje 60 različitih humanih staničnih linija na kojima se testiraju spojevi, novo sintetizirani ili izolirani iz prirodnih izvora, ali i razni biljni ekstrakti ili frakcije u širokom rasponu koncentracija kako bi se ustanovilo ima li koja od njih inhibitorni ili citotoksični učinak na tumorske stanične linije. Od 1990. godine do danas ispitano je više od 30 000 spojeva primjenom tog preliminarnog testa. Tretman može trajati 24, 48 ili 72 sata i nakon toga slijedi primjena najčešće neke kolorimetrijske metode i određivanje postotka preživljenja stanica, odnosno inhibicije rasta kao posljedice djelovanja ispitivanog spoja. Primjena NCI metode je vrlo važna u *in vitro* istraživanjima, jer olakšava otkrivanje novih antitumorskih lijekova i odabir onih spojeva koji imaju potencijal za daljnja *in vivo* istraživanja (Boyd i Paull, 1995).

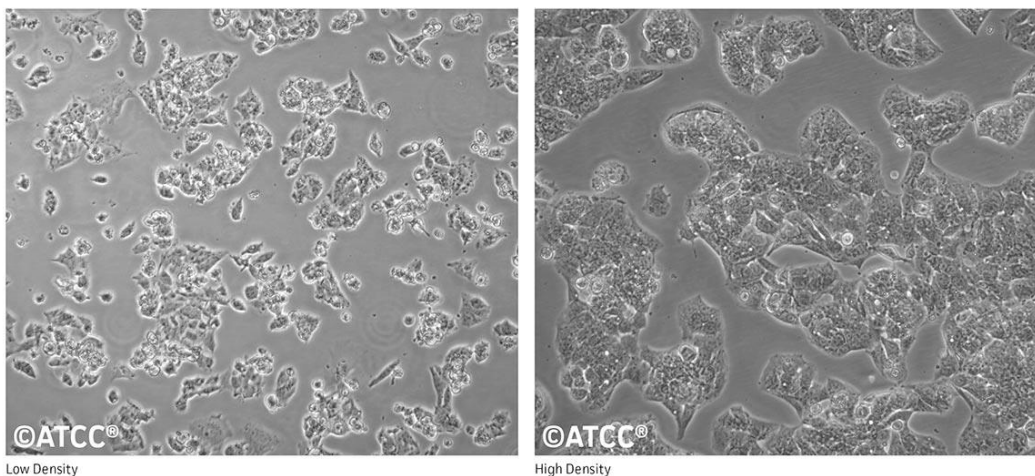
### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnih učinaka

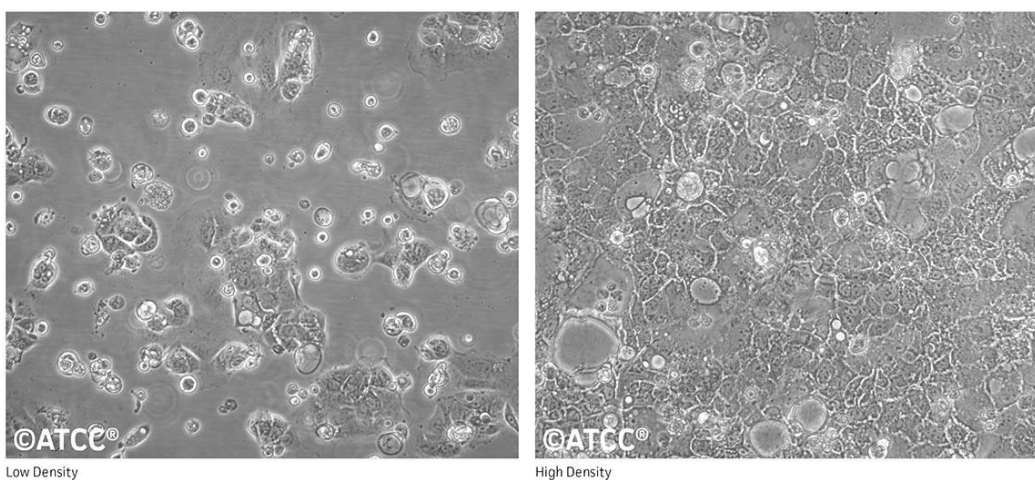
Istraživanja u ovome radu provedena su na kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) (Slika 7) te kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) (Slika 8).

ATCC Number: **HB-8065**  
Designation: **Hep G2**



**Slika 7.** Komercijalno dostupna HepG2 stanična linija (ATCC, 2017)

ATCC Number: **HTB-37**  
Designation: **Caco-2**



**Slika 8.** Komercijalno dostupna Caco-2 stanična linija (ATCC, 2017)

HepG2 stanična linija je adherentna, epitelna stanična linija dobivena iz jetre hepatocelularnog karcinoma 15-ogodišnjeg američkog bijelca (Mersch-Sundermann i sur., 2004). Redovito se primjenjuje kao *in vitro* model hepatocita te služi u ispitivanjima toksičnosti spojeva (Dehn i sur., 2004). Jetra je ključni metabolički organ pa se HepG2 stanice koriste za proučavanje metabolizma brojnih tvari. HepG2 je prva humana, tumorska stanična linija jetre koja je zamijenila „zlatni standard“ modela za ispitivanja metabolizma ksenobiotika i citotoksičnosti tvari – humane hepatocite (Gerets i sur., 2012). Također, koristi se kao modelni sustav u raznim studijama u kojima se ispituju lijekovi te u studijama metabolizma jetre i toksičnosti ksenobiotika, otkrivanju okolišnih i prehrambenih citotoksičnih i genotoksičnih, a time i citoprotektivnih i antigenotoksičnih agenasa i razumijevanju hepatokarcinogeneze (Mersch-Sundermann i sur., 2004). HepG2 stanična linija je svoju primjenu našla i kao prvi korak u ispitivanjima spojeva potencijalnog antitumorskog djelovanja (Batra i Sharma, 2013).

Caco-2 su epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma. Stanice u kulturi spontano diferenciraju i stvaraju monosloj stanica koji morfološki i funkcionalno ima slične karakteristike zrelog enterocita (Sambuy i sur., 2005). Zbog toga se ova linija osim za istraživanje tumora koristi i za proučavanje stanične permeabilnosti za potencijalni lijek, kemijskih karakteristika pasivne difuzije lijeka, toksičnosti pojedinog lijeka i drugih efekata na transepitelni transport (Meunier i sur., 1995).

Navedene stanične linije su kultivirane u monosloju u plastičnim T-bocama ravnih stijenci te u mikrotitarskim pločicama s jažicama u inkubatoru pri 37 °C u vlažnoj atmosferi (relativna vlažnost zraka 95 %) uz 5 % CO<sub>2</sub>. Kao medij za rast je korišten kompletirani medij *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Invitrogen) uz dodatak fetalnog govedjeg seruma (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS) konačne koncentracije od 10 %. Prilikom presađivanja stanica za potrebe eksperimenata korištena je 0,25 %-tna otopina tripsina.

### 3.1.2. Istraživani spoj

U istraživanju je korišten kemoterapeutik irinotekan (LC Laboratories, Woburn, MA, SAD). Iz ishodišne otopine za potrebe eksperimenta pripremljena su daljnja razrjeđenja irinotekana u hranjivom mediju neposredno prije primjene. Konačne koncentracije za tretiranje HepG2 i Caco-2 stanica su 4,25 µg mL<sup>-1</sup>, 8,5 µg mL<sup>-1</sup>, 83,6 µg



$\text{mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Stanice su tretirane s otopinama irinotekana u vremenu od 2 sata, 4 sata, 24 sata i 48 sati. Tretmani su provedeni bez oporavka i s oporavkom.

Raspon koncentracija je odabran s obzirom na terapijske doze koje se primjenjuju kod ljudi i koncentracija koje su istražene na nekim drugim sustavima. Terapijska doza u ljudi je  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , maksimalna tolerabilna doza u štakora je  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dok koncentracije  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  predstavljaju  $\text{LD}_{50}$  kod štakora kojima je lijek apliciran intravenski i oralno (de Jong i sur., 2006; Lucić Vrdoljak i sur., 2018; LC Laboratories, 2018).

### 3.1.3. Kemikalije

- 2',7'-diklorofluorescein diacetat (DCF-DA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Agaroza niske točke tališta (LMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Dimetil-sulfoksid (DMSO), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Etidij-bromid ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ ), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Fetal Bovine Serum (FBS), *Gibco, Carlsbad, SAD*
- Irinotekan, *LC Laboratories, Woburn, MA, SAD*.
- Kalij-hidrogenfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Kalij-klorid (KCl), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Natrij-hidrogenfosfat dodekahidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Natrij-hidroksid (NaOH), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Natrij-klorid (NaCl), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Natrij-laurilsarkozinat (Na-laurilsarkozinat), *Sigma-Aldrich-Chemie, Njemačka*
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Steinheim, Njemačka*
- Octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Roswell Park Memorial Institute medij s  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  glukoze,  $5958 \text{ mg L}^{-1}$   $25 \text{ mM}$  HEPES-a i L-glutaminom (RPMI 1640), *Invitrogen, SAD*
- Tripsin, *Gibco, Carlsbad, SAD*
- Tris-HCl, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Triton X-100, *Sigma-Aldrich-Chemie, SAD*

*i) Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti:*

a) Fosfatni pufer - PBS (pH = 7,2 - 7,4):

Natrijev-klorid	4,0 g
Kalijev-klorid	0,1 g
Natrijev-hidrogenfosfat dodekahidrat	1,16 g
Kalijev-hidrogenfosfat	0,1 g
Destilirana voda	500,0 mL

Sterilizira se 15 minuta pri 120 °C i tlaku  $1,01 \times 10^5$  Pa

b) Ishodišna otopina Neutral red ( $\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ):

Neutral red	50,0 mg
Etanol	10,0 mL

c) Radna otopina Neutral red (0,1 %):

Ishodišna otopina Neutral red ( $\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ )	0,1 mL
RPMI medij za uzgoj stanica	10,0 mL

d) Otopina za odbojavanje:

Octena kiselina	1,0 mL
Etanol	50,0 mL
Destilirana voda	49,0 mL

*ii) Otopine korištene za određivanje reaktivnih kisikovih radikala:*

a) Ishodišna otopina 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCF-DA):

DCF-DA	1,5 mg
DMSO	1,5 mL

b) Radna otopina 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCF-DA) (c = 0,05 mM):

Ishodišna otopina DCF-DA (c = 2 mM)	0,5 mL
PBS pufer (pH = 7,2-7,4)	9,3 mL

*iii) Otopine korištene za povodjenje komet testa:*

a) Otopina NMP agaroze (1,5 %):

NMP agarozna	76 mg
PBS pufer (pH=7,2-7,4)	5,0 mL

b) Otopina LMP agaroze (0,5 %):

LMP agarozna	25 mg
Destilirana voda	5,0 mL

d) Pufer za lizu stanica (pH = 7,5):

Natrij-klorid (2,5 M)	130,0 g
Na <sub>2</sub> EDTA (100 mM)	29,225 g
Tris-HCl (10 mM)	1,078 g
Na-laurilsarkozinat (1%)	8,9 g

Čuvanje na sobnoj temperaturi.

Sat vremena prije lize stanica, u 89 mL matične otopine pufera za lizu potrebno je dodati 1 mL Triton X-100 i 10 mL 10 %-tne otopine DMSO. Pripremljenu otopinu čuvati u hladnjaku 1h te je nakon toga spremna za obradu stanica.

e) Pufer za elektroforezu (pH = 7,5):

Natrij-hidroksid (10 M)	30,0 mL
Na <sub>2</sub> EDTA (200 mM)	5,0 mL
Destilirana voda	965,0 mL

f) Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5):

Tris-HCl	48,5 g
Destilirana voda	1000,0 mL

g) Otopina etidij-bromida:

Etidij-bromid	2,0 µg
Destilirana voda	1,0 mL

### 3.1.4. Laboratorijska oprema

#### *i) Laboratorijski uređaji*

- Analitička vaga, 1712 Mp8, Silver Edition, *Sartorius, Velika Britanija*
- Centrifuga za Eppendorf epruvete, HC-240, *Tehcnica-Železniki, Slovenija*
- Čitač mikrotitarskih pločica, *Cecil Instruments Ltd, Engleska*
- Epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka*
- Fluorimetar, *FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Njemačka*
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, *Forma Scientific, SAD*
- Invertni mikroskop, *Optika Microscopes, Ponteranica, Italija*
- Klasična centrifuga, Megafuge 1.0 Heraeus, *Sepatech, Gottlieb, Italija*
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, *Iskra, Šentjernej, Slovenija*
- Miješalica, MS1 minishaker, *IKA®Works, Inc. Wilmington, Staufen, Njemačka*
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambrige, Engleska*
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa *Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd, UK*
- Termoblok, *ISKRA, Slovenija*
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies, New York, SAD*
- Vibromikser EV-202 i EV-100, *Tehcnica-Železniki, Slovenija*

#### *ii) Laboratorijski pribor:*

- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf epruvete
- Erlenmeyerove tikvice, 20-100 mL
- Kivete za spektrofotometar
- Laboratorijske žlice
- Menzure, 50-1000 mL
- Mikropipete, 10, 20, 200, 1000 µL, *Eppendorf, Hamburg, Njemačka*
- Mikrotitarske pločice (96 well), *Falcon, SAD*
- Pasteurove pipete, 5-25 mL
- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice, *Aptaca, Canelli, Italija*
- Pokrovna stakalca

- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-20 mL
- T-boca, Falcon, *BD Company, Franklin Lakes, SAD*
- Vata za pravljenje čepova

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Nasađivanje i kultivacija staničnih linija HepG2 i Caco-2 u monosloju

Zamrznute stanične kulture (s 10 % glicerola) su s -80 °C odmrznute u vodenoj kupelji pri 37 °C, potom centrifugirane (100 rpm / 5 min) te je uklonjen supernatant koji sadrži ostatke medija i krioprotektivnog sredstva (glicerol). Na dobiveni talog dodan je 1 mL svježeg medija zagrijanog pri 37 °C. Stanice su resuspendirane i ponovno centrifugirane (1000 rpm / 1,5 min), a zatim nasađene u Petrijevu zdjelicu promjera 5 cm (na taj način je izvršena propagacija stanica). Nakon 24 sata stanice su nasađene u T-boce većeg volumena i uzgajane u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (pri 37 °C, uz 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub>) do subkonfluentnog stanja, kada se mogu koristiti za eksperimentalni rad. Rad s kulturama humanih stanica odvija se u aseptičkim uvjetima koji se osiguravaju radom u komori za sterilan rad (laminaru) (Freshney, 2010).

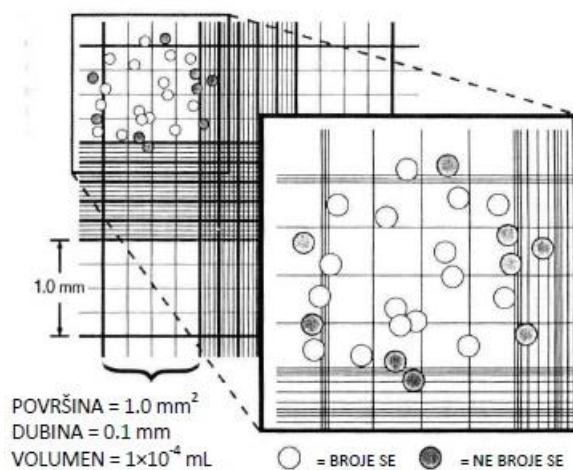
#### 3.2.1.1. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja

Stanice se presađuju nakon što postignu 80 – 90 % konfluentnosti te se koriste za eksperimentalni rad. Priprema započinje uklanjanjem medija sa stanica u T-bocama (25 cm<sup>2</sup> ili 75 cm<sup>2</sup>). Potom se stanice isperu tripsinom (1 mL) te se minimalna količina otopine tripsina (2 mL) dodaje na stanice, upravo onoliko kako bi pokrila dno T-boce. Djelovanje tripsina očituje se odvajanjem stanica od podloge. Stanice sa tripsinom se inkubiraju, a vrijeme izloženosti tripsinu ovisi o vrsti stanica i starosti tripsina zbog čega je potrebna stalna kontrola pod mikroskopom u cilju utvrđivanja trenutka kada dolazi do odljepljivanja stanica s dna T-boce te njihovog pokretanja u smjeru kretanja otopine tripsina. Proteolitički učinak enzima tripsina (tripsinizacija) se zaustavlja tako da se na stanice dodaje medij (5 ili 10 mL) sa serumom (Freshney, 2000) uz resuspendiranje pomoću pipete. Veći dio suspenzije stanica se koristi za eksperimente, a manja količina stanica ostaje u T-boci uz dodatak svježeg medija za daljnji rast stanica.

Stanice je potrebno izbrojati i nasaditi točno određeni broj kako bi se dobivene vrijednosti eksperimentom mogle uspoređivati i kako bi podjednaki broj stanica bio izložen djelovanju određenog spoja.

### 3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra

Stanice se broje pomoću Bürker-Türkove komorice pod svjetlosnim mikroskopom. Mikropipetom je uzeto 20  $\mu\text{L}$  uzorka iz stanične suspenzije dobivene nakon tripsinizacije. Uzorak je ponovno resuspendiran te volumena 10  $\mu\text{L}$  nanesen na Bürker-Türkovu komoricu ispod pokrovnog stakalca koje je prethodno postavljeno. Stanice su izbrojane u četiri velika kvadrata (prvi slijeva gore, drugi desno gore, prvi lijevo dolje, drugi desno dolje), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost. Svaki veliki kvadrat sastoji se od 16 malih kvadrata. Prostor između ispravno postavljene predmetnice i pokrovnog stakalca (pri čemu su vidljivi Newtonovi kolobari) iznosi 0,1 mm, a dužina i širina svakog kvadrata iznosi 1 mm. Iz toga proizlazi da se iznad svakog velikog kvadrata nalazi volumen tekućine od  $10^{-4}$  mL. Konačni broj stanica izražen je po 1 mL stanične suspenzije (Slika 9).



**Slika 9.** Brojanje stanica pomoću hemocitometra (HEMO, 1998)

Ukupan broj stanica u uzorku izračunava se prema jednadžbi [1]:

$$\text{Ukupan broj stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica} * 10^4 (\text{stanica mL}^{-1})$$

[1]

### 3.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija irinotekana na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 Neutral red testom

Neutral red (eng. *neutral red*, NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) je jednostavan test kojim se kvantitativno određuje broj živih stanica i jedan je od najučestalije korištenih testova citotoksičnosti. Temelji se na svojstvu živih stanica da, nakon inkubacije s ispitivanim ksenobioticima, Neutral red boju unose u stanicu aktivnim transportom i vežu je u lizosomima (Repetto i sur., 2008). NR je slabo kationska boja koja prolazi kroz membranu stanice neionskom difuzijom i unutar stanice se veže na anionske dijelove lizosomalnog matriksa (unutar lizosoma pH je manji u odnosu na citoplazmatski pH). Ksenobiotici koji oštećuju staničnu ili lizosomalnu membranu smanjuju unos i zadržavanje boje. Stanice koje je ispitivani ksenobiotik ošteti, ili pak uzrokovao nekrozu, ne zadržavaju boju nakon ispiranja i procesa fiksacije. Dakle, ukoliko ne dođe do nakupljanja boje unutar lizosoma pretpostavlja se da je došlo do oštećenja stanica. Nakupljena boja u stanici se zatim ekstrahira i mjeri se apsorbancija ekstrahirane boje koja je u direktnoj ovisnosti o broju živih stanica (Babich i Borenfreund, 1991).

Ishodišna otopine boje NR priređuje se otapanjem boje u etanolu do konačne koncentracije  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , te se inkubira 24 sata pri  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga priprema se 10 %-tna otopina razrjeđivanjem ishodišne otopine boje u mediju za uzgoj stanica, te se filtrira kako bi se uklonili neotopljeni kristali i osigurala sterilnost (Babich i Borenfreund, 1991).

