

# Aktivnost glukuronidacijskog sustava u metabolički važnim tkivima miša

---

**Đolonga, Petar**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:966242>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Petar Đolonga**

**AKTIVNOST GLUKURONIDACIJSKOG SUSTAVA U METABOLIČKI VAŽNIM  
TKIVIMA MIŠA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.**

**Split, srpanj 2023.**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Metabolizam ksenobiotika</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Glukuronidacija.....	2
1.1.2. UDP-glukuronil transferaze .....	4
1.1.3. Tkivna distribucija glukuronidacijskog sustava .....	6
<b>1.2. Regulacija aktivnosti glukuronidacijskog sustava</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. Spolni hormoni i interindividualna varijabilnost.....	7
1.2.2. Tkivno specifični transkripcijski čimbenici .....	8
1.2.3. Druge izoforme UGT1A proteina (UGT1A <sub>i2</sub> ).....	8
1.2.4. Epigenetika.....	10
1.2.5. Ksenobiotici.....	10
<b>1.3. N-butil-N-(4-hidroksibutil)nitrozamin – BBN</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Metabolizam BBN-a .....	10
1.3.2. Dosadašnje spoznaje o utjecaju BBN-a na ekspresiju gena iz obitelji Ugt .....	12
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>13</b>
2.1. Ciljevi istraživanja.....	14
2.2. Hipoteze istraživanja .....	14
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. Protokol istraživanja</b> .....	<b>16</b>
3.1.1. Akutni tretman BBN-om .....	16
3.1.2. Akutni tretman BBN-om i antibioticima.....	16
3.1.3. Kronični tretman BBN-om .....	17
<b>3.2. Izolacija tkivne mRNA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3. Sinteza cDNA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)</b> .....	<b>19</b>
3.4.1. Princip qRT-PCR reakcije .....	19
3.4.2. Priprema qRT-PCR reakcije .....	22
<b>3.5. RNA sekvenciranje</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6. Obrada podataka</b> .....	<b>26</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>27</b>
4.1. Bazalni izražaj gena Ugt1a .....	28
4.2. Utjecaj BBN-a na izražaj gena Ugt1a .....	29
4.3. Izražaj gena skupine Ugt u mokraćnom mjehuru miševa s reduciranom mikrobiotom i tretiranih BBN-om .....	30
4.4. Izražaj gena skupine Ugt u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura .....	31

<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1. Bazalni izražaj gena Ugt1a .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2. Izražaj gena Ugt1a u odnosu na tretman BBN-om .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3. Mikrobiota i izražaj gena skupine Ugt .....</b>	<b>35</b>
<b>5.4. Izražaj gena skupine Ugt u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura .....</b>	<b>36</b>
5.4.1. Ugt1a6.....	36
5.4.2. Ugt2b1.....	37
5.4.3. Ugt2b34 i Ugt2b35 .....	38
5.4.4. Ugt1a7c.....	38
5.4.5. Ugt1a1.....	39
<b>5.5. Ograničenja provedenog istraživanja.....</b>	<b>39</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>40</b>
<b>7. POPIS CITIRANE LITERATURE .....</b>	<b>42</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>49</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>51</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>53</b>

*Zahvaljujem se mentoru, prof. dr. sc. Janošu Terziću, dr. med. na ukazanoj prilici, stručnom vodstvu, dostupnosti i znanju koje mi je pružio tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem se Dori Knezović, dr. med. na velikoj pomoći pri radu u laboratoriju, a bez koje izrada ovog rada ne bi bila moguća.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marini Degoriciji i dr. sc. Blanki Roje jer su mi nesebično ustupile rezultate svojih pokusa, a koji čine jedan dio ovog istraživanja.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima, fakultetskim koji su ovih šest godina učinili nezaboravnima i onima iz djetinjstva koji su bili i ostali moja neopisiva podrška. Najveće hvala mojoj obitelji. Mojim roditeljima koji su svojim odgojem, potporom i odricanjem omogućili ovih šest godina. Mojoj sestri jer je bila moja najustrajnija podrška. Hvala vam jer ste vjerovali u mene kada ni ja nisam.*

*Na kraju, zahvaljujem se svim svojim učiteljima koji su kroz moje školovanje pomogli u oblikovanju moje osobnosti i odabiru životnog puta.*

## **1. UVOD**

## **1.1. Metabolizam ksenobiotika**

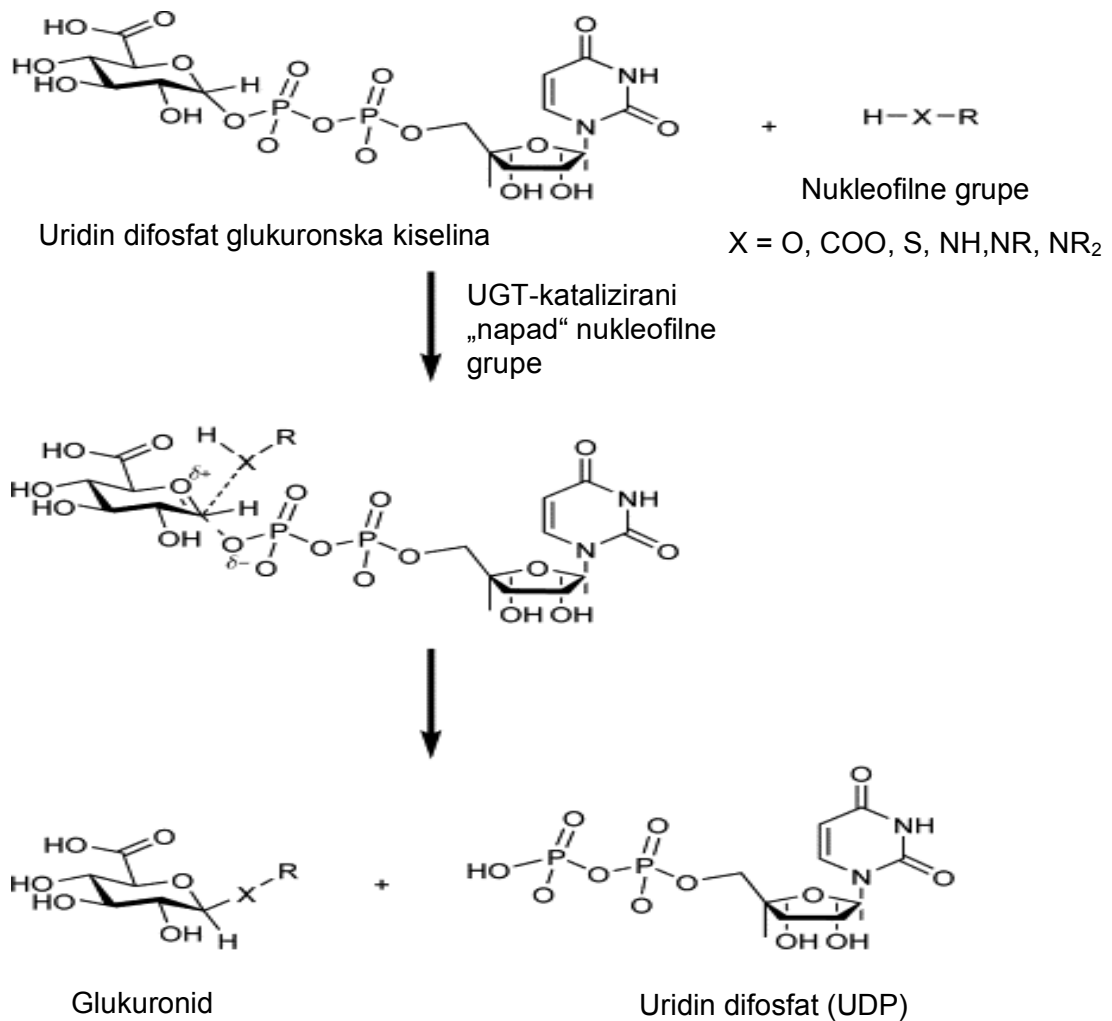
Ksenobiotici su kemikalije koje se ne proizvode u organizmu već dospijevaju u krvotok kroz probavni i dišni sustav, kožu i druge tjelesne barijere (1). Nakon što uđu u organizam, ksenobiotici mogu narušiti homeostazu što vodi aktivaciji staničnog odgovora na stres. Kako bi se taj učinak minimalizirao, stanice različitih tkiva, primarno jetre, bubrega i probavnog sustava, eksprimiraju gene čiji su produkti enzimi koji kataliziraju kemijske reakcije čija je svrha smanjenje toksičnosti i konačna eliminacija ksenobiotika. Niz tih kemijskih reakcija nazvan je metabolizam ksenobiotika, a odvija se u dvije faze (2).

Prva faza ili faza I, metabolizma ksenobiotika posredovana je skupinom enzima nazvanom citokrom P450 (CYP450). To je najveća skupina enzima koja sudjeluje u metabolizmu ksenobiotika. Enzimi ove faze kataliziraju reakcije oksidacije, redukcije, deaminacije, hidroksilacije, sulfoksidacije i dealkilacije (3). Geni koji kodiraju te enzime eksprimirani su u brojnim tkivima: jetri, bubregu, probavnim organima, krvnim stanicama, spolnim organima, mozgu, masnom tkivu, plućima, itd. (2).

Faza II, tj. druga faza metabolizma ksenobiotika obuhvaća reakcije konjugacije produkata iz faze I. Na taj se način, vezivanjem hidrofilnih spojeva, potencijalno toksični i hidrofobni supstrati pretvaraju u netoksične i u vodi topive (hidrofilne) konjugate koji se, otopljeni u urinu i žuči, lako izlučuju iz organizma. Enzimi druge faze metabolizma ksenobiotika su: UDP-glukuronil transferaze, sulfotransferaze, N-acetiltransferaze, glutation-S-transferaze, tiopurin S-metiltransferaze i katekol O-metiltransferaze (4).

### **1.1.1. Glukuronidacija**

Glukuronidacija je metabolička reakcija posredovana enzimima UDP-glukuronil transferaze (5). To je reakcija druge faze metabolizma ksenobiotika tijekom koje se hidrofobni supstrati konjugiraju anionskim ostacima glukuronske kiseline čime se povećava njihova topivost u vodi (hidrofilnost) i omogućava ekskrecija iz organizma putem žuči i urina (6). Glukuronidacija je glavni biokemijski put eliminacije supstrata koji sadrže hidroksilne, karbonilne, karboksilne, aminske i tiolne ostatke što podrazumijeva mnoštvo egzogenih i endogenih tvari od kojih su najčešći lijekovi, prehrambene kemikalije, karcinogeni, bilirubin, masne kiseline i hidroksisteroidi (7) (Slika 1).



**Slika 1. Biokemijski prikaz glukuronidacije.** UGT kataliziraju prijenos nukleofilne grupe s lipofilnog supstrata na anomerni ugljikov atom glukuronskog ostatka vezanog za uridin difosfat. Na ovaj način nastaju hidrofilni, glukuronski derivat prethodno hidrofobnog supstrata (glukuronid) i uridin difosfat. Navedene su brojne nukleofilne grupe koje sudjeluju u reakciji glukuronidacije: hidroksilna (fenolna i alkoholna), karboksilna, tiolna, karbonilna i aminska (primarna, sekundarna i tercijarna).

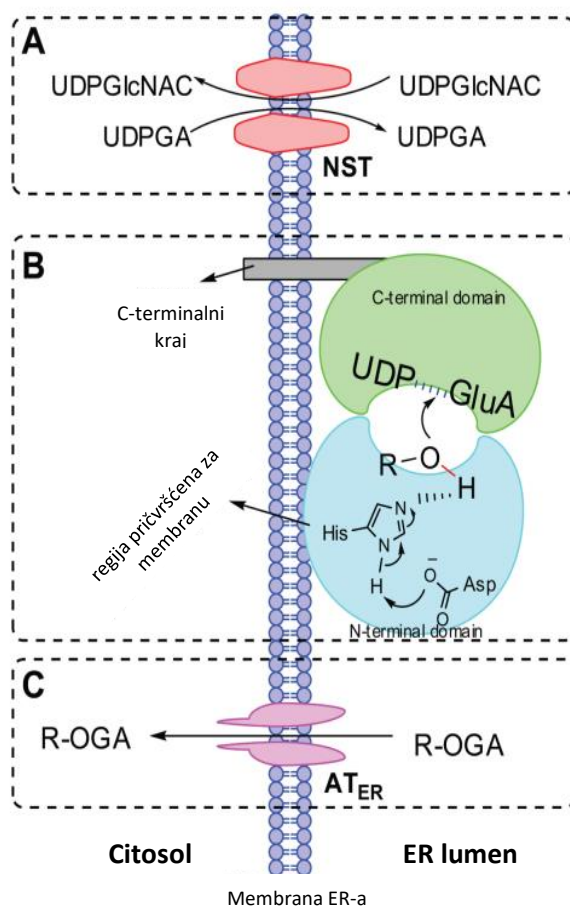
UGT – UDP-glukuronil transferaze

Preuzeto i prilagođeno prema: McQueen CA, Mackenzie PI, Gardner-Stephen DA, Miners JO. UDP-Glucuronosyltransferases. U: Comprehensive toxicology. Amsterdam: Elsevier; 2010. str. 413-34.



### 1.1.2. UDP-glukuronil transferaze

UDP-glukuronil transferaze (UGT) su enzimi koji su vezani za membrane na luminalnoj površini endoplazmatskog retikuluma (8). Molekularna struktura i smještaj tih enzima u stanici detaljnije su prikazani na slici 2.



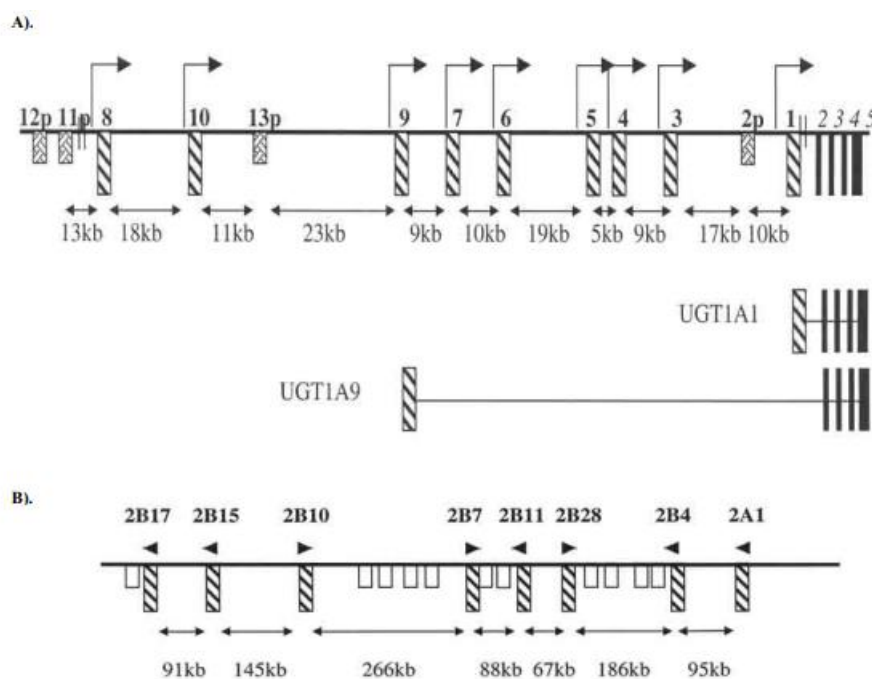
**Slika 2. Smještaj i funkcija UDP-glukuronil transferaza.** (A) NST je prijenosna molekula koja služi za prijenos UDPGA iz citoplazme u lumen ER-a. Ista molekula, ali u suprotnom smjeru, prenosi UDPGlcNAC, nusprodukt prikazane kemijske reakcije iz kojeg se reciklira UDP koji će poslužiti kao nosač aniona glukuronske kiseline za novu glukuronidacijsku reakciju. (B) Topologija UDP-glukuronil transferaza u biološkim membranama na primjeru supstrata s hidroksilnom nukleofilnom grupom (R-OH). UDP-glukuronil transferaze sastoje se od dvije domene i funkcioniraju kao dimeri ili oligomeri. Najvećim dijelom enzim je smješten u lumenu ER-a za čiju je membranu vezan amino-terminalnom domenom. Karboksi-terminalna domena nije vezana za membranu ER-a, već završava „repm“ koji prolazi kroz membranu i izviruje u citoplazmu stanice. Između amino- i karboksi-terminalne domene smješteno je aktivno mjesto enzima gdje se, kako je i prikazano, vežu supstrat (za N-terminalnu domenu) i UDP-glukuronid (za C-terminalnu domenu). (C) Formirani glukuronid prenosi se u citoplazmu stanice procesom olakšane difuzije preko  $AT_{ER}$ .