Ispitivanje citotoksičnosti provedeno je na HepG2 i Caco-2 stanicama. Na mikrotitarske pločice s 96 jažica nacjepljuju se suspenzije stanica HepG2 i Caco-2 u koncentraciji od  $10^5 \text{ st mL}^{-1}$  ( $100 \text{ } \mu\text{L}$  po jažici), koje se inkubiraju 24 sata pri  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sljedećeg dana, nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i nakon što je započela dioba stanica, uklanja se medij sa stanica. Potom se stanice tretiraju sa pet prethodno pripremljenih otopina irinotekana različitih koncentracija:  $4,25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $83,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $867 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $100 \text{ } \mu\text{L}$  po jažici) u trajanju inkubacije od 2, 4, 24 i 48 sati pri  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kao negativna kontrola, korišten je uzgojni medij. Također, stanice su tretirane otopinama irinotekana bez oporavka i s oporavkom. Kod tretmana bez oporavka, odmah po završetku tretmana irinotekanom određeno je preživljenje stanica Neutral red testom, dok se kod tretmana s oporavkom, nakon završetka tretmana s irinotekanom sa stanica uklanja otopina irinotekana i medij, te se dodaje svježi medij u sve jažice mikrotitarske pločice (izuzev slijepe probe) te se inkubira 24 sata pri  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i potom se određuje preživljenje Neutral red metodom.

Po završetku tretmana iz jažica su uklonjene otopine irinotekana i medij, te su stanice isprane PBS puferom (100  $\mu$ L) kako bi se uklonili ostaci otopine irinotekana i medija. Nakon ovog postupka u jažicama ostaju isprane stanice na koje je dodana pripremljena radna otopina Neutral red boje (100  $\mu$ L po jažici), te slijedi inkubacija 1 sat pri 37 °C. Zatim je uklonjena otopina Neutral red iz jažica i stanice se ponovno ispiru sa 100  $\mu$ L PBS pufera. Naposljetku, u jažice je dodano 100  $\mu$ L otopine za odbojavanje kako bi se boja ekstrahirala iz lizosoma živih stanica (Repetto i sur., 2008). Intenzitet obojenja izmjeren je pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 540 nm i proporcionalan je broju preživjelih stanica. Kao slijepa proba služi jažica u koju nisu nacijepljene stanice.

Postotak preživljenja izračunat je u odnosu na negativnu kontrolu prema niže navedenoj jednadžbi [2]. Usporedbom intenziteta obojenja u stanicama tretiranih s otopinama različitih koncentracija irinotekana i kontrolnih stanica, određen je postotak preživljenja i određena je subtoksična koncentracija otopina irinotekana koja će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Svaka koncentracija je ispitivana u četiri replike, a svaki eksperiment je ponovljen barem dva puta.

$$\text{Preživljenje stanica (\% u odnosu na kontrolu)} = \left( \frac{A_{520nm} \text{ otopine irinotekana}}{A_{520nm} \text{ kontrole}} \right) * 100$$

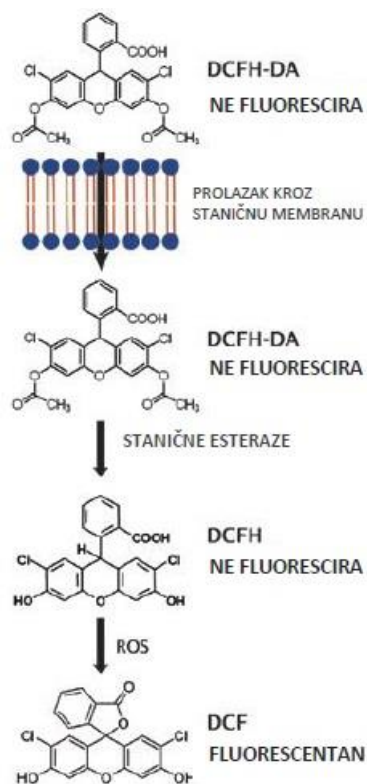
[2]

#### 3.2.4. Određivanje prooksidativnog učinka različitih koncentracija irinotekana na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 DCF-DA testom

Određivanje reaktivnih kisikovih radikala nastalih bazalnim metabolizmom ili metabolizmom ksenobiotika kojima su stanice izložene vrši se 2',7'-diklorofluorescein diacetat fluorimetrijskim testom. 2',7'-diklorofluorescein diacetat (DCF-DA) je neionski, nepolarni spoj koji ne fluorescira. Kemijska građa omogućuje mu laku difuziju kroz staničnu membranu gdje se u citosolu stanica djelovanjem intracelularnih enzima prevodi u 2',7'-diklorofluorescein (DCFH) koji također nije fluorescentan. U prisutnosti ROS-a, DCFH se oksidira u diklorofluorescein (DCF) koji je izrazito fluorescentan (Li i sur., 2000) (Slika 10). Intenzitet fluorescencije mjera je prisutnosti slobodnih radikala u stanici. Fluorescencija se mjeri u fluorimetru pri valnim duljinama od  $485 \pm 10$  nm za ekscitaciju i  $530 \pm 12,5$  nm za emisiju. Metoda je osjetljiva na fotooksidaciju (Wang i Joseph, 1999), stoga se otopina DCFH-DA mora uvijek svježe pripremati.



Ishodišna otopina DCFH-DA (2 mM) dobivena je otapanjem 1,5 mg DCFH-DA u 1,5 mL DMSO-a. Za tretman stanica, iz ishodišne otopine pripremljena je radna, 50  $\mu\text{M}$  otopina DCFH-DA (Silveira i sur., 2003).



**Slika 10.** Reakcijska shema DCFH-DA (Cell Biolabs, Inc., 2014)

Za određivanje prooksidativnog djelovanja otopine različitih koncentracija irinotekana, stanične suspenzije HepG2 i Caco-2 naciepljuju se na crne mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ , te se inkubiraju 24 sata pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . U svaku jažicu naciepljeno je  $100\text{ }\mu\text{L}$  stanične suspenzije. Sljedećeg dana, nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i nakon što je počela dioba stanica, uklanja se medij sa stanica. Potom se stanice tretiraju sa pet prethodno pripremljenih otopina irinotekana različitih koncentracija:  $4,25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $83,6\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  i  $867\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $100\text{ }\mu\text{L}$  po jažici) u trajanju inkubacije od 2, 4, 24 i 48 sati pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$  bez i s oporavkom. Kao negativna kontrola, korišten je uzgojni medij.

Nakon tretmana, iz jažica su uklonjene otopine irinotekana i medij, stanice su isprane PBS puferom ( $100\text{ }\mu\text{L}$ ) kako bi se uklonili ostaci otopine irinotekana i medija, te je na stanice dodano  $100\text{ }\mu\text{L}$   $50\text{ }\mu\text{M}$  otopine DCFH-DA koja je pripremljena u PBS-u. Nakon inkubacije, koja traje 30 minuta pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , izmjeren je intenzitet fluorescencije

fluorimetrom pri valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i valnoj duljini emisije 530 nm ( $\lambda_{em}485$  i  $\lambda_{ex}530$  nm). Kao slijepa proba služi jažica u koju nisu nacijepljene stanice.

Usporedbom intenziteta fluorescencije negativne kontrole i stanica tretiranih različitim koncentracijama irinotekana, određeno je potencijalno prooksidativno djelovanje irinotekana. Postotak indukcije slobodnih radikala izračunat je u odnosu na negativnu kontrolu prema niže navedenoj jednadžbi [3]. Svaka koncentracija je ispitivana u četiri replike, a svaki eksperiment je ponovljen barem dva puta.

$$\text{Indukcija slobodnih radikala (\% u odnosu na kontrolu)} = \left( \frac{\text{intenzitet fluorescencije otopine irinotekana} / \% \text{ preživljenja}}{\text{intenzitet fluorescencije kontrole}} \right) * 100$$

[3]

### 3.2.5. Određivanje oštećenja DNA komet testom izazvanih različitim koncentracijama irinotekana na HepG2 i Caco-2 staničnim linijama

Komet test (eng. *single cell gel electrophoresis* ili *comet assay*, SCGE) je jednostavna, brza i osjetljiva tehnika za analizu i mjerenje razine oštećenja i popravka molekule DNA na razini pojedinačne stanice (Dusinska i Collins, 2008). Metoda je nazvana „komet” jer, gledana pod mikroskopom, stanica podsjeća na komet čiju glavu čini intaktna DNA, a rep tvore fragmenti DNA (Gamulin i sur., 2007). Ova metoda često se koristi u istraživanjima *in vitro* u kojima se želi procijeniti genotoksični potencijal nekog prirodnog spoja (Salopek-Sondi i sur., 2010). Za provođenje testa mogu se koristiti sve stanice s jezgrom (Collins i sur., 2008).

Princip metode je horizontalna elektroforeza individualnih stanica u gelu agaroze. Stanice se prethodno liziraju pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata kako bi se otklonili stanični proteini (histoni) te se DNA molekuli omogućilo odmatanje pod alkalnim ili neutralnim uvjetima. Nakon toga se DNA izlaže djelovanju električnog polja (elektroforezi), a zatim oboji fluorescentnim bojama. Tijekom elektroforeze mali fragmenti DNA, nastali lomovima (kromosomskim aberacijama), putuju kroz pore gela prema anodi, dok intaktna DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost. Kraći fragmenti brže putuju kroz gel, pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. DNA i obrasci putovanja njenih fragmenata nakon bojanja fluorescencijskom bojom pod

mikroskopom su vidljivi kao „kometi“. Za njihovu analizu i mjerenje najčešće se koristi epifluorescencijski mikroskop i računalni program za analizu slike *Comet Assay II* (Perceptive Instruments Ltd., UK). Na mjerenim se kometima utvrđuju tri osnovna parametra: dužina repa, intenzitet repa i repni moment. Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA, a obično se mjeri od sredine ili ruba glave kometa i izražava u  $\mu\text{m}$ . Intenzitet repa kometa označava % DNA koji je migrirao u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu. Udaljenost na koju otputuju fragmenti DNA koja je „otpuštena“ od glave kometa direktno je proporcionalna oštećenju DNA. Prihvatljivom razinom oštećenja smatraju se vrijednosti do 10 % DNA u repu kometa. Dulji rep, veći intenzitet repa i veći repni moment ukazuju na veća oštećenja molekule DNA (Collins i sur., 2008).

U plastične Petrijeve zdjelice promjera 5 cm naciepljuje se 3 mL stanične suspenzije HepG2 i Caco-2 u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ . Stanice se inkubiraju 24 sata pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije uklanja se medij sa stanica, te se stanice tretiraju sa četiri prethodno pripremljenih otopina irinotekana različitih koncentracija:  $4,25\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $83,6\ \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$  (3 mL po Petrijevoj zdjelici) u trajanju inkubacije od 2, 4, 24 i 48 sati pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . U slučaju negativnih kontrola isti postupak je proveden s medijem obogaćenim serumom umjesto otopina irinotekana.

Po završetku tretmana iz Petrijevih zdjelica su uklonjene otopine irinotekana i medij, te su stanice ispirane PBS puferom (1 mL) kako bi se uklonili ostaci otopine irinotekana i medija. Stanice se zatim tripsiniziraju dodatkom 0,5 mL 0,25 %-tnog tripsina, prebacuju u Eppendorf epruvete uz dodatak 0,5 mL medija te se potom centrifugiraju (5000 rpm / 5 min). Iz Eppendorf epruveta ukloni se supernatant, talog se još jednom ispire (1 mL PBS pufera, 5000 rpm / 5 min), uklanja se supernatant, a suspenzija stanica se stavi u led kako bi se tijekom pripreme uzoraka izbjegao popravak ili nastanak novih lomova.

Na brušena predmetna stakalca se nanosi 300  $\mu\text{L}$  otopine 1,5 %-tne agaroze normalne točke tališta (eng. *normal melting point*, NMP) koja je pripremljena kuhanjem u PBS puferu. Nakon polimerizacije koja se odvija pri  $4\text{ }^\circ\text{C}$  u vlažnoj atmosferi, stakalca su spremna za nanošenje uzoraka. Potrebno je pripremiti 0,5 %-tnu agarozu niske točke tališta (eng. *low melting point*, LMP) u destiliranoj vodi kratkim kuhanjem. Po 100  $\mu\text{L}$  0,5 %-tne LMP agaroze zagrijane pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$  pipetira se u Eppendorf epruvete sa staničnim suspenzijama, sadržaj se dobro resuspendira te nanosi na polimerizirani sloj NMP agaroze. Nakon polimerizacije, pipetom se na stakalca stavlja još jedan sloj od 100  $\mu\text{L}$  LMP

agaroze. Kada zadnje nanese sloj LMP agaroze polimerizira provodi se liza stanica u ohlađenom puferu za lizu stanica (4 °C / 1 sat). Stakalca se zatim prenose u elektroforetsku kadu koja je prethodno napunjena puferom za elektroforezu (alkalnog pH). Odmatanje DNA odvija se pri 4 °C 30 minuta, nakon čega se mikrogelovi podvrgavaju elektroforezi pri jakosti istosmjerne struje od 300 mA i naponu 25 V tijekom 25 minuta. Nakon što se stakalca izvade iz elektroforetske kadice, ispiru se puferom za neutralizaciju (0,4 M Tris-HCl pufer, pH = 7.5) pri sobnoj temperaturi, tri puta po 5 minuta. Ovako pripremljeni mikrogelovi prije analize su obojani etidij bromidom (20 µg mL<sup>-1</sup>; V = 50 µL) u trajanju od 10 minuta, nakon čega su kratko isprani sa Tris-HCl puferom (pH = 7,5). Slijedi analiza i mjerenje pod fluorescentnim mikroskopom. Radi stabilizacije boje preparati su prije mikroskopske analize držani u mraku najmanje 15 minuta.

Mikroskopska analiza preparata provedena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515 – 560 nm. Mjerenja su provedena pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II*. Uzorci su mjereni tri puta, pri čemu je po svakom stakalcu izmjereno 150 kometa. Program istovremeno mjeri različite parametre kometa, a za potrebe ovog istraživanja kao pokazatelj razine oštećenja molekule DNA, uzrokovane genotoksičnim učinkom otopina irinotekana različitim koncentracijama, korišteni su parametri dužina repa, intenzitet repa i repni moment.

### 3.2.6. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani u grafičkom obliku kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije. Rezultati dobiveni Neutral red testom, 2',7'-DCFH-DA testom i komet testom, statistički su obrađeni jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA) korištenjem Scheffé-ovog *post hoc* testa uz granicu statističke značajnosti  $P < 0,05$  korištenjem programskog sustava SPSS 17.0 (IBM, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Citotoksični, prooksidativni i mutageni učinak otopina različitih koncentracija irinotekana istraženi su na kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 i kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati, s i bez oporavka. Citotoksičnost otopina različitih koncentracija irinotekana određena je Neutral red testom, prooksidativnost DCFH-DA testom, a genotoksični učinak na DNA određen je komet testom koji je izvršen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

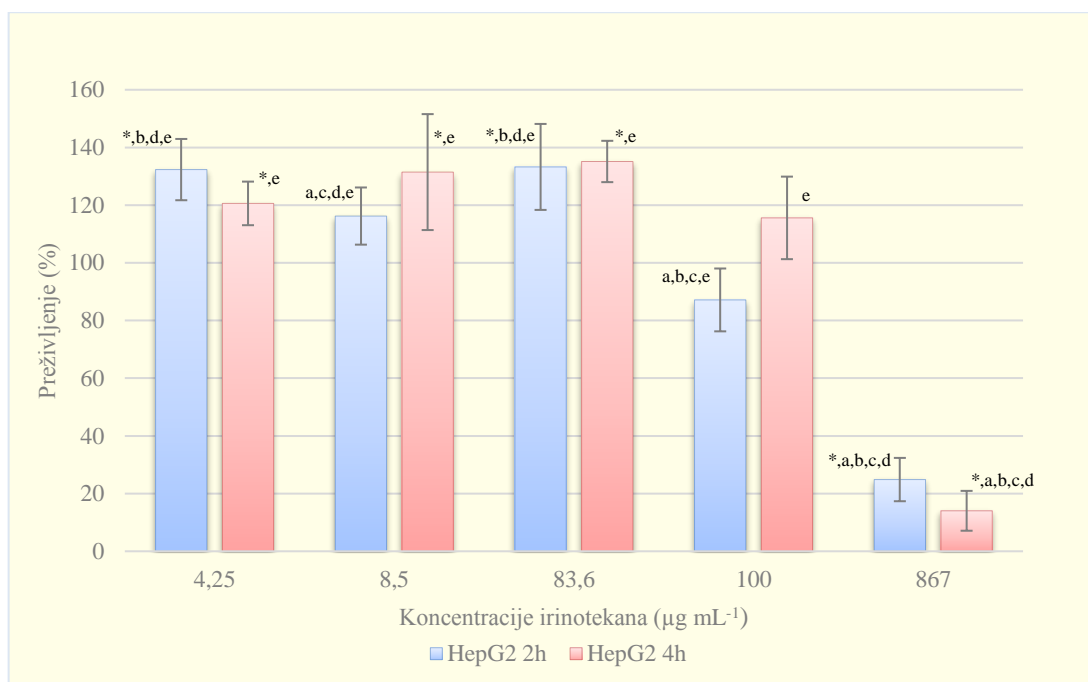
### **4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG UČINKA IRINOTEKANA**

Ispitivanje citotoksičnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) provedeno je Neutral red testom, opisanom u poglavlju 3.2.3., na staničnim linijama HepG2 i Caco-2. Citotoksični učinak otopina irinotekana praćen je u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati, s i bez oporavka, nakon čega je određeno njihovo preživljenje u odnosu na netretirane stanice (negativnu kontrolu).

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izračunata iz vrijednosti apsorbancije kao postotak kontrole) o koncentracijama irinotekana.

## HepG2

Na Slikama 11, 12, 13 i 14 prikazani su rezultati citotoksičnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija na staničnu liniju HepG2 nakon 2 i 4 sata inkubacije bez oporavka i s oporavkom te nakon 24 i 48 sati inkubacije bez oporavka i s oporavkom (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama).