NST – nukleotidno-šećerni transporter; UDPGA – UDP-glukuronid; ER – endoplazmatski retikulum; UDPGlcNAC – UDP-N-acetil glukozamin;  $AT_{ER}$  – organski anionski transporter

Preuzeto i prilagođeno prema: Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: A barrier to oral bioavailability of phenolics. J Pharm Sci. 2011;100:3655-81.

Superobitelj gena Ugt dijeli se na četiri obitelji, Ugt1, Ugt2, Ugt3 i Ugt8 (9), a obzirom da važnost enzima iz obitelji Ugt3 i Ugt8 još nije razjašnjena, neće biti detaljnije opisivana. Ljudska obitelj Ugt1 sastoji se od devet proteina koji imaju različite amino-terminalne i istovjetne karboksi-terminalne domene. Kodirajući transkript proteina UGT1 nastaje alternativnim izrezivanjem tkivno specifičnog prvog egzona (a1, a3, a4, a5, a6, a7, a8, a9 i a10) sa zajedničkim, nizvodnim egzonima označenima s 2-5. Gen se nalazi na dugom kraku drugog kromosoma 2q37, a kako je prikazano na slici 3A. Prvi egzoni a2, a11, a12 i a13 smatraju se pseudogenima. Gotovo identičan kompleks gena nalazi se i u miša na kromosomu 1, što svjedoči o evolucijskoj sačuvanosti i važnosti tih gena (6,10).

Za razliku od članova obitelji Ugt1, proteine iz obitelji Ugt2, koja je podijeljena na podobitelji Ugt2a i Ugt2b, kodira šest različitih egzona smještenih na kromosomu 4q13 u čovjeka i kromosomu 5 u miša (Slika 3B). Obitelj Ugt2a sastoji se od dva, a obitelj Ugt2b od sedam članova, a što je isto u ljudi i miševa (6,10).



**Slika 3. Shematski prikaz ljudskih gena UGT1 (A) i UGT2 (B).** Pseudogeni su označeni bijelim stupićima. Orijentacija gena prikazana je strelicama. (A) Ilustriran je proces alternativnog izrezivanja pri formiranju transkripta za UGT1A1 i UGT1A9. Vidi se da je izrezan dio molekule DNA između jedinstvenih egzona 1, odnosno 9 i zajedničkih nizvodnih egzona 2-5. (B) Prikazani su pojedinačni geni od kojih svaki kodira svoj protein iz obitelji UGT2.

Preuzeto i prilagođeno prema: Mackenzie P, Gregory P, Gardner-Stephen D, Lewinsky R, Jorgensen B, Nishiyama T, i sur. Regulation of UDP glucuronosyltransferase genes. *Curr Drug Metab.* 2003;4:249-57.

### 1.1.3. Tkivna distribucija glukuronidacijskog sustava

Jetra je glavni glukuronidacijski organ sisavaca iako je potvrđena prisutnost Ugt mRNA i u velikom broju drugih tkiva poput: bubrega, crijeva, želudca, pluća, jajnika, testisa, dojke, prostate i mozga (11). Anatomska građa jetre i portalni krvotok čine jetru stalno izloženom različitim ksenobiotičima koji se resorbiraju u crijevima. Dokazano je da najveću jetrenu ekspresiju ima gen Ugt1a1 čiji je produkt zaslužan za glukuronidaciju bilirubina, toksičnog produkta koji nastaje razgradnjom hemoglobina (12). Upravo se biološka važnost glukuronidacije najbolje očituje na primjeru mutacija u genu Ugt1a1. Naime, kompletna inaktivacija gena zaduženih za glukuronidaciju bilirubina koja postoji u sindromu Crigler-Najjar tip 1 dovodi do izrazite žutice uzrokovane s neglukuronidiranim bilirubinom i rane smrti bolesnika. Također, smatra se da je genetički aspekt naizgled bezazlenih stanja kao što je sindrom Gilbert-Meulengracht mnogo kompleksniji i da osim blagih oštećenja u metabolizmu bilirubina dovodi do predispozicije za razvoj ozbiljnih stanja povezanih s oštećenjem metabolizma različitih ksenobiotika (13). Kvantitativnim profiliranjem UGT-transkriptoma u uzorcima ljudske jetre, dokazana je i vrlo visoka ekspresija Ugt1a3, 1a4, 1a6 i 1a9 gena, dok je ekspresija Ugt1a5, 1a7, 1a8 i 1a10 gena bila zanemariva (14).

Osim u jetri, ekspresija obitelji gena Ugt1a istraživana je u bubregu i crijevima. Imunohistokemijskom analizom uzoraka zdravog ljudskog bubrega primijećena je difuzna ekspresija gena Ugt1a u bubrežnoj kori s tendencijom smanjivanja prema srži bubrega. Najizraženija imunoreaktivnost zabilježena je u proksimalnim tubulima nefrona, za razliku od one u distalnim tubulima, Henleovoj petlji i sabirnim kanalčićima gdje je intenzitet bojanja okarakteriziran kao slab do umjeren (15). Aktivnost glukuronidacijskog sustava dokazana je i u gastrointestinalnom sustavu s predominacijom u crijevima. Prisustvo transkripta Ugt1a gena dokazano je u epitelnim stanicama duodenalne, jejunalne i ilealne sluznice (16), kao i u epitelnim stanicama sluznice debelog crijeva (17). Ekspresija navedenih gena u submukozi crijeva nije zabilježena ili je bila zanemariva (16,17). Uspoređujući katalitičku aktivnost u pojedinim dijelovima crijeva, pokazano je kako je aktivnost glukuronidacijskog sustava jako izražena u jejunumu, a smanjuje se prema duodenumu i ileumu (16). Katalitička aktivnost postoji i u debelom crijevu, ali je značajno manje izražena nego li u tankom crijevu i jetri (17).

Uloga glukuronidacijskih enzima istraživana je u kontekstu karcinogeneze. Rezultati nekoliko studija provedenih na staničnim linijama porijekla mišjeg i ljudskog karcinoma mokraćnog mjehura sugeriraju da snižena aktivnost genskih produkata sustava Ugt korelira sa

zloćudnom transformacijom uroepitelnih stanica (18). Štoviše, rezultati RNA sekvenciranja koje je provedeno na uzorcima zdravog i tumorski izmijenjenog tkiva bubrega i crijeva pokazuju da je ekspresija gena sustava *Ugt* značajno snižena u tumorskim tkivima (14). Nedavno objavljena istraživanja proučavaju aktivnosti glukuronidacijskog sustava tijekom embriogeneze. Rezultati *western blot* analize uzoraka mišje blastociste dokazali su prisustvo proteina UGT1A, a pretpostavlja se da je najranije eksprimiran gen *Ugt1a6* (19). Najvažniju ulogu tijekom fetalnog razvoja ima obitelj gena *Ugt2b* čijom ekspresijom nastaju enzimi koji glukuronidiraju spolne hormone koji su neophodni za fiziološki razvoj posteljice (20).

## **1.2. Regulacija aktivnosti glukuronidacijskog sustava**

### **1.2.1. Spolni hormoni i interindividualna varijabilnost**

Nekoliko studija koje se bave glukuronidacijom ukazuju na značajne razlike u genskoj ekspresiji sustava *Ugt* među spolovima. Dokazano je da je ekspresija gena *Ugt1a1* veća u uzorcima jetre ženskih miševa (6) i štakora (21) nego muških što se pripisuje potencijalnim učincima spolnih hormona. Naime, smatra se da testosteron suprimira ekspresiju *Ugt1a1* u jetri muških štakora, a da progesteron inducira ekspresiju *Ugt1a1* u jetri ženskih štakora. Ti rezultati pretpostavljaju postojanje određenih razlika u metabolizmu bilirubina među spolovima što treba biti istraženo i na humanim tkivima (21). Ovisnost ljudskog glukuronidacijskog sustava o steroidnim, spolnim hormonima dokazivana je za obitelj gena *Ugt2b*. Rezultati pokazuju da su ekspresija gena *Ugt2b17* i katalitička aktivnost pripadajućeg enzima veći u uzorcima muške, nego ženske jetre. Obzirom da su supstrati navedenog enzima steroidni hormoni i neki okolišni karcinogeni potrebno je dodatno istražiti imaju li opisani rezultati učinka na razlike u metabolizmu ksenobiotika i na nastanak bolesti među spolovima (22). Spolni steroidi potencijalno utječu i na ekspresiju *Ugt1a5*, *Ugt2b1* i *Ugt2b2* gena (6,10).

Istraživanja koja proučavaju glukuronidaciju različitih egzogenih i endogenih tvari naglašavaju važnost interindividualnih razlika u aktivnosti glukuronidacijskog sustava (10,23). Za sada se smatra da bi navedeno mogla biti posljedica polimorfizama u kodirajućim dijelovima gena sustava *Ugt* što dovodi do razlika u enzimskim katalitičkim svojstvima. Usprkos tomu, zbog drugih, najvećim dijelom neistraženih čimbenika, aktivnost glukuronidacijskog sustava u tih osoba uglavnom nije značajnije narušena (10).

### 1.2.2. Tkivno specifični transkripcijski čimbenici

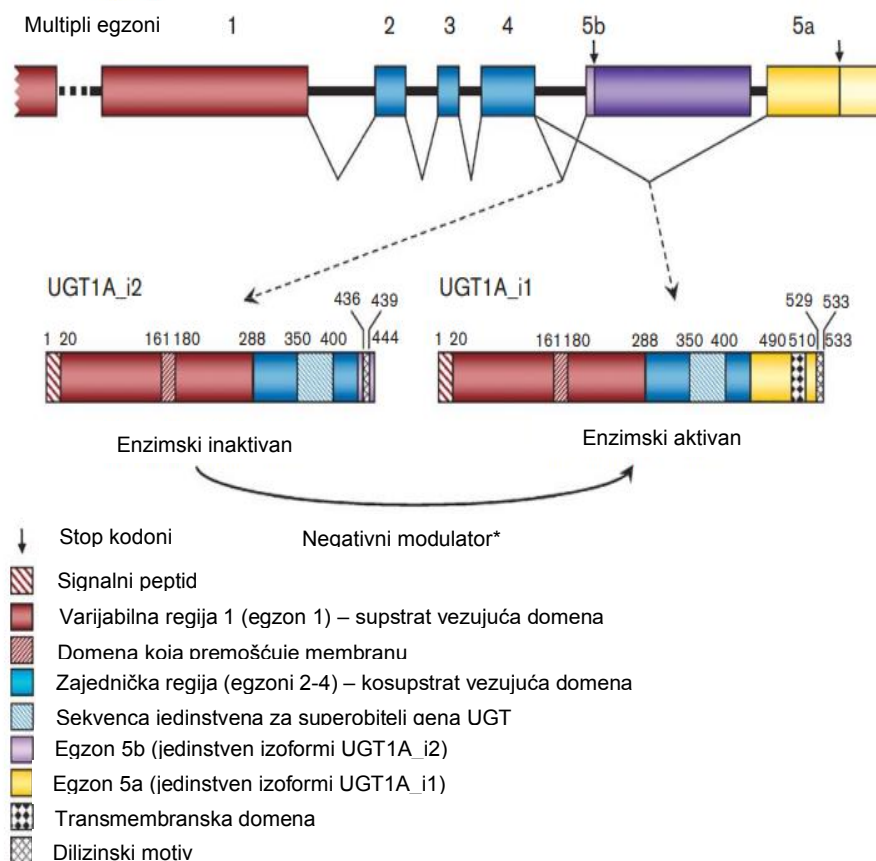
Kako je već objašnjeno, jetra je tkivo s najširoom ekspresijom gena glukuronidacijskog sustava. Prisutnost ovih enzima u jetri je toliko sveobuhvatna da se određene izoforme UDP-glukuronil transferaza mogu pronaći jedino u njoj što indicira da u hepatocitima postoje određeni, za jetru specifični, pojačivači transkripcije gena sustava Ugt. Analiza početnih dijelova promotora gena Ugt1a1 i Ugt2b1 pokazala je postojanje dijelova DNA koji su karakteristični i za druge gene ekspimirane samo u jetri kao što su oni koji kodiraju albumin, fibrinogen i  $\alpha$ -fetoprotein. Za spomenute slijedove promotorske DNA vežu se transkripcijski faktori Hnf1 i c/ebp koji zatim pojačavaju transkripciju nizvodnog gena (10). Smanjena ekspresija gena Ugt1a1 i Ugt2b1 dokazana je kod miševa kod kojih su transgenskom manipulacijom utišani geni koji kodiraju faktore Hnf1 i c/ebp (24,25). Osim opisanih, kao regulatori bazalne Ugt ekspresije u jetri i crijevima u literaturi se spominju produkti ekspresije gena Oct1, homeobox-2 i Ach (10).

### 1.2.3. Druge izoforme UGT1A proteina (UGT1A\_i2)

Napredovanjem u razvoju genskog sekvenciranja primijećeno je da zajednička 3' egzonska regija gena Ugt1a (egzoni 2-5, slika 3A) koja kodira C-terminalnu domenu enzimske molekule sadrži najmanje jedan dodatni egzon koji je nazvan 5b. Smatra se da je u procesu alternativnog izrezivanja egzon 5b ravnopravan drugim zajedničkim egzonima što implicira da osim devet klasičnih, enzimski aktivnih izoformi UGT1A postoji još minimalno devet, a po nekim istraživanjima postoji čak 18 UGT1A izoformi, ukoliko se u obzir uzmu i one koje nastaju prepisivanjem cijelog egzona 5 (5a+5b). Te, relativno novootkrivene izoforme nazvane su UGT1A\_i2. Za razliku od klasičnih proteina UGT1A (UGT1A\_i1), ovi koji nastaju novijim obrascima alternativnog izrezivanja nisu enzimski aktivni jer nemaju transmembranske domene (Slika 4). Translacijski produkt mRNA koja nastaje ekspresijom egzona 5b je slijed od deset aminokiselina (RKKQQSGRQM) unutar kojeg se ističu dilizinski motiv KKXX i četiri pozitivno nabijena aminokiselinska ostatka. Za njih se smatra da sudjeluju u formiranju čvrstih veza s negativno nabijenim membranama endoplazmatskog retikuluma što UGT1A\_i2 proteine zadržava unutar njega (26). Biološka važnost ovih proteina očituje se u negativnom modulacijskom utjecaju na klasični glukuronidacijski sustav. Kako je prethodno navedeno, da bi katalitička aktivnost UDP-glukuronil transferaza bila valjana mora doći do dimerizacije proteina. S obzirom da UGT1A\_i2 izoforme sadrže vezna mjesta za glukuronidacijski supstrat i kosupstrat, ali ne i transmembransku domenu kodiranu slijedom nukleotida u egzonu 5a, one ne mogu biti enzimski aktivne, ali se mogu u procesu dimerizacije spajati s klasičnim formama

glukuronil transferaza posljedično čemu se glukuronidacijski potencijal stanice smanjuje ili u potpunosti utišava (27).