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

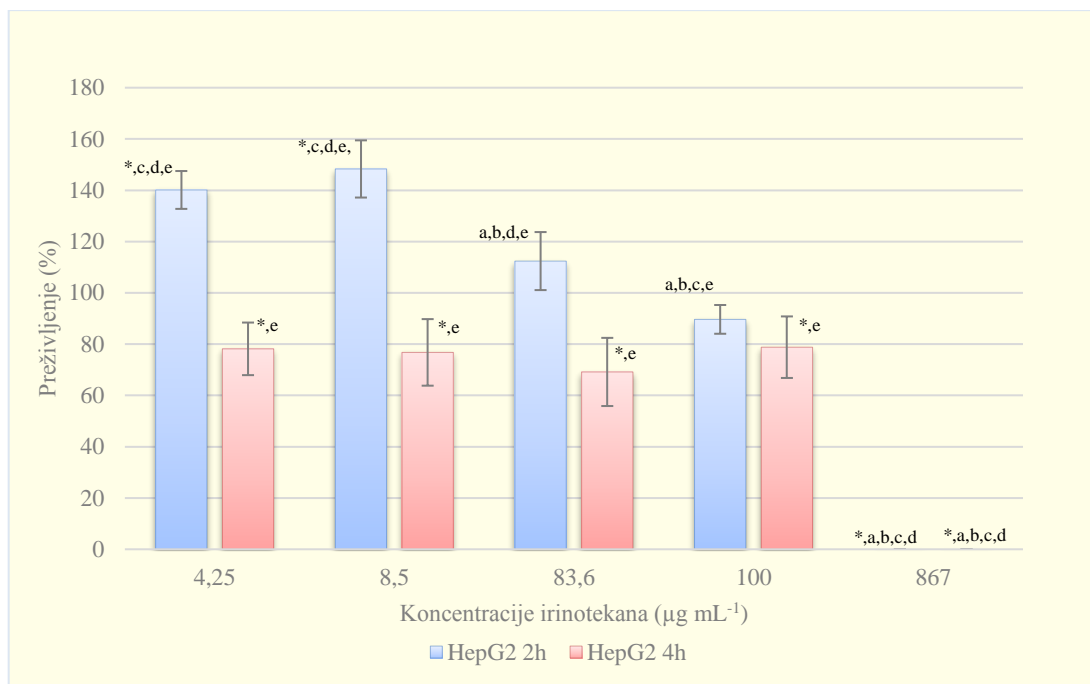
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 11.** Preživljenje stanične linije HepG2 nakon 2 i 4 sata tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 11 vidljivo je da samo najviša ispitana koncentracija irinotekana ( $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) djeluje citotoksično na HepG2 stanice nakon 2 i 4 sata inkubacije bez oporavka. Suprotno tome, kod kratkog vremena izlaganja stanica nižim koncentracijama irinotekana ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) došlo je do proliferacije stanica.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

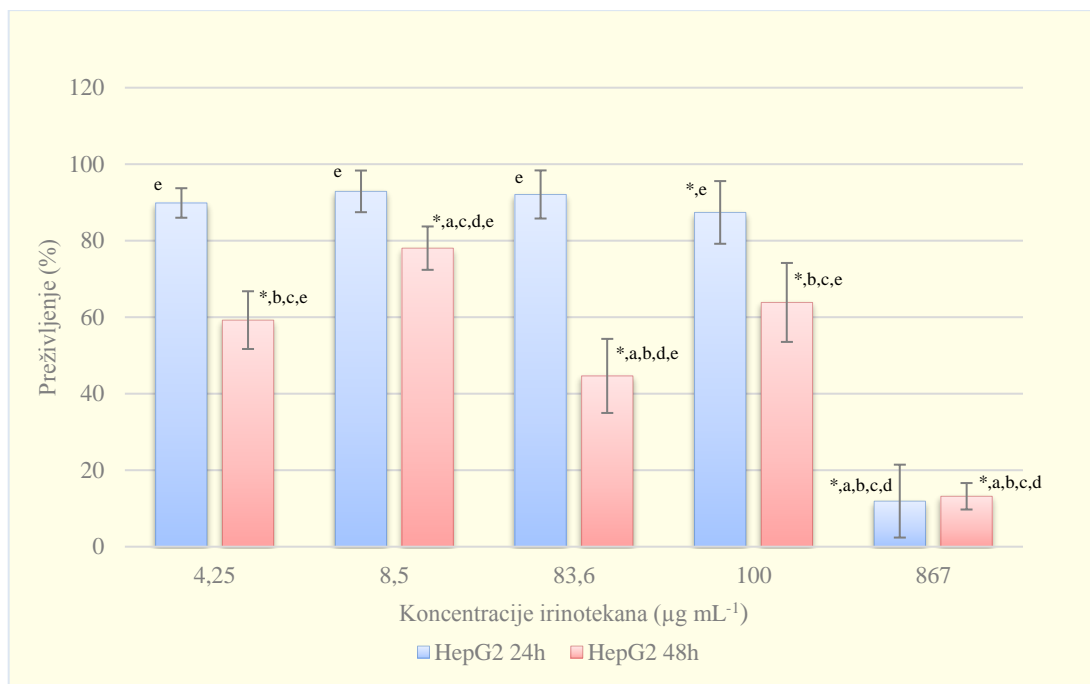
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 12.** Preživljenje stanične linije HepG2 nakon 2 i 4 sata tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 12 vidljivo je da tijekom 2 sata tretmana HepG2 stanica s oporavkom niti jedna od ispitivanih koncentracija irinotekana, izuzev najveće koncentracije ( $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ne djeluje citotoksično na HepG2 stanice. Štoviše, došlo je do proliferacije stanica. Međutim, s povećanjem koncentracije uočava se smanjenje proliferacije. S druge strane, tijekom 4 sata tretmana HepG2 stanica s oporavkom vidljivo je statistički značajno smanjenje preživljenja.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

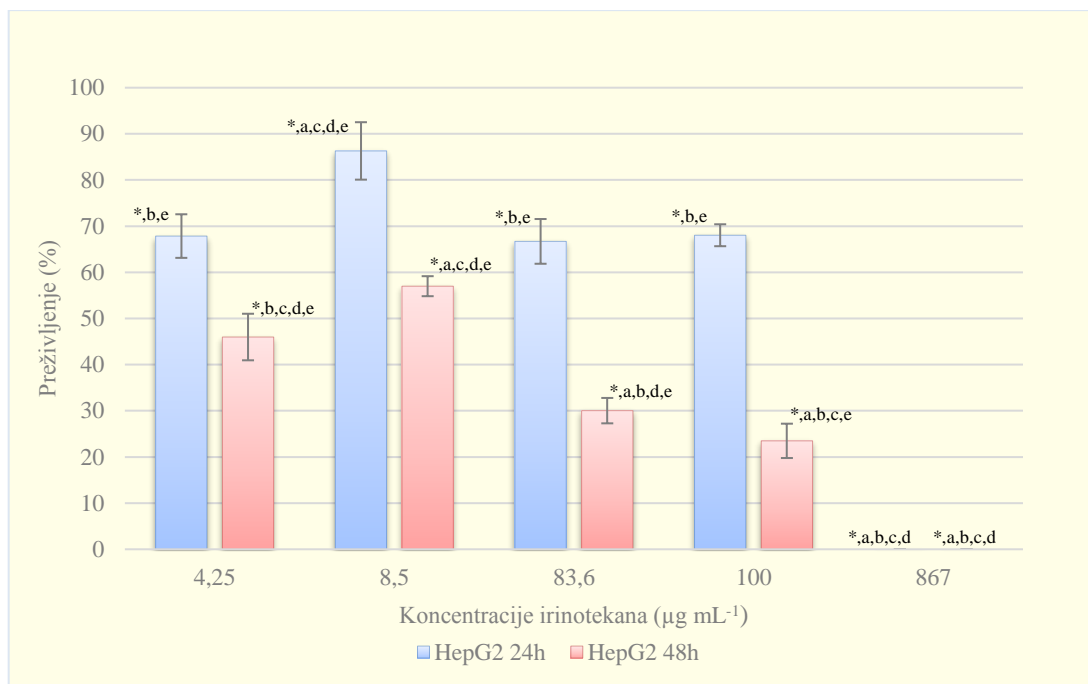
d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 13.** Preživljenje stanične linije HepG2 nakon 24 i 48 sati tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 13 vidljivo je da tijekom 24 sata tretmana HepG2 stanica bez oporavka niti jedna od ispitivanih koncentracija irinotekana, izuzev najveće koncentracije ( $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ne djeluje citotoksično na HepG2 stanice. Usporedbom s tretmanom HepG2 stanica 2 i 4 sata bez oporavka može se uočiti da nakon 24 sata tretmana HepG2 stanica bez oporavka nema indukcije proliferacije. Tijekom 48 sati tretmana HepG2 stanica bez oporavka vidljivo je statistički značajno smanjenje preživljenja. Bitno je napomenuti da smanjenje preživljenja nije ovisno o koncentraciji.





\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 14.** Preživljenje stanične linije HepG2 nakon 24 i 48 sati tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

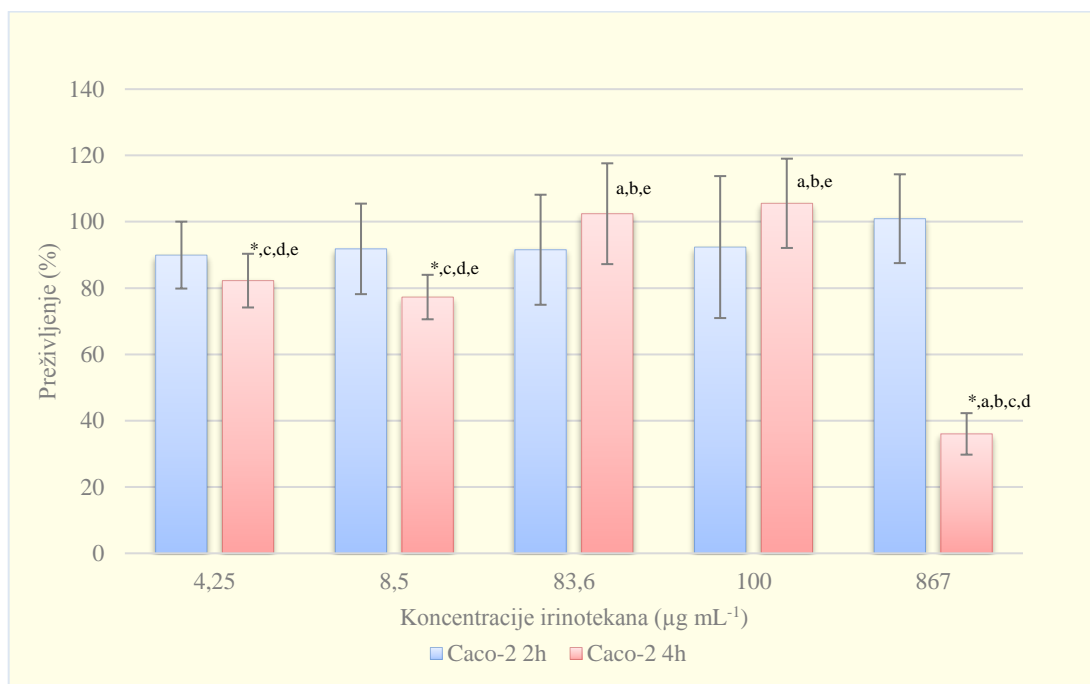
Iz grafičkog prikaza Slike 14 vidljivo je da nakon 24 sata tretmana HepG2 stanica s oporavkom irinotekan izaziva blagi citotoksični učinak koji nije ovisan o koncentraciji te je podjednak u koncentracijskom rasponu od  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dok se nakon 48 sati tretmana HepG2 stanica s oporavkom uočava o koncentraciji ovisno smanjenje preživljenja.

Dobiveni rezultati upućuju kako su stanice jetre u ispitanim eksperimentalnim uvjetima bile relativno slabo osjetljive na toksični učinak irinotekana. Pravi toksični učinak može se primijetiti nakon produžene izloženosti irinotekanu (48 sati), te je naročito vidljiv nakon 48 sati tretmana irinotekanom s oporavkom. Ta se zapažanja mogu dovesti u vezu s metaboličkim statusom stanica, koje su zadržale brojne enzimske sustave odgovorne za biotransformaciju kemikalija.

Što se tiče terapijske koncentracije irinotekana  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , što odgovara dozi 600 mg lijeka na 70 kg tjelesne mase, može se zaključiti da kraće vrijeme izloženosti HepG2 stanica toj koncentraciji irinotekana ima blagi proliferativni učinak, dok se s oporavkom i produljenjem vremena izloženosti HepG2 stanica uočava blagi citotoksični učinak koji se povećava produljenjem inkubacije (24 i 48 sati, bez i s oporavkom).

## Caco-2

Na Slikama 15, 16, 17 i 18 prikazani su rezultati citotoksičnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija na staničnu liniju Caco-2 nakon 2 i 4 sata inkubacije bez oporavka i s oporavkom te nakon 24 i 48 sati inkubacije bez oporavka i s oporavkom (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama).



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

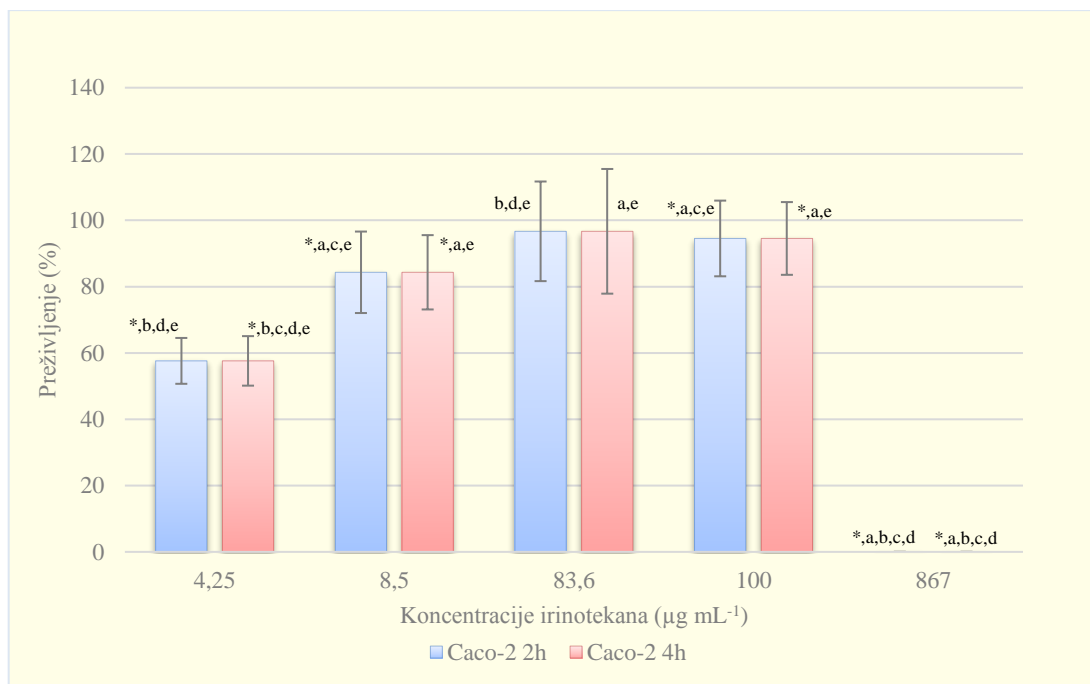
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 15.** Preživljenja stanične linije Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 15 vidljivo je da niti jedna od ispitivanih koncentracija irinotekana ne djeluje toksično na Caco-2 stanice nakon 2 sata inkubacije, dok nakon 4 sata inkubacije niske koncentracije ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pokazuju blagi citotoksični učinak. Usporedimo li rezultate dobivene pri kratkim vremenima inkubacije na staničnoj liniji HepG2, može se zaključiti da su Caco-2 stanice osjetljivije na toksični učinak irinotekana.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

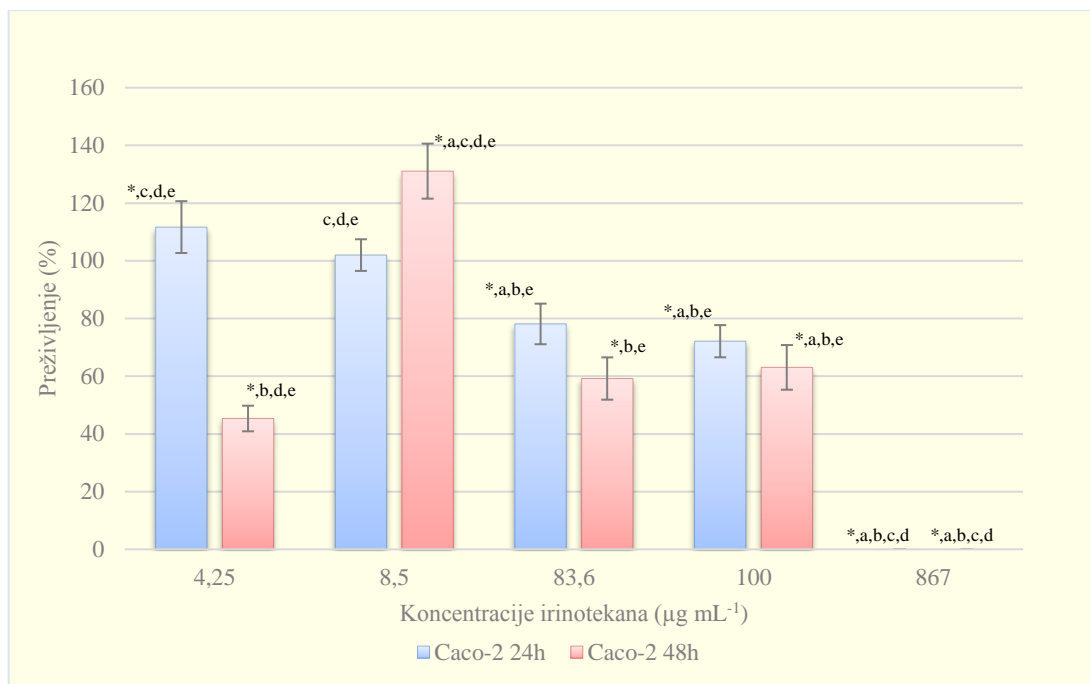
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 16.** Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 16 vidljivo je da je tretman Caco-2 stanica od 2 i 4 sata s oporavkom rezultirao s povećanom citotoksičnošću kod niskih koncentracija irinotekana ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), s time da nema razlike u preživljenju Caco-2 stanica izmjenom nakon 2 i 4 sata tretmana.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

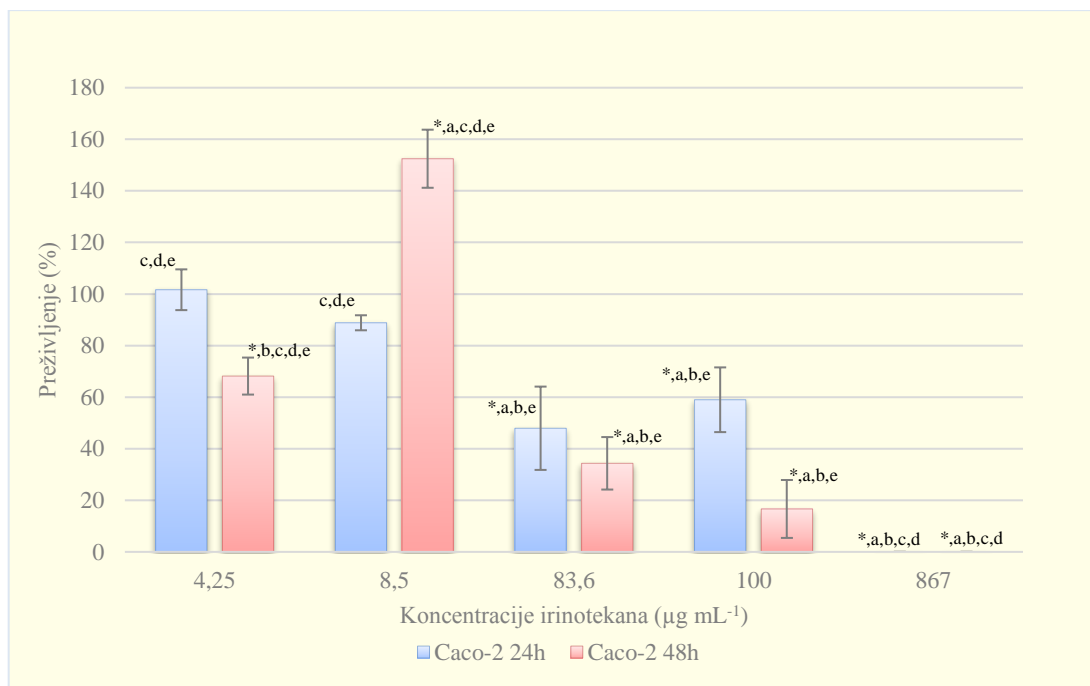
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 17.** Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon 24 i 48 sati tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 17 vidljivo je da nakon 24 sata tretmana Caco-2 stanica bez oporavka, irinotekan uzrokuje smanjenje preživljenja ovisno o koncentraciji. Produljenje vremena inkubacije na 48 sati uzrokuje jači toksični učinak uz napomenu da terapijska koncentracija izaziva proliferaciju stanica te da citotoksični učinak nije ovisan o koncentraciji.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 18.** Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon 24 i 48 sati tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 18 vidljivo je da tretman Caco-2 stanica od 24 sata s oporavkom nije značajno utjecao na promjenu citotoksičnog učinka irinotekana te je trend preživljenja ostao isti kao i pri istim uvjetima tretmana bez oporavka. S druge strane, nakon 48 sati tretmana Caco-2 stanica s oporavkom uočen je nešto jači citotoksični učinak, s tim da je ponovno terapijska koncentracija ( $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) imala proliferativni učinak.