UGT1A\_i2 izoforme najviše su eksprimirane u ekstrahepatičkim tkivima, posebno u bubregu i gastrointestinalnom sustavu gdje se njihova ekspresija povećava prema aboralno. Relevantnost ovih nalaza još mora biti istražena. Relativno mala ekspresija u jetri jedan je od čimbenika koji, uz transkripcijske čimbenike opisane u dijelu 1.2.2., osiguravaju snažnu glukuronidacijsku sposobnost tog organa (15).



**Slika 4. Shematski prikaz gena i proteina te regulatorne uloge UGT1A\_i2.** Transkript za UGT1A\_i2 u odnosu na transkript za UGT1A\_i1 ne sadrži regiju koja kodira hidrofobnu transmembransku domenu zbog čega te enzimske izoforme nisu katalitički aktivne. Oba transkripta sadrže dilizinske motive zbog čega su čvrsto vezani za membrane endoplazmatskog retikuluma. Važno je primijetiti da oba transkripta sadrže i one regije koje kodiraju mjesta za koje se vežu glukuronidacijski supstrat i kosupstrat.

UGT1A\_i1 – izoforma 1 UGT1A proteina; UGT1A\_i2 – izoforma 2 UGT1A proteina

Preuzeto i prilagođeno prema: Girard H, Lévesque E, Bellemare J, Journault K, Caillier B, Guillemette C. Genetic diversity at the UGT1 locus is amplified by a novel 3' alternative splicing mechanism leading to nine additional UGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17:1077-89.

#### **1.2.4. Epigenetika**

Rijetki su geni sustava Ugt koji nisu eksprimirani u jetrenom tkivu, kao na primjer Ugt1a10 čija je ekspresija značajno veća u crijevima. Nedavno je predloženo kako bi epigenetička regulacija mogla imati ključnu ulogu u zanemarivoj ekspresiji ovog gena u jetri u odnosu na crijeva. Analizom metilacijskog statusa DNA gena Ugt1a10 u jetri i tankom crijevu, dokazano je kako su CpG-bogate regije promotora ovog gena hipermetilirane u hepatocitima i hipometilirane u epitelnim stanicama tankog crijeva. Smatra se da metilirani dijelovi promotora interferiraju s vezanjem transkripcijskih čimbenika i potiču regrutiranje korepresorskih molekula kao što su histonske deacetilaze što posljedično uzrokuje kondenzaciju DNA i smanjen izražaj gena (11).

#### **1.2.5. Ksenobiotici**

Već dugo je poznato da mnogi ksenobiotici reguliraju aktivnost enzima sustava CYP, ali je malo podataka o utjecaju ksenobiotika na enzime druge faze, posebno one iz obitelji UGT. Istraživanja koja se bave ulogom nikotina u nastanku ovisnosti pokazala su da u uzorcima mozga miševa tretiranih nikotinom postoji povećana ekspresija mRNA nekih gena iz obitelji Ugt1a, od kojih se najčešće spominje Ugt1a3. U uzorcima jetre istih miševa nije dokazana statistički značajna indukcija ekspresije niti povećanje katalitičke aktivnosti glukuronidacijskog sustava. Ti podaci otvaraju nova pitanja o utjecaju varijacija u glukuronidaciji na metabolizam endogenih i egzogenih tvari (28).

Uloga enzima glukuronidacije u karcinogenezi spomenuta je ranije u sekciji 1.1.3., te je se dodatno opisuje u sekciji 1.3.2. Ukratko, povećana katalitička aktivnost glukuronil transferaza smanjuje rizik za zloćudnu promjenu stanica, ali i progresiju nekih nemalighnih kroničnih bolesti kao što su steatoza jetre i steatohepatitis (29). Proučavanje farmakodinamskih svojstava oltipraza, lijeka koji se koristio za liječenje shistosomijaze, pokazalo je da on djeluje kao snažan induktor enzima druge faze metabolizma ksenobiotika, posebno glutathion-S-transferaze i UDP-glukuronil transferaza. Ti rezultati impliciraju da namjerna indukcija glukuronidacijskog sustava lijekovima može minimalizirati malignu pretvorbu stanica potaknutu kemijskim karcinogenima (30).

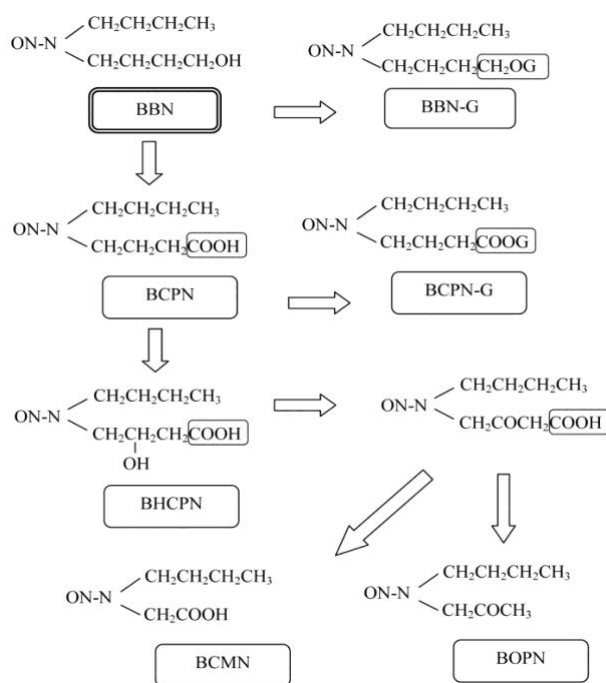
### **1.3. N-butil-N-(4-hidroksibutil)nitrozamin – BBN**

#### **1.3.1. Metabolizam BBN-a**

BBN je alkilirajući kemijski spoj iz skupine nitrozamina koji je srodan karcinogenim kemikalijama izoliranim iz duhanskog dima (31). Radi se o žutoj do žuto crvenoj tekućini koja

se kod eksperimentalnih životinja najčešće administrira oralno, u vodi za piće, u dozi između 0,01-0,05%, uz korištenje tamnih boca zbog fotosenzitivnosti otopine. Primjena može ići i preko gastrične sonde ali se zbog rizika od aspiracijske pneumonije te ozljede jednjaka ili želuca rijetko primjenjuje. Supkutana i izravna intravezikalna instilacija koriste se iznimno rijetko (32).

BBN se smatra neizravnim karcinogenom obzirom na činjenicu da zahtijeva aktivaciju koja se pretežno događa u jetri, ali i u mokraćnom mjehuru. Aktivacija podrazumijeva oksidaciju hidroksilne skupine u molekuli čime nastaje karcinogeni metabolit, BCPN, odnosno N-butil-N-(3-karboksipropil)nitrozamin. Uz oksidaciju, u jetri BBN se metabolizira putem sustava Ugt u vodotopivi glukuronid, koji suprotno BCPN-u nema karcinogeni učinak (32). Metabolizam BBN-a s detaljnim prikazom metabolita prikazan je na slici 5.



**Slika 5. Metabolizam BBN-a.** Dva su osnovna metabolička puta kroz koje prolazi molekula BBN-a. Prvi podrazumijeva oksidaciju alkoholne u karboksilnu skupinu preko enzima iz skupine alkoholnih/aldehidnih dehidrogenaza čime nastaje karcinogeni BCPN. Drugi metabolički put ovisan je o glukuronidacijskom sustavu čime nastaje bezopasni i hidrofilni glukuronid BBN-a koji se dalje izlučuje žuči i urinom. Uz navedena dva metabolita, u mokraćnom mjehuru životinja koje su konzumirale BBN u vodi za piće, u malim koncentracijama mogu se detektirati produkti beta-oksidacije karboksilnih kiselina, međuprodukata u opisanom metaboličkom putu.

BBN - N-butil-N-(4-hidroksibutil)nitrozamin; BBN-G – BBN-glukuronid; BCPN - N-butil-N-(3-karboksipropil)nitrozamin; BCPN-G – BCPN-glukuronid; BHCPN - N-butil-N-(2-hidroksi-3-karboksi-propil)nitrozamin; BCMN - N-butil-N-(karboksimetil)nitrozamin; BOPN - N-butil-N-(2-oksopropil)nitrozamin

Preuzeto i prilagođeno prema: Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. *In Vivo*. 2012;26:727-39.



BBN je specifičan karcinogen jer inducira zloćudnu pretvorbu uroepitelnih stanica u mokraćnom mjehuru miševa i štakora (31). Metaboliti BBN-a putem krvi i urina dopijevaju u mokraćni mjehur (32) gdje se nakon alfa hidroksilacije oslobađa alkilna grupa koja se kovalentno veže za DNA molekulu (29). Brza indukcija neoplastičnog procesa na životinjskom modelu objašnjava se činjenicom da BBN unutar mokraćnog mjehura izaziva upalu što pokreće proces cijeljenja karakteriziran visokim stupnjem diobe stanica zbog čega je akumuliranje mutacija povezano s manjkavim procesom popravljivanja DNA (33). Na ovaj način nastaju brojna genetska oštećenja koja su dijelom slična oštećenjima u humanom raku mokraćnog mjehura, a od kojih se najčešće spominje mutacija u tumor supresorskom p53 genu, što osobito vrijedi za tumore visokog gradusa. Dokazane su i mutacije u protoonkogenima H-ras i EGFR kao i mikrosatelitska nestabilnost (34). Urotelijalne lezije inducirane BBN-om kod glodavaca služe kao eksperimentalni model za proučavanje mišićno-invazivnog humanog raka mokraćnog mjehura zbog međusobne morfološke, te velikim dijelom i molekularne sličnosti. Spektar lezija koje se induciraju na ovaj način je širok i uključuje hiperplaziju, displaziju, papilarni tumor, neinvazivni i invazivni rak (33). Štoviše, spektar lezija ovisi o vrsti eksperimentalne životinje, trajanju tretmana BBN-om, dobi i spolu životinje. Prosječno trajanje tretmana BBN-om (udio BBN-a 0,05%) potrebno da bi se kod eksperimentalne životinje razvila makroskopska lezija iznosi oko 12 tjedana za miševe, odnosno 20 tjedana za štakore (32,35). Obzirom da se radi o *in vivo* karcinogenezi, ovakvi modeli neoplastičnih lezija osiguravaju intaktan patološki i imunološki odgovor unutar tkiva što omogućava proučavanje biologije i liječenja raka mokraćnog mjehura sofisticiranim metodama i s više aspekata kao što su genetički, molekularni i patohistološki (32).

### **1.3.2. Dosadašnje spoznaje o utjecaju BBN-a na ekspresiju gena iz obitelji Ugt**

O modulatornom djelovanju BBN-a kao ksenobiotika na aktivnost glukuronidacijskog sustava u metabolički aktivnim tkivima zna se vrlo malo. Najviše je, s obzirom na njegovu eksperimentalnu upotrebu, proučavana njegova uloga u regulaciji glukuronidacijskog kapaciteta uroepitelnih stanica mokraćnog mjehura. Dokazano je da karcinogeni metaboliti BBN-a opisani u dijelu 1.3.1. negativno djeluju na lokalnu ekspresiju gena iz obitelji Ugt i na katalitičku aktivnost njihovih enzimskih produkata. Posljedično su stanice prijelaznog epitela mokraćnog mjehura kontinuirano izložene štetnom djelovanju tih kemikalija (30). Detaljnim pregledom literature ne pronalaze se studije s uvjerljivim dokazima o utjecaju BBN-a na izražaj gena za enzime glukuronidacije u tkivima koja sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika – jetri, crijevima i bubregu. S obzirom da BBN nakon oralnog unosa prvo dolazi u kontakt s

glukuronidacijskim sustavom crijeva, a poslije i s glukuronidacijskim sustavima jetre i bubrega postavlja se pitanje o podložnosti ekspresije gena skupine Ugt u spomenutim tkivima regulacijskim utjecajima ove kemikalije.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. Ciljevi istraživanja**

1. Usporediti bazalnu ekspresiju gena *Ugt1a* u bubregu, duodenumu i jejunumu miša s izražajem u jetri, tzv. pozitivna kontrola, i izražajem u skeletnom mišiću (negativna kontrola).
2. Odrediti utječe li tretman BBN-om na izražaj gena *Ugt1a* u metabolički važnim tkivima miša.
3. Odrediti mijenja li se izražaj gena iz skupine *Ugt* u mokraćnom mjehuru miševa tretiranih BBN-om s istovremenom redukcijom mikrobiote antibioticima u usporedbi s miševima koji su konzumirali samo BBN.
4. Odrediti izoforme gena iz skupine *Ugt* čiji je izražaj promijenjen u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo mokraćnog mjehura miša.

## **2.2. Hipoteze istraživanja**

1. Tretman BBN-om, dokazanim urotelnim karcinogenom, povećat će izražaj obitelji gena *Ugt1a* u metabolički važnim tkivima miša – jetri, bubregu i tankom crijevu.
2. U mokraćnom mjehuru miševa tretiranih BBN-om s istovremenom redukcijom mikrobiote antibioticima izražaj gena skupine *Ugt* bit će smanjen.
3. U mišjem modelu raka mokraćnog mjehura induciranog BBN-om izražaj gena skupine *Ugt* bit će smanjen.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Protokol istraživanja**

#### **3.1.1. Akutni tretman BBN-om**

Eksperiment je proveden na miševima soja C57BL/6J starosti 6-8 tjedana. Životinje su podijeljene u dvije skupine, eksperimentalnu i kontrolnu. Eksperimentalna skupina (N=4) bila je izložena dvotjednom tretmanu BBN-om otopljenim u vodi za piće (udio BBN-a 0,05%). Životinje iz kontrolne skupine (N=3) uzgajane su u istim uvjetima kao i one iz eksperimentalne, osim što nisu tretirane BBN-om. Žrtvovanje životinja izvršeno je odmah po završetku tretmana. Nakon žrtvovanja, izvršeno je prikupljanje tkiva od interesa, i to: jetre, bedrenog mišića, duodenuma, jejunuma i bubrega. Istraživanje je provedeno po etičkom odobrenju URBROJ: 525-10/0543-20-3, Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, od 18. 6. 2020. godine. Tretiranje i manipuliranje životinja provodile su osposobljene osobe, tj. mentor diplomskog rada i njegovi suradnici. Uzorci tkiva prebačeni su u tubice s otopinom RNA Later (SIGMA Life Science, St. Louis, Missouri, USA) u svrhu stabilizacije RNA u tkivu, nakon čega su smrznuti u tekućem dušiku. Smrznuti uzorci su kasnije korišteni za izolaciju mRNA koja je poslužila kao supstrat za qRT-PCR reakciju.

#### **3.1.2. Akutni tretman BBN-om i antibioticima**

U svrhu proučavanja utjecaja mikrobiote na ekspresiju gena iz skupine Ugt u miševa tretiranih BBN-om, analizirani su rezultati RNA sekvenciranja tkiva mokraćnog mjehura izoliranih iz miševa koji su bili na akutnom tretmanu BBN-om i antibioticima širokog spektra. Ti rezultati ustupljeni su ljubaznošću dr. sc. Blanke Roje, a izrađeni su u sklopu njezine doktorske disertacije.