Za razliku od HepG2 stanica, može se zaključiti da niže koncentracije irinotekana ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) imaju toksično djelovanje na Caco-2 stanice nakon kraćeg vremena inkubacije (2 i 4 sata). S produljenjem vremena inkubacije (24 i 48 sati) može se uočiti da koncentracija irinotekana od  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ima proliferativno djelovanje, dok ostale koncentracije irinotekana ovisno o koncentraciji uzrokuju smanjenje preživljenja. U ovom slučaju oporavak od 24 sata nije imao bitnu ulogu.

Ako je neki ispitivani spoj citotoksičan, podrazumijeva se da on uzrokuje određene promjene u stanicama koje utječu na njihovu životnu aktivnost. Razvijeni su brojni testovi za detekciju citotoksičnosti ksenobiotika kojima se može odrediti utjecaj ispitivane tvari na metabolizam i rast stanica nakon izloženosti istomu. Uslijed takve izloženosti, promjene u

metabolizmu i rastu stanica mogu biti ireverzibilne te posljedično rezultirati sniženjem životne aktivnosti stanica (Costa, 2005).

Citotoksični učinak irinotekana na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 određivan je NR testom. NR je tehnički vrlo jednostavna i precizna metoda za određivanje toksičnosti nekog spoja na ispitivane stanice. Ova metoda temelji se na ulasku boje u lizosome živih stanica, dok ista u mrtve stanice ne ulazi. Koncentracije irinotekana korištene u ovom eksperimentu kreću se u rasponu od  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Osnovni mehanizam djelovanja irinotekana zasniva se na njegovom stvaranju kompleksa s TOP1-cc. Kompleks između irinotekana i enzima prolaznog je karaktera i dovodi do pojave jednolančanih lomova i nije smrtonosan za stanicu sve dok ne nastupi „sudar“ s replikacijskom vilicom tijekom procesa udvostručenja DNA. Pri tome nastali dvolančani lomovi izazivaju nepovratna oštećenja replikacijske vilice i dovode do stanične smrti i to uglavnom stanica koje su u S fazi staničnog ciklusa. Za ostale stanice koje nisu u S fazi, irinotekan pri visokim koncentracijama može biti toksičan izazivajući poremećaj transkripcije te apoptozu (Kaufman, 1998; Kingma i Oserhoff, 1998; Xu i Villalone-Calero, 2002). Poznato je da se irinotekan metabolizira u aktivni oblik SN-38 djelovanjem enzima karboksilesteraza koje su prisutne u jetri, plazmi te stanicama crijevnog epitela. Detoksifikacija SN-38 u SN-38G odvija se u jetri procesom glukuronidacije pomoću jetrine uridin difosfat glukuronoziltransferaze i kao takav se izlučuje u žuč i urin. Taj detoksifikacijski put je od kapitalne važnosti u zaštiti organizma od toksičnih produkata nastalih uslijed djelovanja irinotekana (Gupta i sur., 1994). Osim pretvorbe u aktivni oblik, važan za njegov antitumorski učinak, irinotekan se izravno metabolizira pomoću citokroma P450 (CYP) 3A4 i 3A5 u dva metabolita: APC (proizvod dvostruke oksidacije terminalnog piperidinskog prstena) i NPC (posljedica cijepanja distalnog piperadinskog prstena irinotekana) (Santos i sur., 2000). NPC je glavni oksidacijski produkt koji se stvara putem CYP3A4 u istraživanjima u uvjetima *in vitro*.

Poznato je da niske doze antitumorskih lijekova nemaju citostatički učinak na tumorskim stanicama, ali zadržavaju visoku aktivnost kao inhibitori neoangiogeneze. Vjeruje se da metronomski režim niske doze (eng. *metronomic low-dose regimen*, MLDR) nije usmjeren na tumorske stanice, koje su genetički nestabilne i otporne na kemoterapijske fenotipske varijante, već protiv genetički stabilnih i vrlo zdravih, normalnih endotelnih stanica osjetljivih na kemoterapiju potrebnih za rast tumora, stoga su Bocci i suradnici (2002) proveli istraživanje na humanim tumorskim stanicama debelog crijeva (stanične linije COLO 205 i HT-29). Stanice su tretirane sa subtoksičnim dozama irinotekana od 0,1

– 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  30 dana ( $\text{IC}_{50}$  – 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Njihova opažanja pokazala su da se nakon tretiranja stanica irinotekanom broj živih stanica COLO 205 nije statistički značajno promijenio u odnosu na kontrolne stanice unutar prvih 10 dana uzgoja, ali nakon 15 dana uzgoja brzina staničnog rasta počela je opadati. Ovim istraživanjem došli su do zaključka da je produženi tretman COLO 205 stanica s irinotekanom u subtoksičnim dozama rezultiralo citotoksičnim učincima, tj. smanjenjem stanične proliferacije. Zaključak ovog rada možemo povezati sa našim rezultatima nakon 48 sati tretmana Caco-2 stanica gdje je najniža koncentracija (4,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) uzrokovala najveći pad preživljenja (oko 50 %) u odnosu na negativnu kontrolu.

Kontek i suradnici (2010) proveli su istraživanje učinka irinotekana na tumorsku staničnu liniju pluća (A549). Stanice su tretirane irinotekanom u koncentracijama od 7,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  i 60  $\mu\text{M}$  (što odgovara masenim koncentracijama 4,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 9,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 18,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 37,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) u trajanju od 1 sat. Nakon tretmana uočeno je slabo smanjenje preživljenja na 93 % u odnosu na negativnu kontrolu pri koncentraciji irinotekana od 37,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . U drugom istraživanju Kontek i Nowicka (2013) u kojem su s različitim koncentracijama irinotekana (4,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 9,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 18,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 37,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) tretirane tumorske stanične linije pluća (A549) i adenokarcinoma debelog crijeva (HT29) u trajanju od 24 sata nije smanjeno preživljenje stanica ispod 70 %. Kopjar i suradnici (2007) utvrdili su da *in vitro* tretman ljudskih limfocita periferne krvi irinotekanom u koncentracijama 4,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 9,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 2 sata izaziva o dozi ovisan citotoksični učinak, s prevladavajućim udjelom stanica koje ugibaju apoptozom. Najniže preživljenje limfocita (52,2 % živih stanica) uočeno je 120 minuta nakon završetka tretmana. Općenito uzevši, razlike u citotoksičnosti irinotekana uočene na različitim stanicama korištenim u *in vitro* istraživanjima dovode se u vezu sa genetički uvjetovanim značajkama pojedinih tipova stanica, osobito s njihovom sposobnosti za metaboliziranje ispitivanog lijeka. Istraživanja farmakokinetike irinotekana upućuju na različit ishod liječenja i nepredvidivu toksičnost kod nekih pacijenata (Mathijssen i sur., 2002; de Jong i sur., 2004). Dokazano je kako polimorfizmi gena za enzime koji sudjeluju u metabolizmu irinotekana mogu utjecati na povećanu toksičnost tog lijeka u nekih bolesnika. Nadalje, na njegovu toksičnost utječu i razlike u mehanizmima transporta (irinotekan se ne transportira u svim organizmima jednako). Sve to govori u prilog potrebe za individualnim pristupom terapiji (Evans i McLeod, 2003).

Nadalje, Keyvani-Ghamsari i suradnici (2017) proveli su istraživanje na tumorskoj staničnoj liniji adenokarcinoma dojke (MCF-7) koju su tretirali sa irinotekanom u

koncentracijskom rasponu od 0 – 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tijekom 24 i 48 sati. Preživljenje MCF-7 stanica nakon 24 sata tretmana s koncentracijom irinotekana od 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se smanjilo na 85,5 % usporedno sa negativnom kontrolom (100 %), dok nakon istih uvjeta tretmana s koncentracijom irinotekana od 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preživljenje se smanjilo na 58 %. Nakon produljenog tretmana (48 sati) s irinotekanom koncentracije 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preživljenje istih stanica iznosilo je 33% u usporedbi s negativnom kontrolom. Iz ovih rezultata je vidljivo da irinotekan ima toksični učinak pri visokim koncentracijama na MCF-7 stanice. Iz naših rezultata je vidljivo da se nakon 24 sata tretmana HepG2 stanične linije s koncentracijom irinotekana od 8,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preživljenje smanjilo na aproksimativno 90 % što nije statistički značajno u odnosu na kontrolu, međutim nakon tretmana s koncentracijom irinotekana od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nije uočen veliki pad preživljenja, no ipak je statistički značajan u odnosu na kontrolu. Nakon 48 sati tretmana pri istim uvjetima dolazi do statistički značajnog smanjenja preživljenja duž cijelog koncentracijskog raspona irinotekana, ali smanjenje preživljenja nije ovisno o koncentraciji. Nasuprot tomu, nakon 24 sata tretmana Caco-2 stanica pri istim uvjetima vidljivo je statistički značajno smanjenje preživljenja ovisno o koncentraciji te je pri koncentraciji irinotekana od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  najveće, dok nakon 48 sati tretmana citotoksični učinak nije ovisan o koncentraciji. Iz ovih podataka možemo zaključiti da irinotekan ima različiti učinak na različite tumorske stanične linije. Također, bitno je naglasiti da aktivni metabolit irinotekana, SN-38, ima više od 1000 puta jaču antitumorsku aktivnost od irinotekana (Iyer i sur., 1998). HepG2 i Caco-2 stanice smo tretirali irinotekanom te nemamo podatak o postotku nastajanja SN-38. Pošto se irinotekan metabolizira u jetri pretpostavka je da tijekom tretiranja HepG2 stanica dolazi do nastanka SN-38 u nekom postotku. Pošto nije uočen veliki pad preživljenja stanica te je poznato da se u jetri odvija i konjugacija SN-38 u inaktivni metabolit SN-38G, postoji mogućnost da dolazi do konjugacije SN-38 i time je spriječen citotoksični učinak na stanice. S druge strane, Caco-2 stanice su ciljno mjesto djelovanja SN-38, te s podatkom da se irinotekan metabolizira u jetri može se pretpostaviti da dobiveni rezultati nakon tretmana Caco-2 stanica s irinotekanom predstavljaju učinak irinotekana, a ne SN-38. Štoviše, uočeno je da s produljenjem vremena inkubacije (24 i 48 sati) koncentracija irinotekana od 8,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ima proliferativno djelovanje što ukazuje na vjerojatnost da stanice imaju mehanizam izbacivanja ksenobiotika, kao npr. staničnu membranu bogatu P-gp proteinima. P-gp efluks pumpa, koja se nalazi na membrani crijevnih enterocita, i CYP3A4 enzim ograničavaju intestinalnu apsorpciju nekih lijekova. Važno je napomenuti da CPT-11 u formi karboksilata može biti supstrat P-gp i cMOAT, dok se SN-38



karboksilat može „izbaciti“ sa MOR-1 i cMOAT. Stoga, prekomjerna ekspresija takvih pumpi u crijevnim stanicama može modulirati opseg oralne CPT-11 ili SN-38 apsorpcije. Dokazano je da su P-gp i cMOAT eksprimirani i na membrani Caco-2 stanica kao i *in vivo* (Sparreboom i sur., 1997; Sugiyama i sur., 1998; Hirohashi i sur., 2000). Isto tako, često sposobnost kemoterapeutika da potakne apoptozu u tumorskim stanicama ovisi o sposobnosti tumorskih stanica da proizvede reaktivne kisikove spojeve (ROS) (Kang i sur., 2004). Slaba razina ROS-a je povezana s ekspresijom ABC transportera, odnosno P-gp proteinom. Tumori otporni na lijekove imaju nisku razinu ROS-a i visoku razinu glutationa (GSH) te povećanu aktivnost antioksidacijskih enzima (Maeda i sur., 2004; Morales i sur., 2005).

Dosadašnja su istraživanja pokazala kako je učinkovitost, a time i toksičnost irinotekana uvelike ovisna o putevima njegova unosa u organizam, pri čemu se oralni put unosa pokazao najslabije učinkovit. Štoviše, podatci dostupni o apsorpciji i distribuciji irinotekana nakon oralne primjene pokazali su obeshrabrujuće rezultate, zbog čega se u novije vrijeme razvijaju nove formulacije irinotekana koji pokazuje bolju oralnu apsorpciju i bioraspoloživost (liposomi, micelarne otopine, nanočestice i sl.) (Lucić Vrdoljak i sur. 2018). Iako je ovo istraživanje provedeno na staničnim linijama, slabo citotoksično djelovanje irinotekana može se dovesti u vezu s pretpostavkom da Caco-2 stanice imaju membrane bogate P-gp proteinima. Tome u prilog govore rezultati istraživanja provedenih u uvjetima *in vivo* s inhibitorima P-gp. Tipičan predstavnik takvih spojeva je verapamil, koji se dovodi u vezu sa sprječavanjem otpornosti na više lijekova (Mathijssen i sur., 2001). Garg i suradnici (2015) proučavali su bioraspoloživost i farmakokinetičke parametre irinotekana na štakorima nakon oralne primjene lijeka samostalno i u kombinaciji sa verapamilom (25 mg kg<sup>-1</sup>, oralno) koji je apliciran 2 sata prije primjene irinotekana. Dokazali su kako verapamil uzrokuje značajne promjene u farmakokinetici i veću bioraspoloživost oralno primijenjenog irinotekana.

Međutim, u tumačenju rezultata uvijek valja uzeti u obzir razlike između testnih sustava *in vitro* i složenih procesa koji se odvijaju u živim organizmima. Antitumorski mehanizmi djelovanja irinotekana u uvjetima *in vitro* razlikuju se od uvjeta u živom organizmu. Konačni učinak ovisi o čimbenicima kao što su: propusnost stanične membrane, količina stvorenih radikala, vrijeme trajanja inkubacije i dr. (Melliou i Chinou, 2004).

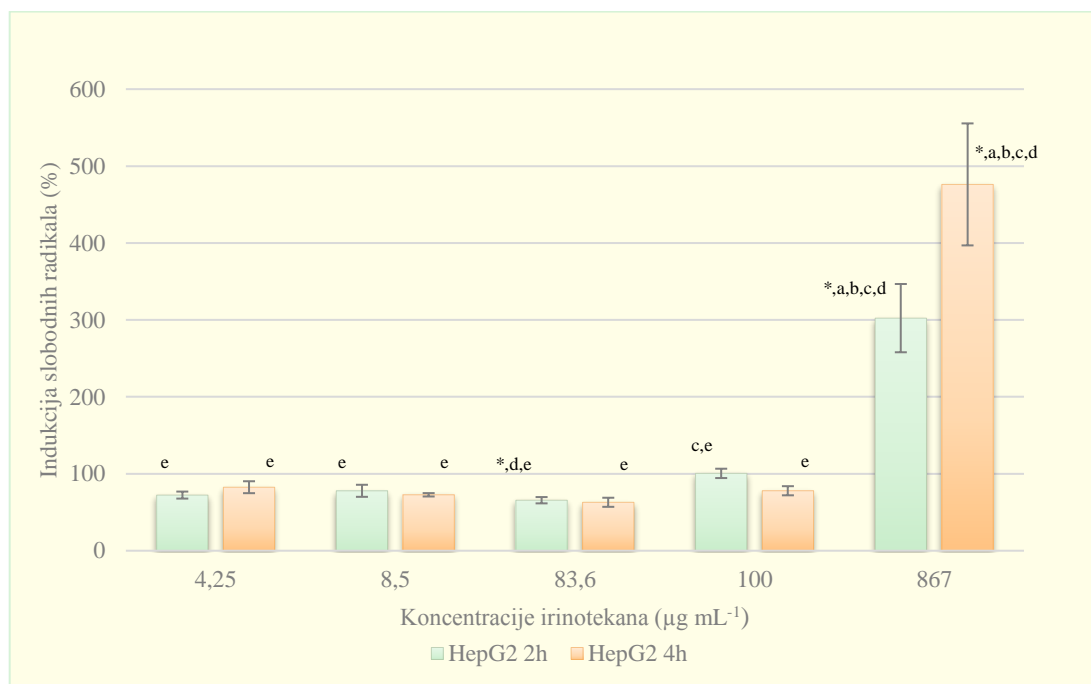
## 4.2. ODREĐIVANJE PROOKSIDATIVNOG UČINKA IRINOTEKANA

Ispitivanje prooksidativnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) provedeno je DCFH-DA testom, opisanom u poglavlju 3.2.4., na staničnim linijama HepG2 i Caco-2. Prooksidativni učinak otopina irinotekana praćen je u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati, s i bez oporavka, nakon čega je određeno preživljenje i izračunata indukcija slobodnih radikala pojedine koncentracije u odnosu na netretirane stanice (negativnu kontrolu).

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost intenziteta fluorescencije (izračunate kao umnožak fluorescencije DCF i kvocijenta preživljenja stanica dobivenog provođenjem NR testa) o koncentracijama irinotekana.

## HepG2

Na Slikama 19, 20, 21 i 22 prikazani su rezultati prooksidativnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija na staničnu liniju HepG2 nakon 2 i 4 sata inkubacije bez oporavka i s oporavkom te nakon 24 i 48 sati inkubacije bez oporavka i s oporavkom (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama).