Tijekom ovog pokusa, miševi soja C57BL/6J i starosti šest tjedana podijeljeni su u dvije skupine, prvu koja je bila tretirana antibioticima i BBN-om (AB skupina) i drugu koja je bila tretirana samo BBN-om (B skupina). AB skupina je tijekom dva tjedna pila antibiotike širokog spektra s ciljem smanjenja broja bakterija prije početka tretmana BBN-om. Potom je sljedeća dva tjedna pila i antibiotike širokog spektra i BBN zajedno. B skupina je prva dva tjedna konzumirala čistu vodu za piće, a druga dva tjedna BBN otopljen u vodi za piće. Tretman je za obje skupine trajao ukupno četiri tjedna, nakon čega je izvršeno žrtvovanje i uzorkovanje mokraćnog mjehura. Iz uzorkovanog tkiva izolirana je mRNA koja je podvrgnuta RNA sekvenciranju. Sekvenciranje je napravljeno na tri skupna uzorka za svaku istraživanu grupu (B i AB). Uzorci su sadržavali jednaku količinu RNA izolirane iz dvije životinje. Na ovaj način sekvencirana je RNA izolirana iz ukupno dvanaest životinja, po šest iz svake skupine (B i AB)

(36). Ovdje navedeni postupci provedeni su u sklopu projekta „Uloga mikrobiote u razvoju tumora mokraćnog mjehura“, a za potrebe ovog diplomskog rada analiziran je izražaj gena glukuronidacijskog sustava.

### **3.1.3. Kronični tretman BBN-om**

U svrhu proučavanja promjena u ekspresiji gena Ugt u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura analizirani su rezultati RNA sekvenciranja tkiva mokraćnog mjehura izoliranih iz miševa koji su bili na kroničnom tretmanu BBN-om. Ti podatci ustupljeni su ljubaznošću doc. dr. sc. Marine Degoricije, a izrađeni su u sklopu njezine doktorske disertacije (33).

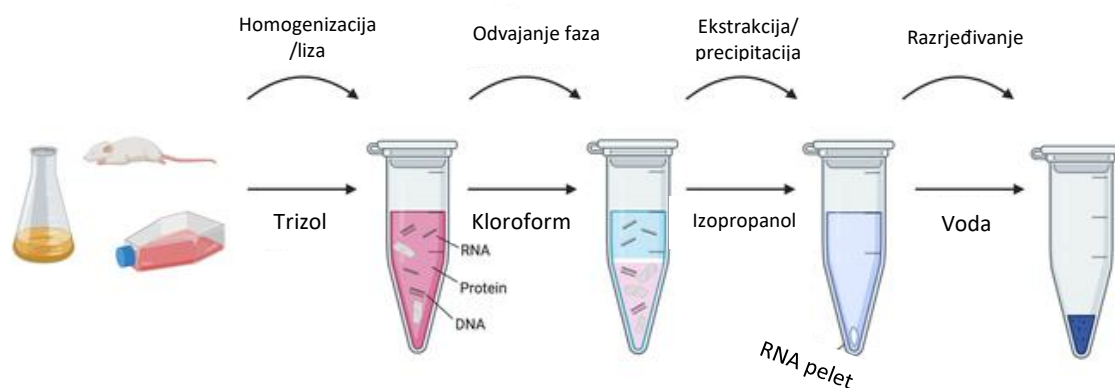
U ovom eksperimentu, devet mužjaka soja C57BL/6J starosti 6-8 tjedana bilo je izloženo kroničnom tretmanu BBN-om (udio BBN-a 0,05%) otopljenom u vodi za piće u trajanju od 12 tjedana, što je vrijeme u kojem se očekuje indukcija tumora mokraćnog mjehura (35). U kontrolnoj skupini bilo je također devet mužjaka istog soja i starosti, uzgajanih u jednakim uvjetima, ali koji u navedenom periodu nisu bili na tretmanu BBN-om, već su konzumirali čistu vodu. Žrtvovanje svih životinja izvršeno je istovremeno, 20 tjedana od početka tretmana. U periodu od kraja tretmana do žrtvovanja (osam tjedana), životinje iz eksperimentalne skupine konzumirale su čistu vodu. Nakon žrtvovanja, uzorkovani su mokraćni mjehuri miševa. Iz tkiva mokraćnog mjehura izolirana je mRNA koja je podvrgnuta RNA sekvenciranju. Sekvenciranje je napravljeno na tri skupna uzorka za svaku istraživanu grupu (BBN i kontrolnu). Uzorci su sadržavali jednaku količinu RNA izolirane iz tri životinje. Na ovaj način sekvencirana je RNA izolirana iz ukupno osamnaest životinja, po devet iz svake skupine (BBN i kontrolna).

### **3.2. Izolacija tkivne mRNA**

Nakon odmrzavanja, uzorci tkiva prebačeni su u tubice Hard tissue homogenizing CK28 (Bertin Minilys Technologies, Montigny-le-bretonneux, Ile-de-France, France) u koje je prethodno dodano 500  $\mu$ L TRIzol Reagens (AMBION Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Homogenizacija uzoraka izvršena je na uređaju Bertin (Minilys Technologies, Montigny-le-bretonneux, Ile-de-France, France). U vorteksirane uzorke koji su nakon homogenizacije ostavljeni na sobnoj temperaturi pet minuta, dodano je 100  $\mu$ L kloroforma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Nakon ponovnog vorteksiranja i stajanja na sobnoj temperaturi tri minute, uzorci su centrifugirani na 12000 g tijekom petnaest minuta na temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, u eksperimentalnoj smjesi formirane su tri faze: donja, crvenkasta koja sadrži proteine, središnji, bijeli prsten koji sadrži DNA i gornja,



vodenasta koja sadrži RNA. Gornja faza je potom prebačena u drugu tubicu u koju je dodano 125  $\mu\text{L}$  izopropanola (EMSURE, London, Ujedinjeno Kraljevstvo). Smjesa je ponovno vorteksirana i ostavljena na sobnoj temperaturi deset minuta nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na 12000 g tijekom deset minuta na 4 °C. Rezultat drugog centrifugiranja je formiranje RNA peleta koji je zalijepljen na dnu tubice. Vodenasti supernatant je aspiriran, a u tubicu s peletom je dodano 250  $\mu\text{L}$  etanola (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). Smjesa je ponovno centrifugirana, ovaj put na 7500 g tijekom pet minuta na 4 °C. Nakon što je supernatant ponovno uklonjen, tubica s peletom ostavljena je na sobnoj temperaturi sve dok se u potpunosti nije osušila. Potom je pelet razrjeđen u 20  $\mu\text{L}$  vode očišćene od enzima koji razgrađuju RNA. Opisani protokol izolacije RNA iz tkiva prikazan je na slici 6. Koncentracija izolirane RNA provjerena je spektrofotometrijskom analizom (NanoDrop spectrophotometer, NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, USA). Čistoća uzoraka provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu.



**Slika 6. Postupak izolacije mRNA iz tkiva.**

Preuzeto i prilagođeno prema: Add Gene [Internet]. Watertown, MA, SAD: Add Gene. RNA extraction without a kit; 2020 [citirano 3. srpnja 2023]. Dostupno na: <https://www.addgene.org/protocols/kit-free-rna-extraction/>

### 3.3. Sinteza cDNA

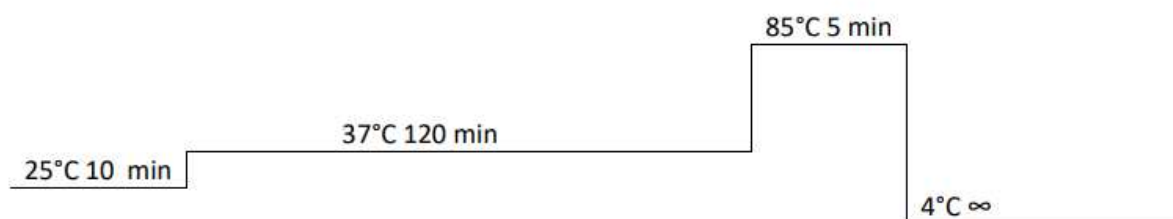
Reverzna transkripcija-PCR (RT-PCR) je metoda sinteze komplementarne DNA (cDNA) iz prethodno izolirane tkivne mRNA (37).