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

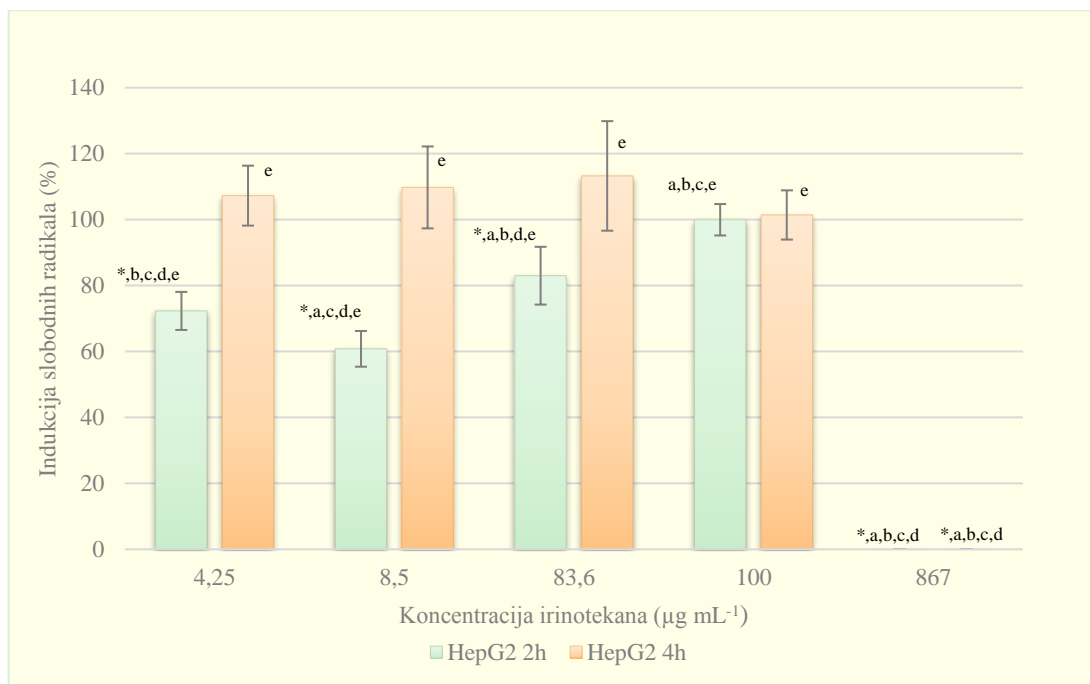
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 19.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon 2 i 4 sata tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Na grafičkom prikazu Slike 19 nije uočena indukcija slobodnih radikala kod HepG2 stanica tretiranih različitim koncentracijama irinotekana tijekom 2 i 4 sata bez oporavka, osim pri najvećoj koncentraciji  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  koja je toksična.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

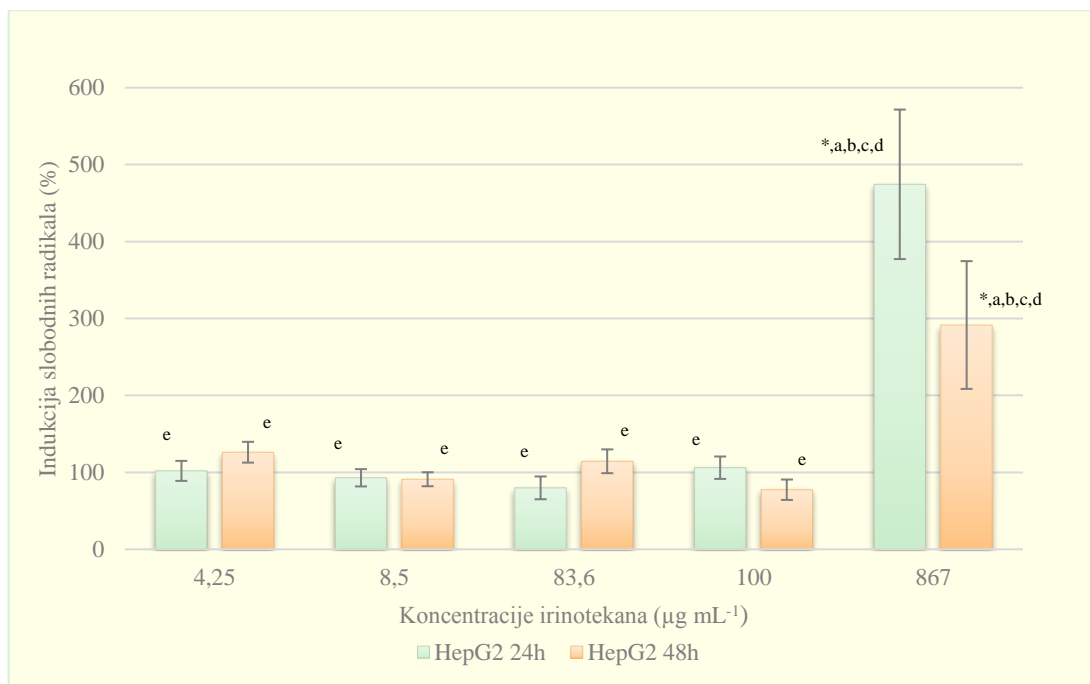
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 20.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon 2 i 4 sata tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 20 vidljivo je da je tijekom 2 sata tretmana HepG2 stanica s oporavkom s povećanjem koncentracije irinotekana došlo do indukcije antioksidacijskih sustava, dok tijekom 4 sata tretmana s oporavkom ne dolazi do nastanka slobodnih radikala. Pri najvećoj koncentraciji  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  nije moguće mjerenje jer nije bilo živih stanica.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

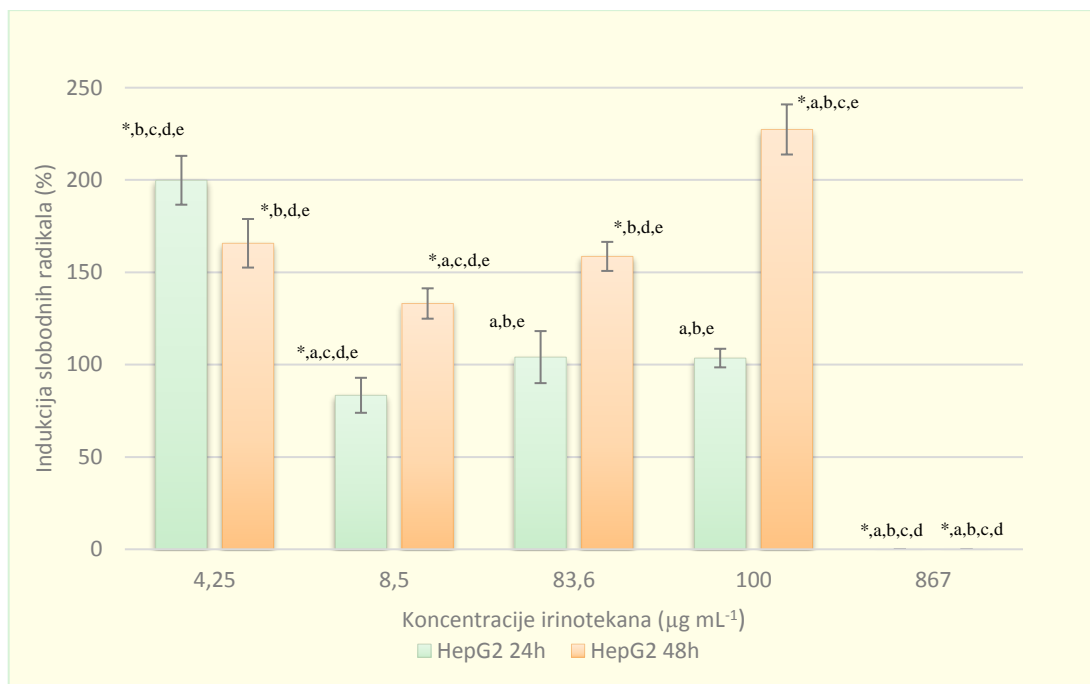
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 21.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon 24 i 48 sati tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 21 vidljivo je da je tijekom 24 i 48 sata tretmana HepG2 stanica bez oporavka pri svim koncentracijama došlo do indukcije antioksidacijskih sustava osim pri najvećoj koncentraciji  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  koja je toksična.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

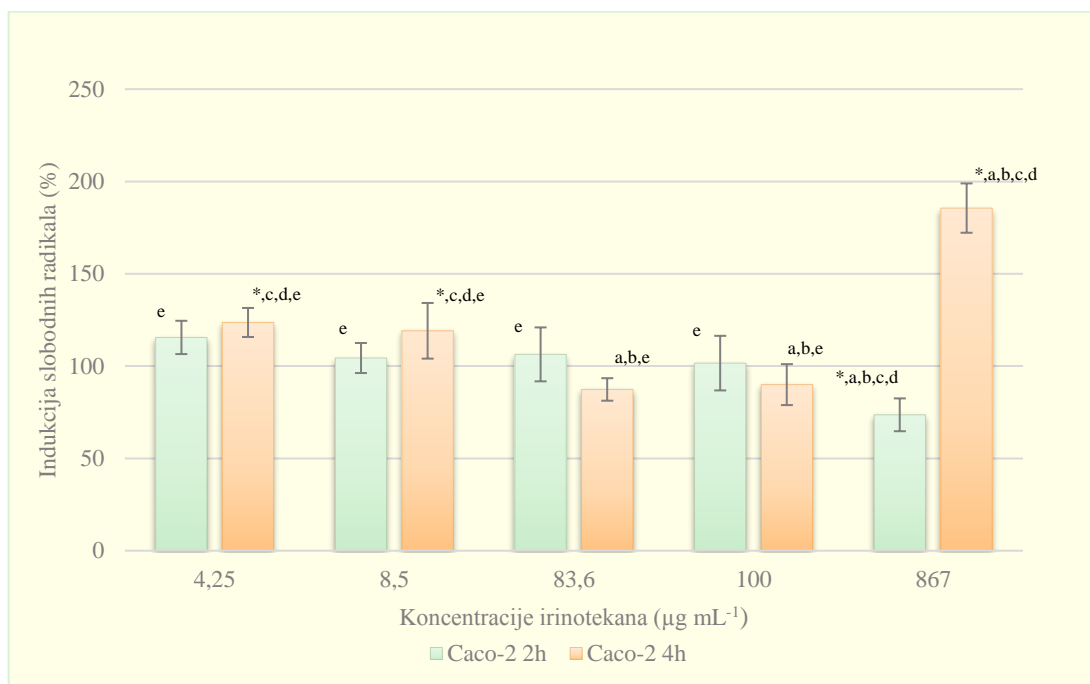
e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 22.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon 24 i 48 sati tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 22 vidljivo je da nakon 24 sata tretmana HepG2 stanica s oporavkom najniža koncentracija ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pokazuje prooksidativno djelovanje, dok su nakon 48 sati tretmana istih stanica s oporavkom sve ispitivane koncentracije irinotekana pokazale prooksidativno djelovanje. Može se zaključiti da su slobodni radikali nastali tijekom oporavka. Pri najvećoj koncentraciji  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  nije bilo moguće provesti mjerenje zbog visoke smrtnosti stanica.

## Caco-2

Na Slikama 23, 24, 25 i 26 prikazani su rezultati prooksidativnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija na staničnu liniju Caco-2 nakon 2 i 4 sata inkubacije bez oporavka i s oporavkom te nakon 24 i 48 sati inkubacije bez oporavka i s oporavkom (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama).



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

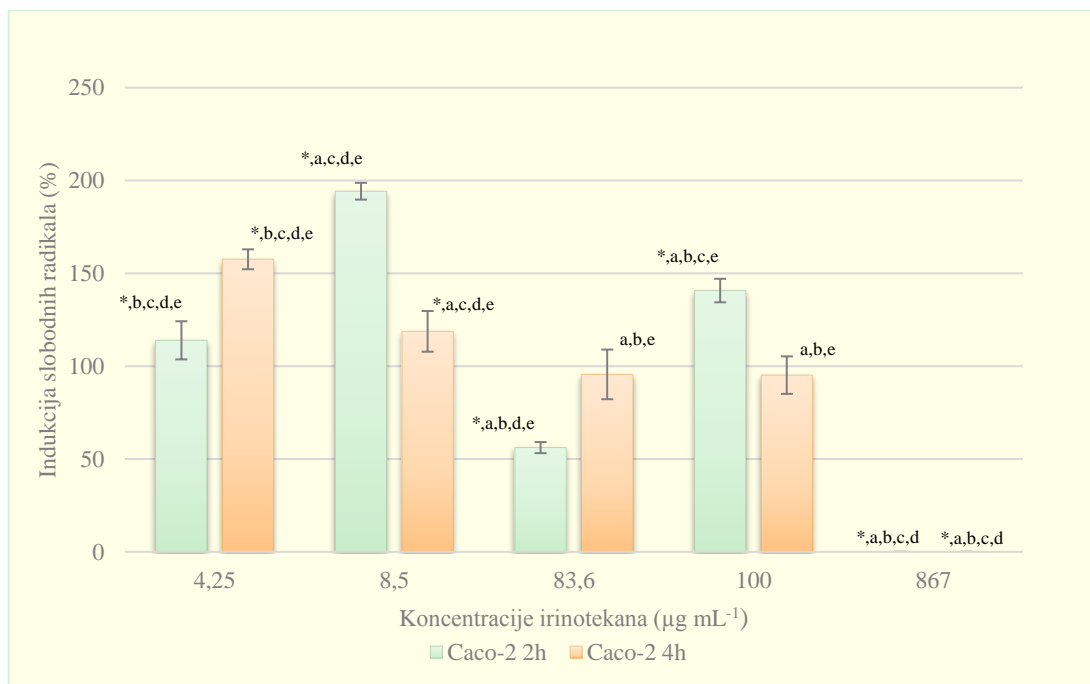
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 23.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 23 vidljivo je da nakon 2 sata tretmana Caco-2 stanica bez oporavka nema indukcije slobodnih radikala, dok nakon 4 sata tretmana Caco-2 stanica bez oporavka niže koncentracije imaju prooksidativno djelovanje.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

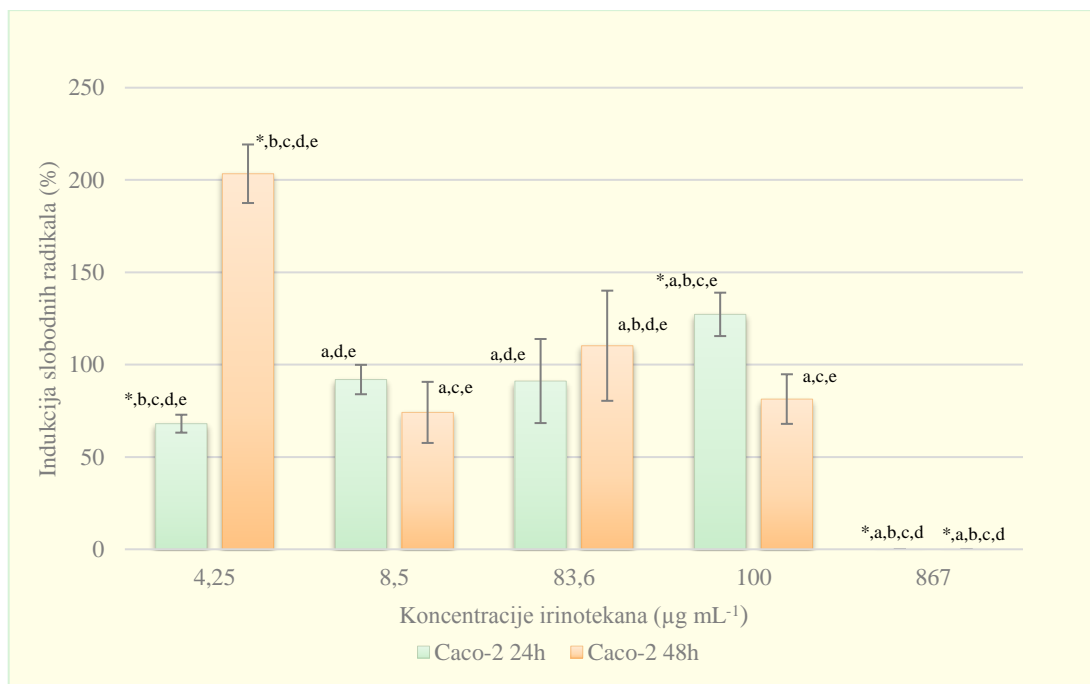
d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 24.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 24 vidljivo je da nakon 2 sata tretmana Caco-2 stanica s oporavkom niže koncentracije irinotekana imaju prooksidativno djelovanje dok s povećanjem koncentracija irinotekana ne dolazi do prooksidativnog djelovanja. Sličan trend može se uočiti na Caco-2 stanicama i nakon 4 sata tretmana s oporavkom.





\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

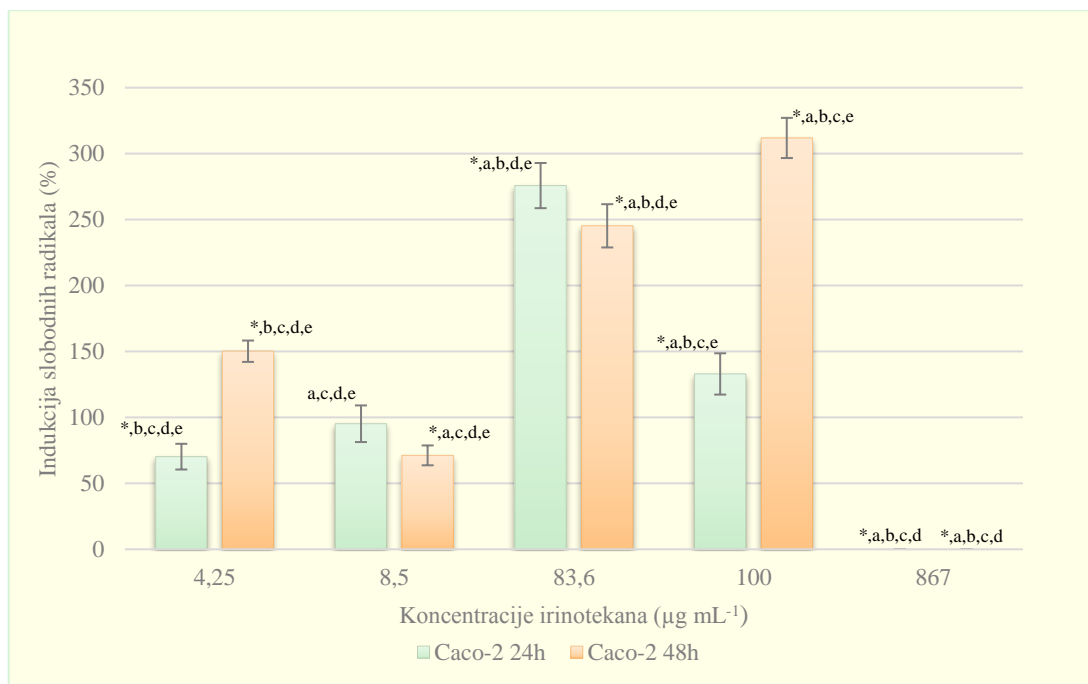
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 25.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon 24 i 48 sati tretmana bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 25 vidljivo je da nakon 24 sata tretmana Caco-2 stanica bez oporavka dolazi do indukcije slobodnih radikala ovisne o koncentraciji, dok je nakon 48 sati tretmana bez oporavka jedino najniža koncentracija ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) imala prooksidativno djelovanje.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 26.** Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon 24 i 48 sati tretmana s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 26 vidljivo je da nakon 24 sata tretmana Caco-2 stanica s oporavkom niže koncentracije imaju antioksidacijsko djelovanje, a kako se povećavaju koncentracije raste i prooksidativno djelovanje irinotekana. Nakon 48 sati tretmana s oporavkom može se uočiti da sve koncentracije imaju prooksidativno djelovanje, osim terapijske ( $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) koja značajno smanjuje razinu slobodnih radikala.

Što se tiče indukcije slobodnih radikala važno je spomenuti da terapijska koncentracija ( $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nakon produljenog vremena inkubacije s irinotekanom izaziva značajni pad slobodnih radikala što je u direktnoj vezi s povećanjem preživljenja stanica prikazanom u poglavlju 4.1.

Prooksidativno djelovanje imaju tvari koje olakšavaju ili ubrzavaju procese oksidacije u stanici. Neki od njih su reaktivni kisikovi spojevi (ROS) koji igraju važnu ulogu u procesu karcinogeneze jer djeluju kao mutageni i karcinogeni. Tumorske stanice pokazuju povišene razine ROS-a čime je narušena ravnoteža redoks reakcija. Molekule koje su prooksidansi također mogu djelovati kao selektivna citotoksična sredstva koja,

primjerice, djeluju protiv tumorskih stanica kada postignu toksične razine ROS-a (León-González i sur., 2015).

Određivanje slobodnih radikala nastalih bazalnim metabolizmom ili metabolizmom ispitivanih tvari kojima su stanice izložene, izvršeno je putem 2',7'-diklorofluoresceindiacetat fluorimetrijskim testom (DCFH-DA fluorimetrijski test). Test se temelji na činjenici da DCFH, koji inače ne fluorescira, u prisutnosti slobodnih radikala (time i ROS-a) podliježe oksidaciji u DCF koji je izrazito fluorescentan i čija se fluorescencija mjeri u fluorimetru pri valnim duljinama od  $485 \pm 10$  nm za ekscitaciju i  $530 \pm 12,5$  nm za emisiju (Wang i Joseph, 1999). Izmjerena je fluorescencija i izračunat postotak prooksidativnog djelovanja u odnosu na kontrolu. Poznato je da irinotekan uzrokuje apoptozu, mitohondrijsku disfunkciju i stvaranje slobodnih radikala u normalnim stanicama, kao i tumorskim stanicama (Monchusi i Ntwasa, 2017).

Prijašnja istraživanja dokazala su da na staničnoj razini, izlaganje stanice oksidacijskom stresu može rezultirati metaboličkom disfunkcijom, uključujući lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina, disrupciju membrane i oštećenja na molekuli DNA (Aisling Aherne i sur., 2007). Poznato je da tumorske stanice imaju slične metaboličke karakteristike, u slučaju potrošnje kisika i oksidacijskog metabolizma, poput normalnih stanica, no činjenica da su tumorska tkiva podložnija oksidacijskom stresu nego što su okolne normalne stanice očituje se u povećanju lipidne peroksidacije i oštećenjima na DNA te smanjenju aktivnosti antioksidacijskih enzima. Postoji hipoteza da u nedostatku stanične antioksidacijske obrane, ROS izazivaju oksidaciju ključnih molekula otpuštajući proteaze, lipaze i nukleaze iz mitohondrija (Huang i sur., 2005). Kako bi se obranile od djelovanja  $H_2O_2$ , stanice sadrže razne peroksidaze; uključujući katalaze, glutation peroksidaze i peroksiredoksine koji kontroliraju osnovne i stabilne razine  $H_2O_2$  u stanici i štite je od oštećenja koja mogu uzrokovati ROS (Nonn i sur., 2003).

Shokrzadeh i Ghassemi-Barghi (2018) istraživali su ulogu oksidacijskog stresa na genotoksičnost uzrokovanu irinotekanom. Pomoću DCFH-DA testa ispitivali su stvaranje ROS-a u HepG2 stanicama kao odgovor na tretman s irinotekanom. Inkubacija s irinotekanom koncentracije  $100 \mu\text{M}$  (što odgovara masenoj koncentraciji  $67,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u trajanju od 1 sat je rezultirala sa znatnim povećanjem fluorescencije što upućuje na to da irinotekan inducira unutarstanični oksidacijski stres koji je uključen u njegovu genotoksičnost. U našem slučaju, indukcija slobodnih radikala u HepG2 stanicama uočena je nakon 4 i 24 sata tretmana s oporavkom gdje najniža koncentracija  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  pokazuje prooksidativno djelovanje, te nakon 48 sati tretmana s oporavkom gdje su sve

ispitivane koncentracije irinotekana pokazale prooksidativno djelovanje. Može se zaključiti da su u našem istraživanju slobodni radikali nastali u periodu oporavka.

Akumulacija ROS-a može rezultirati oksidacijskim stresom i igrati ključnu ulogu u kontroli ponašanja tumorskih stanica. Dok tumorske stanice potencijalno mogu imati koristi od oksidacijskog stresa zbog povećane brzine mutacija, također imaju višu bazalnu razinu oksidacijskog stresa usporedno sa ne-malignim stanicama što ih čini osjetljivima na akutnu indukciju oksidacijskog stresa. Visoke razine ROS-a mogu izazvati niz proapoptičkih signalnih putova, uključujući stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres) i mitohondrijsku disfunkciju, što u konačnici dovodi do oštećenja stanične funkcije i nekroze ili apoptoze (Cairns i sur., 2011; Circu i Aw, 2010). Međutim, nedavni radovi sugeriraju da ROS može utjecati, osim na ekspresiju gena i staničnu smrt, i na staničnu proliferaciju (Hancock i sur., 2001). Naši rezultati upućuju na vrlo zanimljivu činjenicu. Naime, nakon 2, 4, 24 i 48 sati tretmana HepG2 stanica s irinotekanom nema statistički značajne indukcije slobodnih radikala duž cijelog koncentracijskog raspona, osim pri najvišoj koncentraciji ( $867 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sve vrijednosti se kreću oko 100 %. Kada te rezultate usporedimo sa rezultatima postotka preživljenja stanica možemo uočiti da pri istim uvjetima tretmana iste stanične linije, pri koncentracijama gdje nema statistički značajne indukcije slobodnih radikala, dolazi do proliferacije stanica. Nasuprot tome, nakon 24 sata tretmana HepG2 stanica s oporavkom sve ispitivane koncentracije pokazuju statistički značajnu indukciju slobodnih radikala što se odražava na rezultate postotka preživljenja HepG2 stanica pri istim uvjetima tretmana gdje možemo primjetiti statistički značajno smanjenje preživljenja. Isti trend se pojavljuje i na tretiranim Caco-2 stanicama. To najbolje možemo vidjeti nakon 24 sata tretmana Caco-2 stanica gdje dolazi do indukcije slobodnih radikala ovisno o koncentraciji (s povećanjem koncentracija irinotekana dolazi do porasta indukcije slobodnih radikala), dok pri istim uvjetima tretmana iste stanične linije dolazi do smanjenja postotka preživljenja ovisno o koncentraciji.

Nedavna studija pokazala je da tretiranje humane stanične linije A253 karcinoma glave i vrata s SN-38, dovelo do dvofaznih dvolančanih lomova DNA i aktivacije tri proteinska kompleksa za njihov popravak, DNA-PK, Mre11-Rad50-Nbs1 i BRCA1 (Wu i sur., 2002). Iako je nedavno objavljeno da ROS utječe na popravak dvolančanih lomova DNA u tumorima koji su rezistentni na lijekove zbog izmjenjanje aktivnosti DNA-PK (Boldogh i sur., 2003), precizni odnos između ROS i DNA-PK još nije potpuno razjašnjen stoga detaljnije razumijevanje molekularnih mehanizama ROS-a u stanicama tumora mogu potaknuti nove antitumorske strategije.

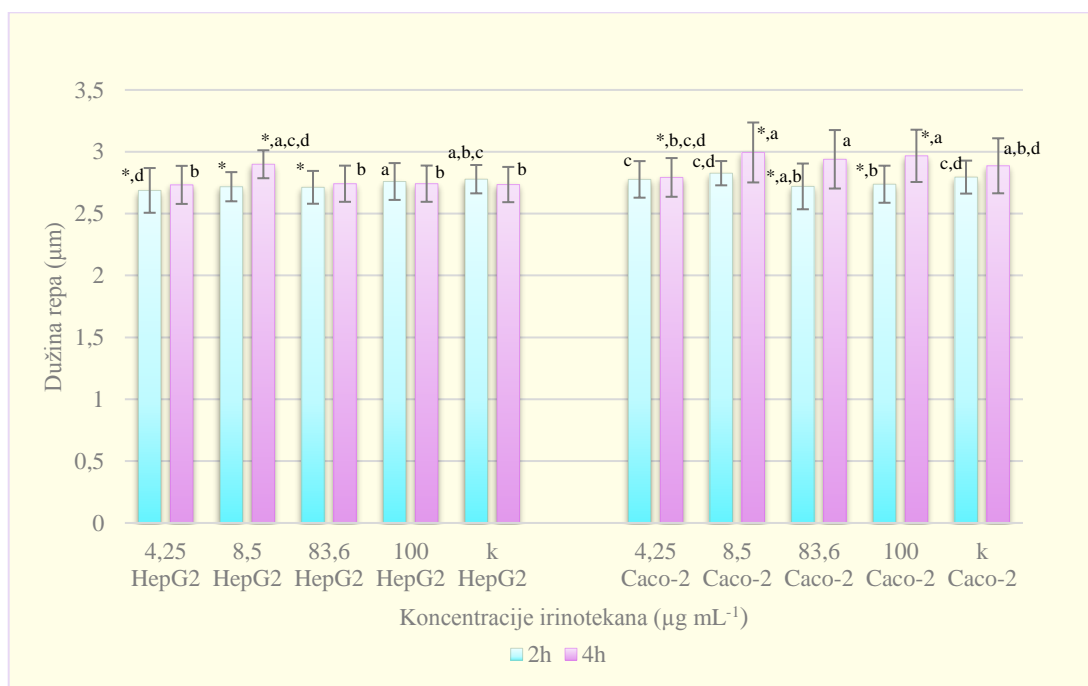
### 4.3. ODREĐIVANJE OŠTEĆENJA DNA IZAZVANIH IRINOTEKANOM

Ispitivanje genotoksičnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija ( $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati provedeno je komet testom, opisanom u poglavlju 3.2.5., na staničnim linijama HepG2 i Caco-2. Razina primarnih oštećenja DNA mjerena je pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II*, pri čemu su kao parametri za procjenu oštećenja korišteni: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment kometa.

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta o koncentracijama irinotekana.

## HepG2 i Caco-2, vrijeme tretmana 2 i 4 sata

Na Slikama 27, 28 i 29 prikazani su rezultati genotoksičnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 nakon 2 i 4 sati inkubacije (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama).



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na 4,25 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na 8,5 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

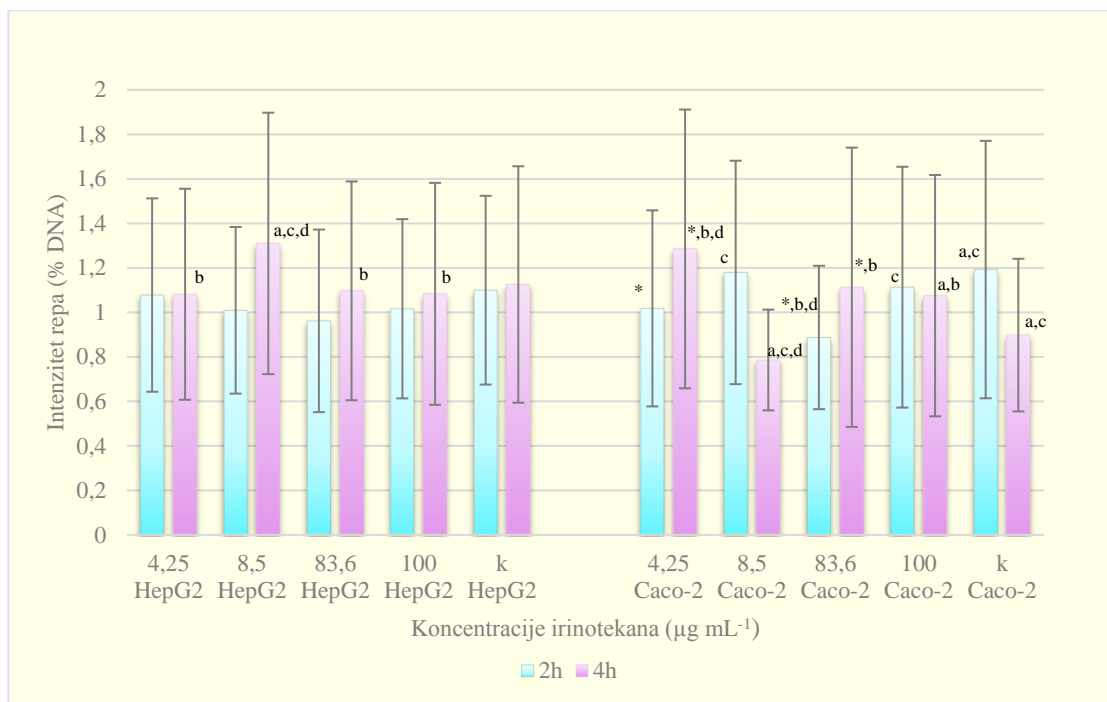
c - statistički značajna razlika u odnosu na 83,6 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na 867 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

**Slika 27.** Dužina repa kometa staničnih linija HepG2 i Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 27 vidljivo je da je nakon 2 sata tretmana HepG2 stanica terapijska koncentracija irinotekana (8,5 µg mL<sup>-1</sup>) izazvala povećanje dužine repa u odnosu na kontrolu, dok taj učinak kod 2 sata tretmana Caco-2 stanica nije uočen. Međutim, produljenim tretmanom od 4 sata dolazi do oštećenja genetičkog materijala pri terapijskoj koncentraciji od 8,5 µg mL<sup>-1</sup> i na Caco-2 stanicama.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na 4,25 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na 8,5 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

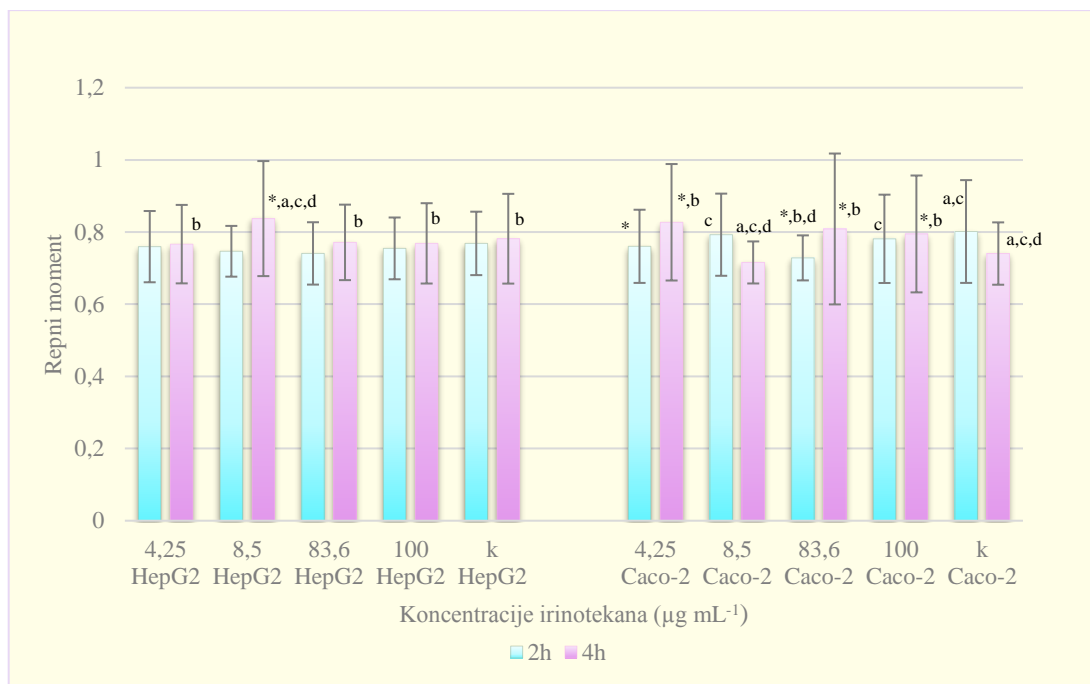
c - statistički značajna razlika u odnosu na 83,6 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na 867 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

**Slika 28.** Intenzitet repa kometa staničnih linija HepG2 i Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 28 vidljivo je da se tijekom 2 i 4 sata tretmana HepG2 stanica % DNA ne mijenja u cijelom koncentracijskom rasponu. U slučaju Caco-2 stanica vidljivo je da tijekom 4 sata tretmana dolazi do povećanja % DNA pri koncentraciji irinotekana od 4,25 µg mL<sup>-1</sup>, dok terapijska doza (8,5 µg mL<sup>-1</sup>) ne utječe na promjenu intenziteta repa.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

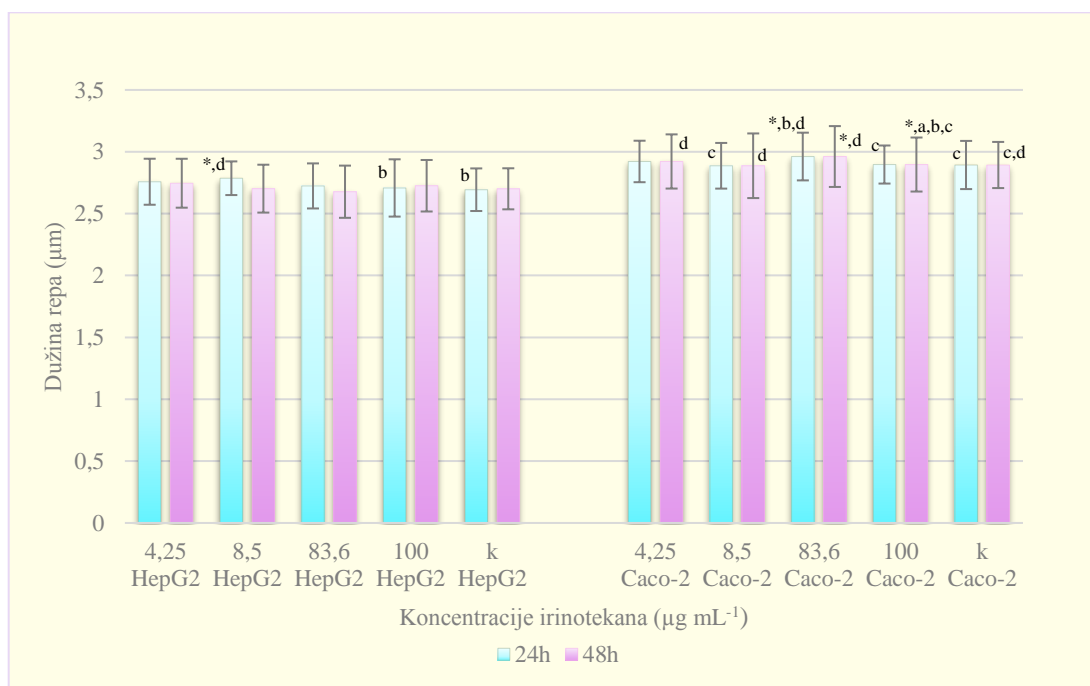
**Slika 29.** Repni moment kometa staničnih linija HepG2 i Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana različitim koncentracijama irinotekana

Uzimajući u obzir % DNA i dužinu repa, iz grafičkog prikaza Slike 29 vidljivo je da terapijska koncentracija ( $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) izaziva oštećenje genetičkog materijala HepG2 stanica nakon 4 sata tretmana. Nasuprot tome, terapijska koncentracija irinotekana ( $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) kod Caco-2 stanica ne izaziva značajno oštećenje genetičkog materijala.



### HepG2 i Caco-2, vrijeme tretmana 24 i 48 sati

Na Slikama 30, 31 i 32 prikazani su rezultati genotoksičnog učinka otopina irinotekana različitih koncentracija na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 nakon 24 i 48 sata inkubacije (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama).



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na 4,25 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na 8,5 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

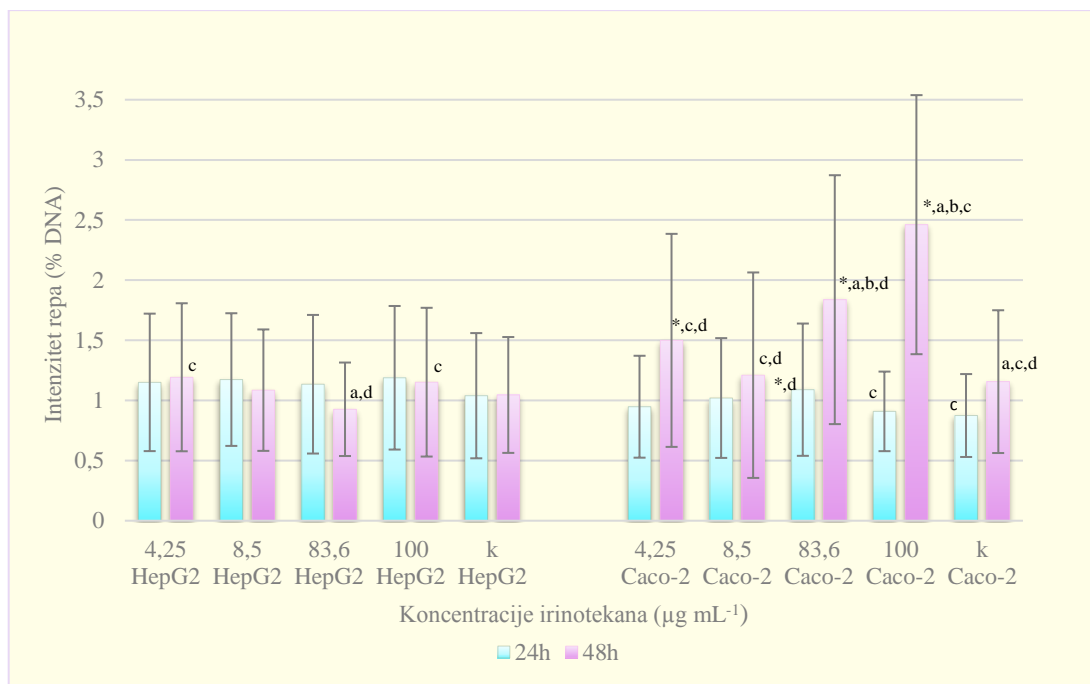
c - statistički značajna razlika u odnosu na 83,6 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na 867 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

**Slika 30.** Dužina repa kometa staničnih linija HepG2 i Caco-2 nakon 24 i 48 sati tretmana različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 30 vidljivo je da produljeni tretman od 24 i 48 sati HepG2 stanica ne izaziva značajnu promjenu dužine repa, dok kod Caco-2 stanica nakon tretmana pod istim uvjetima statistički značajnu promjenu izazivaju koncentracije irinotekana veće od terapijske (83,6 µg mL<sup>-1</sup> i 100 µg mL<sup>-1</sup>).



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

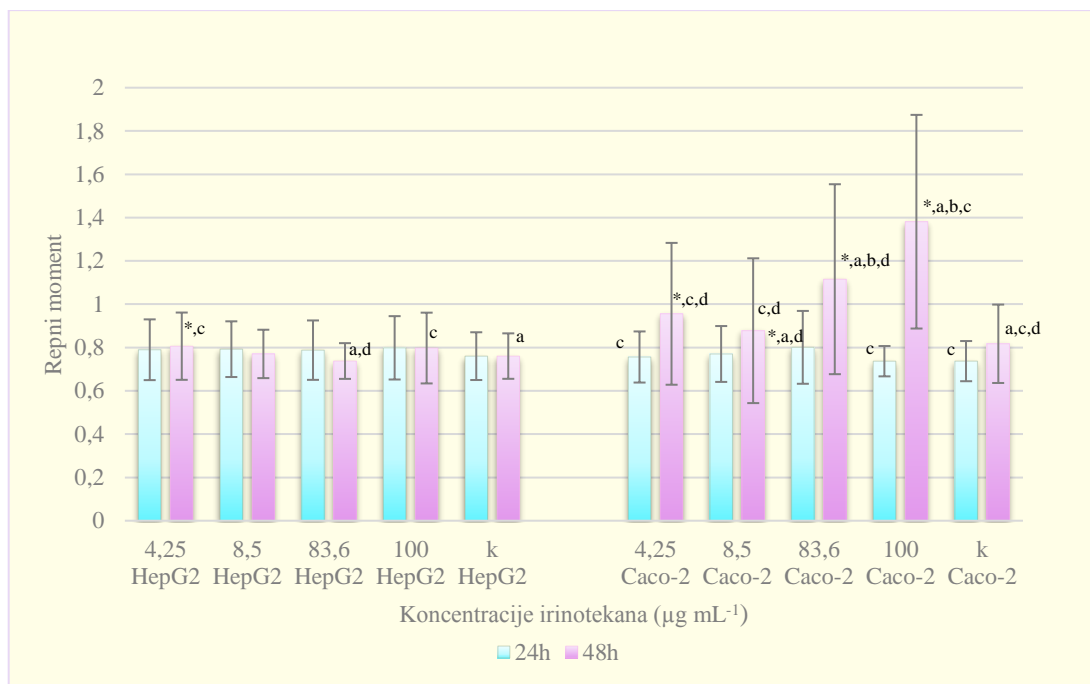
c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 31.** Intenzitet repa kometa staničnih linija HepG2 i Caco-2 nakon tretmana 24 i 48 sati različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 31 vidljivo je da promjena intenziteta repa HepG2 stanica nije statistički značajna nakon 24 i 48 sati tretmana, dok kod Caco-2 stanica se može uočiti ovisnost o koncentraciji nakon tretmana od 48 sati.



\* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ )

a - statistički značajna razlika u odnosu na  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

b - statistički značajna razlika u odnosu na  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

c - statistički značajna razlika u odnosu na  $83,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

d - statistički značajna razlika u odnosu na  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

e - statistički značajna razlika u odnosu na  $867 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0,05$ )

**Slika 32.** Repni moment kometa staničnih linija HepG2 i Caco-2 nakon tretmana 24 i 48 sati različitim koncentracijama irinotekana

Iz grafičkog prikaza Slike 32 vidljivo je da nakon 24 i 48 sati tretmana HepG2 stanica ne dolazi do značajne promjene repnog momenta, dok je nakon 48 sati tretmana Caco-2 stanica uočeno oštećenje genetičkog materijala ovisno o koncentraciji.

Iz priloženih rezultata može se zaključiti da tijekom 2 i 4 sata izlaganja stanica irinotekanu, bilo da se radi o HepG2 ili Caco-2 stanicama, ne dolazi do oštećenja genetičkog materijala, dok je učinak ovisan o koncentraciji uočen u Caco-2 stanicama nakon 48 sati tretmana.

Mutagenost neke kemikalije podrazumijeva da ona ima svojstvo izazvati mutacije u stanicama koje se mogu prenijeti na potomstvo. Mutacija je trajna promjena u količini ili strukturi genetičkog materijala u stanici, a pojam mutagen odnosi se na fizički ili kemijski agens koji povećava pojavu mutacija u stanicama iznad prirodne razine, tj. pored normalnih, spontanih mutacija koje se javljaju u stanicama, uzrokuje i inducirane mutacije. Genotoksičnost nekog spoja odnosi se na njegovu sposobnost da mijenja strukturu, sadržaj informacija ili segregaciju DNA, uključujući ona sredstva koja uzrokuju oštećenje DNA

ometanjem normalnih procesa replikacije ili koji ih na nefiziološki način privremeno mijenjaju (Dusinska i Collins, 2008).

Poznato je da je oksidacijski stres posljedica izlaganja citotoksičnim lijekovima. Povećana razina ROS-a i njihovi direktni i / ili indirektni učinci, mijenjaju DNA (Hussain i sur., 2000). Rastući dokazi govore u prilog činjenici da su tumorske stanice izložene povećanom intrinzičnom stresu uzrokovanom reaktivnim kisikovim spojevima. Povećana akumulacija ROS-a u stanicama raka služi poput endogenog izvora agenasa koji oštećuju DNA i promoviraju genetičku nestabilnost i razvoj otpornosti na lijekove. Endogeni ROS zajedno s egzogenim agensima koji oštećuju DNA (kemoterapeutske agensi te ionizirajuće zračenje) mogu uzrokovati mutacije u mitohondrijskoj DNA. Ove mutacije uzrokuju malfunkciju mitohondrijskog respiratornog lanca što će posljedično još u većoj mjeri povećati nastanak ROS-a, a u konačnici mijenjati stanični apoptotički odgovor prema antitumorskim agensima (Pelicano i sur., 2004).

U našem slučaju, primarna oštećenja DNA u stanicama nastaju kao posljedica učinka irinotekana i oksidacijskog stresa prouzročenog izlaganjem stanica djelovanju irinotekana. Kao posljedica oksidacijskog stresa, u staničnoj DNA nastaje velik broj dodatnih oštećenja što se može otkriti osjetljivom metodom kao što je komet test. Komet test u alkalnim uvjetima je pogodna metoda dovoljno osjetljiva za procjenu različitih tipova oštećenja DNA u tumorskim stanicama jetre i debelog crijeva izazvanih s irinotekanom. Postotak DNA u repu je najprikladniji parametar za analizu oštećenja DNA jer su varijacije tijekom elektroforeze i između eksperimenata manje izražene nego kod dužine repa (De Boeck i sur., 2000).

Rezultati komet testa na Caco-2 stanicama potvrđuju genotoksičnost irinotekana te nakon obrade dobivenih podataka vidljivo je da irinotekan povećava % DNA u repu u odnosu na negativnu kontrolu tijekom tretmana u vremenu od 4 i 48 sati što možemo povezati sa rezultatima dobivenim DCFH-DA testom koji pokazuju nastajanje slobodnih radikala tijekom tretmana u vremenu od 4 i 48 sati.

% DNA u repu na stanicama HepG2 nakon tretmana s irinotekanom u odnosu na kontrolu nije statistički značajan što ukazuje na preživljenje otpornih stanica vjerojatno bogatih antioksidacijskim molekulama.

Kašuba i suradnici (2010) proveli su istraživanje na staničnoj liniji V79 (plućni fibroblasti kineskog hrčka) koju su tretirali irinotekanom u koncentracijama od  $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $9 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $18 \mu\text{g mL}^{-1}$  tijekom 2 i 24 sata. Rezultati komet testa (dužine repa i repnog momenta) nakon 2 sata tretmana nisu pokazali statistički značajne razlike između tretiranih

stanica i negativne kontrole, što upućuje da u ispitanim eksperimentalnim uvjetima nije došlo do značajnog porasta količine jednolančanih lomova u DNA. Nakon 24 sata tretmana isti su autori uočili porast razine jednolančanih lomova u DNA neovisno o koncentraciji, štoviše veća su DNA oštećenja izmjerena u V79 stanicama tretiranim s koncentracijom irinotekana od  $9 \mu\text{g mL}^{-1}$  nego od  $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Objašnjavaju da razlog tomu može biti da se visoko fragmentirana DNA iz stanica tretiranih sa najvišom dozom irinotekana „ispire“ iz mikrogela agaroze i ne detektira pri mjerenjima. Nadalje, poznato je kako kamptotecin i njegovi derivati uzrokuju jednolančane lomove u DNA, ali ti se lomovi brzo popravljaju nakon uklanjanja lijeka, dok se citotoksični učinak održava (Yoshida i sur., 1993).

U istraživanju Kontek i Nowicka (2013) tumorske stanične linije pluća (A549) i adenokarcinoma debelog crijeva (HT29) u trajanju od 24 sata su tretirane s različitim koncentracijama irinotekana ( $4,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $9,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $18,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $37,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) te je proveden komet test. Dobiveni rezultati pokazuju da dolazi do povećanja % DNA u repovima kometa u odnosu na negativnu kontrolu. Irinotekan je inducirao manje lomova DNA u HT29 stanicama nego na staničnoj liniji A549, međutim lomovi se povećavaju sa porastom koncentracije irinotekana.

Kopjar i suradnici (2007) u istraživanju su testirali toksičnost koncentracija irinotekana od  $4,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $9 \mu\text{g mL}^{-1}$  na ljudskim imfocitima periferne krvi. Primjenom komet testa u alkalnim uvjetima utvrdili su kako je niža testirana koncentracija u vremenskoj točki 60 minuta nakon završenog tretmana pokazala izraženiji genotoksični učinak u odnosu na višu. Sličan trend je vidljiv i u našim rezultatima, naime, tijekom 4 i 48 sati tretmana % DNA u repu u odnosu na kontrolu je statistički značajan pri koncentraciji irinotekana od  $4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  dok pri koncentraciji  $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  nije.

Kontek i suradnici (2010) su priopćili da na stanicama limfocita, dobivenih od bolesnika s rakom debelog crijeva, irinotekan izaziva povećanje migracije DNA u repovima kometa koje je ovisno o koncentraciji. Sposobnost kamptotecina da inducira jednolančane i dvolančane DNA lomove je dokazano u istraživanjima provedenima na staničnim linijama CHO, DC3F i DC3F/C (Godard i sur., 2002).

U cjelini uzevši, rezultati komet testa dobiveni u ovom istraživanju potvrđuju sposobnost irinotekana da naruši integritet genoma u obje ispitane stanične linije. Na osnovi podataka poznatih iz dostupnih radova drugih autora koji su proučavali istu problematiku, najvažniji uzročnici izmjerenih razina primarnih oštećenja DNA izazvanih irinotekanom vjerojatno su jednolančani lomovi koji nastaju zbog djelovanja irinotekana i SN-38 na enzim DNA topoizomerazu I. Međutim, uslijed interakcija irinotekana (SN-38) i

DNA topoizomeraze I u stanicama nastaju i dvolančani lomovi, koji su po svojoj prirodi citotoksične lezije. Obje spomenute vrste lomova mogu se osjetljivo detektirati primijenjenom inačicom komet testa u alkalnim uvjetima koju smo koristili u ovome istraživanju. Također, valja istaknuti da na ukupnu razinu oštećenja DNA koju smo izmjerili utječu i mehanizmi popravka DNA pa je stoga ukupna izmjerena genotoksičnost rezultat: 1) izravnih oštećenja DNA nastalih utjecajem irinotekana i njegovih metabolita, 2) izravnih oštećenja DNA koja su potaknuli reaktivni kisikovi spojevi te 3) oštećenja DNA koja nastaju tijekom procesa popravka DNA. Svakako u obzir treba uzeti i različita vremena izlaganja stanica i fazu oporavka, budući da se kod dužih vremena izlaganja stanica istovremeno događaju i oštećenja i popravak DNA, čiji se pojedinačni doprinosi rezultatima komet testa nažalost ne mogu utvrditi jer se ova metoda zasniva na mjerenju ukupnih oštećenja genomske DNA. Stoga bi se se radi boljeg uvida u prirodu oštećenja DNA u različitim vrstama stanica u buduća istraživanja morale uključiti i modifikacije komet testa primjenom enzima koji omogućuju otkrivanje specifičnih vrsta oštećenja u molekuli DNA, poput oksidacijskih oštećenja baza i sl.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Dokazano je da je citotoksičnost irinotekana ovisna o staničnoj liniji. Kod kontinuirane humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) citotoksičnost je ovisna o koncentraciji, dok kod kontinuirane humane stanične linije adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) nije. Toksično djelovanje irinotekana se ispoljava nakon dužeg vremena inkubacije s oporavkom stanica.
2. Uočena je povezanost citotoksičnog učinka irinotekana s indukcijom slobodnih radikala. Nakon tretmana s irinotekanom bez oporavka pri svim vremenima inkubacije u slučaju visoke indukcije slobodnih radikala dolazi do smanjenja preživljenja, dok suprotno tomu kada nema indukcije slobodnih radikala dolazi do proliferacije stanica.
3. S produljenjem vremena inkubacije dolazi do genotoksičnog učinka irinotekana na obje tretirane stanične linije, međutim omjer postotka DNA i dužine repa kometa se značajno ne mijenja.
4. Kratko vrijeme izlaganja HepG2 stanica terapijskoj koncentraciji irinotekana za posljedicu ima proliferativni učinak, dok sa značajnim produljenjem vremena izlaganja dolazi do citotoksičnog učinka. Također, irinotekan u terapijskoj koncentraciji ne izaziva nastajanje slobodnih radikala nakon 48 sati tretmana, međutim nakon oporavka od 24 sata uočava se njihova indukcija. Za toksični učinak terapijske koncentracije irinotekana na Caco-2 stanicama potrebna je inkubacija stanica sa lijekom barem 24 sata. Do indukcije slobodnih radikala dolazi nakon kratkog vremena izlaganja irinotekanu, dok s produljenjem inkubacije vjerojatno dolazi do aktivacije antioksidacijskih mehanizama. Terapijska koncentracija irinotekana djeluje genotoksično na obje stanične linije i manifestira se u povećanju dužine repa kometa.

## 6. LITERATURA

Abdel-Rahman, W.M., Peltomaki, P. (2004) Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. *Ann. Med.* **36**, 379-388.

Abukhdeir, A.M., Park, B.H. (2008) P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, 3-10.

Aisling Aherne, S., Kerry, J.P., O'Brien, N.M. (2007) Effects of lant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *Brit. J. Nutr.* **97**, 321-328.

Alsner, J., Svejstrup, J.Q., Kjeldsen, E., Sorensen, B.S., Westergaard, O. (1992) Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J. Biol. Chem.* **267**, 12408-12411.

Ando, Y., Saka, H., Ando, M., Sawa, T., Muro, K., Ueoka, H., Yokoyama, A., Saitoh, S., Shimokata, K., Hasegawa, Y. (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res.* **60**, 6921-6926.

Apel, A., Zentgraf, H., Büchler, M.W., Herr, I. (2009) Autophagy- A double-edged sword in oncology. *Int. J. Cancer.* **125**, 991-995.

Araki, E., Ishikawa, M., Iigo, M., Koide, T., Itabashi, M., Hoshi, A. (1993) Relationship between development of diarrhea and the concentration of SN-38, an active metabolite of CPT-11, in the intestine and the blood plasma of athymic mice following intraperitoneal administration of CPT-11. *Jpn. J. Cancer. Res.* **84**, 697-702.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: HepG2 [HEPG2], <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 16. svibnja 2018.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: Caco-2 [Caco2], <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 16. svibnja 2018.

Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the Neutral Red cell viability assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2101-2103.

Baguley, B.C., Ferguson, L.R. (1998) Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 213-22.



- Baker, S.D., Wadkins, R.M., Stewart, C.F., Beck, W.T., Danks, M.K. (1995) Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as determined by fluorescence digital imaging microscopy. *Cytometry* **19**, 134-145.
- Ban, J., Osmak, M. (1996) Načela proliferacije tumora. U: *Klinička onkologija* (Turić, M., Kolarić, K., Eljuga, D., ured.), Nakladni zavod Globus, Zagreb, str. 37-55.
- Bates, D. J. P., Lewis, L. D. (2013) Manipulating the apoptotic pathway: potential therapeutics for cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **76**, 381-395.
- Batra, P., Sharma A.K. (2013) Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech.* **3**, 439-459.
- Berger, J.M. (1998) Structure of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 3-18.
- Bocci, G., Nicolaou, K.C., Kerbel, R.S. (2002) Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* **62**, 6938-6943.
- Boldogh, I., Roy, G., Lee, M.S., Bacsı, A., Hazra, T.K., Bhakat, K.K., Das, G.C., Mitra, S. (2003) Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNA-PKcs activity and low oxidative stress. *Toxicology.* **193**, 137-152.
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M., Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* **585**, 325-337.
- Borchers, A.T., Keen, C.L., Gershwin, M.E. (2004) Mushrooms, tumors, and immunity: an Update. *Exp. Biol. Med.* **229**, 393-406.
- Boyd, M.R., Paull, K.D. (1995) Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **34**, 91-109.
- Boyel, P., Levin, B., (2008) World Cancer Report 2008. IARC - International Agency for Research on Cancer, <<http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2008>>. Pristupljeno 30. srpnja 2018.
- Brkić, T., Grgić, M. (2006) Kolorektalni karcinom, novosti u gastroenterologiji. *Medicus.* **15**, 89-97.

- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L. (2010) Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal. Med.* **15**, 186-190.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 85-95.
- Cell Biolabs, Inc. (2014) Intracellular ROS Assay- Assay Principle. Cell Biolabs, Inc.- Creating Solutions for Life Science Research. <<http://www.cellbiolabs.com/reactive-oxygen-species-ros-assay>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2018.
- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., Los, M. J.(2013) Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **61**, 43-58.
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369-413.
- Circu, M.L., Aw, T.Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 749-62.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* **23**, 143-151.
- Cooper, G.M. (2002) *The Cell - A Molecular Approach*, 2. izd., Sinauer Associates, Sunderland.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2004) *Stanica. Molekularni pristup*, 4. izd., Medicinska naklada, Zagreb, str. 653-79.
- Coppola, D., Richard, C.K. (1997) Pathology of early colonic neoplasia: clinical and pathologic features of precursor lesions and minimal carcinomas. *Cancer Control J.* **4**, 160-166.
- Costa, L.G. (2005) *Current protocols in toxicology*, John Wiley and sons, New York.
- Čepelak I. (2009) Slobodni radikali i antioksidansi. U: *Štrausova Medicinska biokemija*. (Štraus, B., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 638-648.
- Čepelak, I., Dodig, S. (2003) Glutation i oksidacijski stres. *Biochem. Med.* **13**, 93-100.
- de Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G, Vande, P.A., Kirsch-Volders, M. (2000) Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutat Res.* **469**, 181-97.

- de Jong, F., Mathijssen, R.H., Xie, R., Verweij, J., Sparreboom, A. (2006) Flat-fixed dosing of irinotecan: influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability, U: *A Roadmap to Individualized Irinotecan Dosing*, Floris Aart de Jong, Rotterdam, str. 7-10.
- de Jong, F.A., Mathijssen, R.H., Xie, R., Verweij, J., Sparreboom, A. (2004). Flat-fixed dosing of irinotecan: influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4068-4071.
- Dehn, P.F., White, C.M., Conners, D.E., Shipkey, G., Cumbo, T.A. (2004) Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cell Dev. An.* **40**, 172-182.
- Demchenko A.P. (2013) Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology.* **65**, 157-172.
- Devita, V.T.Jr., Chu, E. (2008) A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **68**, 8643-8653.
- Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., Cascante, M. (2013) Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **138**, 255-271.
- Dodds, H.M., Haaz, M.C., Riou, J.F., Robert, J., Rivory, L.P. (1998) Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 578-583.
- Dusinska, M., Collins, A.R. (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis.* **23**, 191-205.
- Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663-669.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 193-236.
- Evans, W.E., McLeod, H.L. (2003). Pharmacogenomics: drug disposition, drug targets, and side effects. *New Engl. J. Med.* **348**, 538-549.
- Freres, P., Jerusalem, G., Moonen, M. (2016) Categories of anticancer treatments. U: *Anticancer treatments and cardiotoxicity: mechanisms, diagnostic and therapeutic*

*interventions* (Patrizio Lancellotti, P., Zamorano Gómez, J.L., Galderisi, M., ured.) Academic Press, London, str. 7-11.

Freshney, R.I. (2000) Quantitation-cell counting. U: *Culture of animal cells* (Wiley, J., Freshney, R.I., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Publication NY, New York.

Freshney, R.I. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., Samali, A. (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 1-23.

Galli, F., Piroddi, M., Annetti, C., Aisa, C., Floridi, E., Floridi, A. (2005) Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib. Nephrol.* **149**, 240-260.

Gamulin, M., Garaj-Vrhovac, V., Kopjar, N. (2007) Evaluation of DNA damage in radiotherapy-treated cancer patients using the alkaline Comet assay. *Collegium Antropol.* **31**, 837-845.

Garg, T., Jaggi, M., Khar, R.K., Talegaonkar, S. (2015) P-glycoprotein-dependent pharmacokinetics of irinotecan and its active metabolite, SN-38 in rats: Effect of verapamil. *ADMET & DMPK.* **3**, 68-76.

Gelderblom, H. A., de Jonge, M. J. A., Sparreboom, A., Verweij, J. (1999) Oral topoisomerase I inhibitors in adult patients: present and future. *Investig. New Drugs.* **17**, 401-415.

Gerets, H.H., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Deplechin, B.O., Dhalluin, S., Atienzar, F.A. (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol. Toxicol.* **28**, 69-87.

Gilroy, A.M., MacPherson, B.R., Ross, L.M. (2011) *Anatomski atlas. Latinsko nazivlje. Trbuh i zdjelica.* Medicinska naklada, Zagreb.

Godard, T., Deslandes, E., Sichel, F., Poul, J.M., Gauduchon, P. (2002) Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* **520**, 47-56.

Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 931-947.

- Green, D. R., Llambi, F. (2015) Cell death signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 3-17.
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., Uchida, K. (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* **44**, 1098-1124.
- Gupta, E., Lestingi, T.M., Mick, R., Ramirez, J., Vokes, E.E., Ratain, M.J. (1994) Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhoea. *Cancer Res.* **54**, 3723-3725.
- Haghiac, M., Walle, T. (2005) Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr. Cancer.* **53**, 220-231.
- Hancock, J.T., Desikan, R., Neill, S.J. (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 345-350.
- Hartwell, L.H., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E., Silver, L.M., Veres, R.C. (2000) *Genetics: From Genes to Genomes*, McGraw-Hill Higher Education, Washington, str. 602-605.
- Hegarty, M., Chidholm, D. (2002) Chemoterapy and Anaesthesia. *Curr. Anaesth. Crit. Care.* **13**, 168-174.
- HEMO (1998) Hemocytometer Cell Counting Protocol. <<http://home.sandiego.edu/~josephprovost/Hemocytometer%20Cell%20Counting%20Protocol.pdf>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2018.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Chu, X.Y., Tamai, I., Tsuji, A., Sugiyama, F. (2000) Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 265-270.
- Holden, J.A. (2001) DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* **1**, 1-25.
- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R., Harris, C.C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic. Acids Res.* **24**, 141-146.
- Horwitz, M.S., Horwitz, S.B. (1971) Intracellular degradation of HeLa and adenovirus type 2 DNA induced by camptothecin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 723-727.

- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**, 14873-14878.
- Huang, C., Liu, L.Y., Song, T.S., Ni, L., Yang, L., Hu, X.Y., Hu, J.S., Song, L.P., Luo, Y., Si, L.S. (2005) Apoptosis of pancreatic cancer BXPC-3 cells induced by indole-3-acetic acid in combination with horseradish peroxidase. *World J. Gastroenterol.* **11**, 4519-4523.
- Husain, I., Mohler, J.L., Seigler, H.F., Besterman, J.M. (1994) Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **54**, 539-546.
- Hussain, S.P., Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M., Bennett, W.P., Shields, P.G., Ham, A.J., Swenberg, J.A., Marrogi, A.J., Harris, C.C. (2000) Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res.* **60**, 3333-3337.
- Iyer, L., King, C.D., Whittington, P.F., Green, M.D., Roy, S.K., Tephly, T.R., Coffman, B.L., Ratain, M.J. (1998) Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11): role of uridin diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J. Clin. Invest.* **101**, 847-854.
- Janković, M., Markotić, A. (2007): Virusi i apoptoza. *Infektološki glasnik.* **27**, 3-70.
- Jass, J.R. (1995) Colorectal adenoma progression and genetic changes: is there a link? *Ann. Med.* **27**, 301-306.
- Jaxel, C., Capranico, G., Kerrigan, D., Kohn, K.W., Pommier, Y. (1991) Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. *J. Biol. Chem.* **266**, 20418-20423.
- Jaxel, C., Kohn, K.W., Wani, M.C., Wall, M.E., Pommier, Y. (1989) Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I. Evidence for a specific receptor site and for a relation to antitumor activity. *Cancer Res.* **49**, 1465-1469.
- Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Hanioka, N., Saeki, M., Ishida, S., Nishimura, T., Ando, M., Saito, Y., Ozawa, S., Sawada, J. (2003) Glucuronidation of 7-ethyl-10-

hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human UGT1A1 variants, G71R, P229Q, and Y486D. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 108-113.

Jones, R. G., Thompson, C. B. (2009) Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes. Dev.* **23**, 537-548.

Kang, Y.H., Lee, E., Choi, M.K., Ku, J.L., Kim, S.H., Park, Y.G., Lim, S.J. (2004) Role of reactive oxygen species in the induction of apoptosis by alpha-tocopheryl succinate. *Int. J. Cancer.* **112**, 385-392.

Kašuba, V., Rozgaj, R., Gamulin, M., Trošić, I. (2010) Assessment of cyto/genotoxicity of irinotecan in V79 cells using the comet, micronucleus, and chromosome aberration assay. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **61**, 1-9.

Kaufmann, S.H. (1998) Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 195-211.

Kenna, J.G., Jones, R.M. (1995) The organ toxicity of inhalation anaesthetics. *Anaesth. Analg.* **81**, 51-66.

Keyvani-Ghamsari, S., Rabbani-Chadegani, A., Sargolzaei, J., Shahhoseini, M. (2017) Effect of irinotecan on HMGB1, MMP9 expression, cell cycle, and cell growth in breast cancer (MCF-7) cells. *Tumour Biol.* **39**, 3-9.

Kingma, P.S., Osheroff, N. (1998) The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 223-32.

Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* **87**, 159-170.

Kiraz, Y., Adan, A., Yandim, M. K., Baran Y. (2016) Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour. Biol.* **37**, 8471-8486.

Klaassen, C. D. (1986) Principles of Toxicology. U: *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 3. izd., (Klaassen, C. D., Amdur, M. O, Doull, J., ured.), The McGraw-Hill Companies, New York, str. 19-28.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina-Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **56**, 195-204.

Kontek, R., Drozda, R., Sliwinski, M., Grzegorzczak, K. (2010) Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamins A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients. *Toxicol. In Vitro*. **24**, 417-424.

Kontek, R., Nowicka, H. (2013) The modulatory effect of melatonin on genotoxicity of irinotecan in healthy human lymphocytes and cancer cells. *Drug. Chem. Toxicol.* **36**, 335-342.

Kopjar, N., Želježić, D., Vrdoljak, A.L., Radić, B., Ramić, S., Milić, M., Gamulin, M., Pavlica, V., Fučić, A. (2007) Irinotecan toxicity to human blood cells in vitro: relationship between various biomarkers. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **100**, 403-413.

Kraljević, S., Sedić, M., Scott, M., Gehrig, P., Schlapbach, R., Pavelić, K. (2006) Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: What can be seen from the proteomics point of view? *Cancer Treat. Rev.* **32**, 619-629.

Krešić, V. (2009) Centralna jedinica za pripremu citostatske i intravenozne terapije-standardi kvalitete. Stručni rad, Sestrinski glasnik.

Lankisch, M.R., Ferlinz, K.C., Leahy, J.L., Scherbaum, W.A. (2008) Introducing a simplified approach to insulin therapy in type 2 diabetes: a comparison of two single-dose regimens of insulin glulisine plus insulin glargine and oral antidiabetic drugs. *Diabetes Obes. Metab.* **10**, 1178-1185.

LC Laboratories (2018) Irinotecan <<https://lclabs.com/products/i-4122-irinotecan-hydrochloride-salt-trihydrate/sds>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2018.

Lee, J.C., Son, Y.O., Pratheeshkumar, P., Shi, X. (2012) Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 742-57.

León-González, A.J., Auger, C., Schini-Kerth, V.B. (2015) Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **98**, 371-380.

Li, S., Yan, T., Yang, J.Q., Oberley, T. D., Oberley, L. W. (2000) The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* **60**, 3927-3939.

Loeb, L.A., Harris, C.C. (2008) Advances in chemical carcinogenesis: A historical Review and perspective. *Cancer res.* **68**, 6863-6872.



- Lucić Vrdoljak, A., Fuchs, F., Mikolić, A., Žunec, Ž., Karačonji, I.B., Jurič, A., Prester, L.J., Micek, V., Neuberg, M., Čanović, S., Mršić, G., Kopjar, N. (2018) Irinotecan and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol interactions in rat liver: a preliminary evaluation using biochemical and genotoxicity markers. *Molecules*. **23**, 2-25.
- Luqmani, Y.A. (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med. Prin. Pract.* **14**, 35-48.
- Maeda, H., Hori, S., Ohizumi, H., Segawa, T., Kakehi, Y., Ogawa, O., Kakizuka, A. (2004) Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ.* **11**, 737-746.
- Mathijssen, R. H., Verweij, J., de Jonge, M. J., Nooter, K., Stoter, G., Sparreboom, A. (2002). Impact of body-size measures on irinotecan clearance: alternative dosing recommendations. *J. Clin. Oncol.* **20**, 81-87.
- Mathijssen, R.H., van Alphen, R.J., Verweij, J., Loos, W.J., Nooter, K., Stoter, G., Sparreboom, A. (2001) Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.* **7**, 2182-2194.
- Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., Benchimol, S. (1984) Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO. J.* **13**, 3257-3262.
- Melliou, E., Chinou, I. (2004) Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta. Med.* **70**, 515-519.
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. **198**, 329-340.
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y., Fabre, G. (1995) The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* **11**, 187-194.
- Monchusi, B, Ntwasa, M. (2017) Methyl pyruvate protects a normal lung fibroblast cell line from irinotecan-induced cell death: potential use as adjunctive to chemotherapy. *PLoS one*. **12**, 2-18.
- Morales, M.C., Perez-Yarza, G., Nieto-Rementería, N., Boyano, M.D., Jangi, M., Atencia, R., Asumendi, A. (2005) Intracellular glutathione levels determine cell sensitivity to

apoptosis induced by the antineoplastic agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Anticancer Res.* **25**, 1945-1951.

Nafisi, S., Saboury, A.A., Keramat, N., Neault, J.F., Tajmir-Riahi, H.A. (2007) Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *J. Mol. Struct.* **827**, 35-43.

Nitiss, J.L. (2009) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 338-350.

Nonn, L., Berggren, M., Powis, G. (2003) Increased expression of mitochondrial Peroxiredoxin-3 (Thioredoxin Peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol. Cancer Res.* **1**, 682-689.

Onkologija.hr (2016a) Što kemoterapija može učiniti? <<http://www.onkologija.hr/kemoterapija/sto-kemoterapija-moze-uciniti/>>. Pristupljeno 31. srpnja 2018.

Onkologija.hr (2016b) Koji lijekovi se koriste u kemoterapiji? <<http://www.onkologija.hr/kemoterapija/koji-lijekovi-se-koriste-u-kemoterapiji/>>. Pristupljeno 2. kolovoza 2018

Pacadi, M. (2015) Ispitivanje genotoksičnosti podzemnih voda s područja Međunarodne zračne luke Zagreb na staničnim linijama HEP2 i A549. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Update.* **7**, 97-110.

Pizzolato, J.F., Saltz, L.B. (2003) The camptothecins. *Lancet.* **361**, 2235-2242.

Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond, *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 789-802.

Pommier, Y. (2009) DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem. Rev.* **109**, 2894-2902.

Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., Slrumberg, D. (1998) Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 83-106.

- Povirk, L. F., Austin, M. J. F. (1991) Genotoxicity of bleomycin. *Mutat. Res.* **257**, 127-143.
- Rajski, S.R., Williams, R.M. (1998) DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chem. Rev.* **98**, 2723-2795.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. protoc.* **3**, 1125-1131.
- Roche Diagnostics GmbH (2012) Culture of Animal Cells - Basic Techniques, <file:///C:/Users/Admin/Downloads/cell\_culture.pdf >. Pristupljeno 8. kolovoza 2018.
- Rossmann, M.J., Groot, H.J., Reese, V., Zhao, J., Amann, M., Richardson, R.S. (2013) Oxidative stress and COPD: The impact of oral antioxidants on skeletal muscle fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc.* **45**, 1235-1243.
- Rumora, L., Petrik, J., Žanić-Grubišić, T. (2003) Oksidacijski stres i stanična smrt. *Bioc. Med.* **13**, 75-82.
- Ruschoff, J., Bocker, T., Vogel, P., Schlegel, J. (1996) Prognostic significance of molecular biological and immunohistological parameters in gastrointestinal carcinomas. *Cancer Res.* **142**, 73-88.
- Salopek-Sondi, B., Piljac-Žegarac, J., Magnus, V., Kopjar, N. (2010) Free radical-scavenging activity and DNA damaging potential of auxins IAA and 2-methyl-IAA evaluated in human neutrophils by the alkaline comet assay. *J. Biochem. Mol. Toxic.* **24**, 165-173.
- Saltz, L.B. (1997) Clinical use of irinotecan: current status and future considerations. *Oncologist.* **2**, 402-409.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* **21**, 1-26.
- Santos, A., Zanetta, S., Cresteil, T., Deroussent, A., Pein, F., Raymond, E., Vernillet, L., Risse, M.L., Boige, V., Gouyette, A., Vassal, G. (2000) Metabolism of Irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in Humans. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2012-2020.
- Savill, J. (1994) Apoptosis and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 12-21.

- Sayar, N., Banerjee, S. (2008) Colon: colorectal adenocarcinoma. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **12**, 62-67.
- Senter, P.D., Beam, K.S., Mixan, B., Wahl, A.F. (2001) Identification and activities of human carboxylesterases for the activation of CPT-11, a clinically approved anticancer drug. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1074-1080.
- Sherr, C.J. (2004) Principles of tumor suppression. *Cell.* **116**, 235-246.
- Shewach, D.S., Kuchta, R.D. (2009) Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chem. Rev.* **109**, 2859-2861.
- Shi, X., Zhang, Y., Zheng, J., Pan, J. (2012) Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1215-1228.
- Shokrzadeh, M., Ghassemi-Barghi, N. (2018) Antioxidant and genoprotective effects of amifostine against irinotecan toxicity in human hepatoma cells. *Int. J. Cancer Res. Ther.* **3**, 3-5.
- Sies, H. (1991) Oxidative stress: introduction. U: *Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants* (Sies, H., ured.), Academic Press, San Diego, str. 15-22.
- Silveira, L.R., Pereira da Silva, L., Juel, C., Hellsten, Y. (2003) Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radical Bio. Med.* **35**, 455-464.
- Soldić, Ž. (2015, 26. kolovoz) Kemoterapija u liječenju zloćudnih bolesti. Pliva zdravlje, <<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/27160/Kemoterapija-u-lijecenju-zlocudnih-bolesti.html>> Pristupljeno 20. srpnja 2018.
- Sparreboom, A., van Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, A.H., Smit, J.W., Meijer, D.K., Borst, P., Nooijen, W.J., Beijnen, J.H., van Tellingen, O. (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 2031-2035.
- Stivers, J.T., Harris, T.K., Mildvan, A.S. (1997) Vaccinia DNA topoisomerase I: evidencesupporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation. *Biochemistry.* **36**, 5212-5222.
- Sugiyama, Y., Kato, Y., Chu, X. (1998) Multiplicity of biliary excretion mechanisms for the camptothecin derivative irinotecan (CPT-11), its metabolite SN-38, and its

glucuronide: role of canalicular multispecific organic anion transporter and P-glycoprotein. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **42**, S44-S49.

Štimac, D., Katičić, M., Kujundžić, M., Ljubičić, N., Poropat, G., Bokun, T. (2008) Značaj ranog otkrivanja raka debelog crijeva. *Medicina.* **44**, 7-15.

Štraus, B.(1995) Genomske promjene i karcinogeneza. *Bioch. Med.* **5**, 11-21.

Štraus, B., Rumora, L. (2009) Biokemija i dijagnostika zloćudnih tumora. U: *Štrausova Medicinska biokemija* (D. Čvorišćec, D., Čepelak, I., ured.), Medicinska naklada, Zagreb.

Takimoto, C.H., Wright, J., Arbuck, S.G. (1998) Clinical applications of the camptothecins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 107-119.

Tangvarasittichai, S. (2015) Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* **6**, 456-480.

Thurston, D.E. (2007) *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, Taylor and Francis Group, Boca Raton.

Tice, R. R., Aquarell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206-221.

Toffoli, G., Cecchin, E., Corona, G., Russo, A., Buonadonna, A., D'Andrea, M., Pasetto, L.M., Pessa, S., Errante, D., De Pangher, V., Giusto, M., Medici, M., Gaion, F., Sandri, P., Galligioni, E., Bonura, S., Boccalon, M., Bion, P., Frustaci, S. (2006) The role of UGT1A1\*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3061-3068.

Tomicic, M.T., Kaina, B. (2013) Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1835**, 11-27.

Tsuji, T., Kaneda, N., Kado, K., Yokokura, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D. (1991) CPT-11 converting enzyme from rat serum purification and some properties. *J. Pharmacobiodyn.* **14**, 341-349.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **266**, 37-56.

- Van Cruchten, S., Van Den Broeck, W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* **31**, 214-223.
- Vrdoljak, E.D., Šamija, M.R., Kusić, Z., Petković, M., Gugić, D., Krajina, Z. (2013) *Klinička onkologija*, Medicinska naklada, Zagreb, str. 1-8.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E. (1996) Plant antitumor agents. 1. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3888-3890.
- Wang, H., Joseph, J.A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio. Med.* **27**, 612-616.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* **171**, 964-967.
- Wu, J., Yin, M.B., Hapke, G., Toth, K., Rustum, Y.M. (2002) Induction of biphasic DNA double strand breaks and activation of multiple repair protein complexes by DNA topoisomerase I drug 7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin. *Mol Pharmacol.* **61**, 742-748
- Xu, Y., Villalona-Calero, M.A. (2002) Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann. Oncol.* **13**, 1841-1851.
- Yoshida, A., Ueda, T., Wano, Y., Nakamura, T. (1993) DNA damage and cell killing by camptothecin and its derivative in human leukemia HL-60 cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**, 566-573.
- Yuzaki, K., Hamaguchi, H. (2004) Intercalation-induced structural change of DNA as studied by 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy. *J. Raman. Spec.* **35**, 1013.
- Zhang, H., Barcelo, J.M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Pommier, Y. (2001) Human mitochondrial topoisomerase I, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10608-10613.
- Žlender, V. (2003) Apoptoza-programirana smrt stanice. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **54**, 267-274.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Lejla Joukhadar

---

## IZJAVA O IZVORNOSTI

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Lejla Joukhadar

Lejla Joukhadar