Kemikalije korištene u sintezi cDNA i njihovi volumeni prikazani su u tablici 1. Temperaturni program na PCR uređaju (Arktik Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) korišten za RT-PCR reakciju shematski je prikazan na slici 7.

1  $\mu\text{g}$  dobivene mRNA u 20  $\mu\text{L}$  smjese pretvoren je u cDNA upotrebljujući *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

**Tablica 1.** Popis komponenti i njihovih volumena korištenih za RT-PCR reakciju.

Komponenta	V (reakcija)/ $\mu\text{L}$
10x RT buffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNAse Inhibitor	1,0
Nuclease free H <sub>2</sub> O	3,2
Ukupno	10



**Slika 7.** Temperaturni program u PCR uređaju korišten za sintezu cDNA.

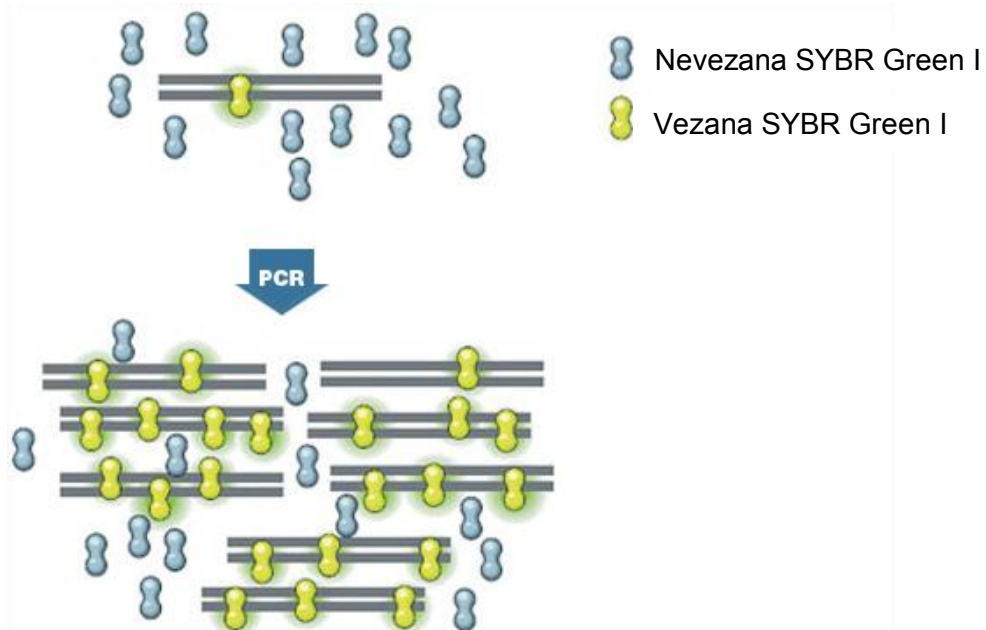
### 3.4. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

#### 3.4.1. Princip qRT-PCR reakcije

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda brzog umnažanja ciljnih dijelova DNA. Reakcijska smjesa sastoji se od: DNA predloška čiju sekvencu je potrebno umnožiti, početnica koje su komplementarne krajevima ciljne DNA sekvence, deoksinukleotid trifosfata (dNTP) koji su supstrati za DNA polimerazu i termostabilne DNA polimeraze. Umnažanje se postiže u PCR aparatu (engl. *thermal cycler*) koji ciklično mijenja temperaturu reakcijske okoline čime se postižu tri osnovne faze reakcije: denaturacija, hibridizacija početnica s komplementarnim dijelovima DNA (engl. *annealing*) i polimerizacija nukleotida koju katalizira enzim DNA polimeraza (engl. *extension*). Kada je cilj

umnožiti RNA, koristi se prilagođena PCR reakcija koja je spregnuta s reverznom transkripcijom (RT-PCR) kojom se iz RNA dobije kopija DNA (engl. *copy DNA*, cDNA) (38).

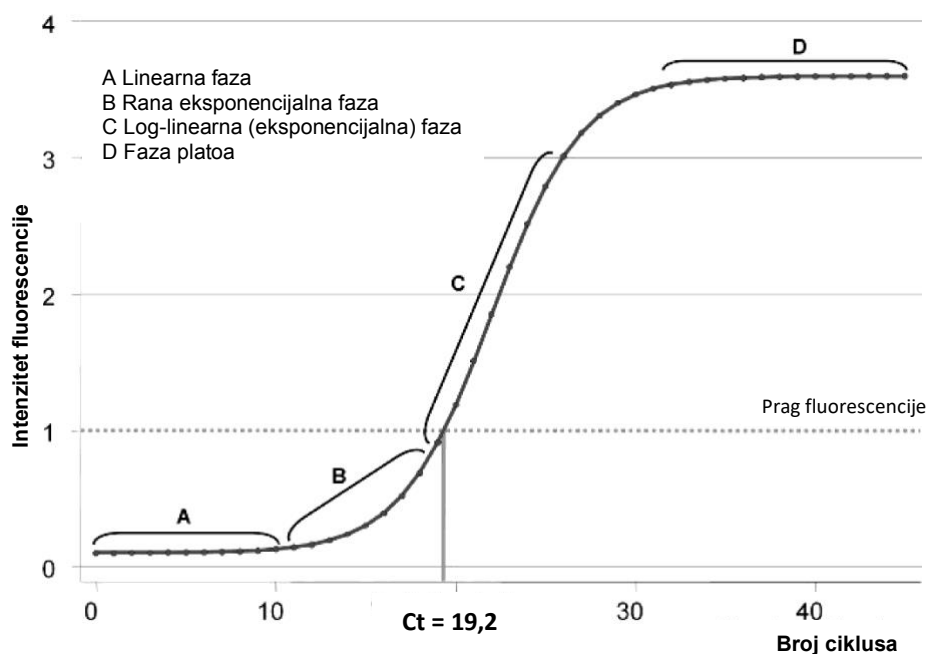
Cilj proučavanja ekspresije gena je kvantifikacija mRNA nekog gena, koja je izolirana iz tkiva. U te svrhe danas se najčešće koristi kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR). qRT-PCR je metoda koja objedinjuje amplifikaciju i detekciju količine umnožene cDNA u određenom vremenskom trenutku, odnosno PCR ciklusu. Amplifikacija se temelji na prethodno opisanoj PCR reakciji u kojoj je predložak cDNA koja je dobivena reverznom transkripcijom iz izolirane tkivne mRNA. Detekcija je korak koji omogućuje kvantifikaciju umnožene cDNA. Postoji više načina detekcije, a u ovom istraživanju korištena je najdostupnija metoda bojenja umnožavane DNA fluorescentnim bojama. Najčešće korištena boja je SYBR Green I. Kada se boja doda u reakcijsku smjesu i počne amplifikacija cDNA, dolazi do nespecifičnog vezanja same boje za umnoženu dvostruku DNA zbog čega se pojavljuje fluorescencijski podražaj (Slika 8). Kako amplifikacija napreduje, sve je više molekula boje vezane za umnoženu DNA što znači da je fluorescencijski signal napredovanjem PCR reakcije sve intenzivniji (39).



**Slika 8. Detekcija umnožene cDNA u qRT-PCR reakciji posredovana fluorescirajućim bojama koje se vežu za DNA.** SYBR Green I boja nevezana za DNA ne fluorescira. Kako se u reakcijskoj smjesi povećava koncentracija umnožene DNA, boja se veže za DNA dolazi do fluorescencije. Kako amplifikacija napreduje, intenzitet fluorescencije se pojačava.

Preuzeto i prilagođeno prema: Bio Rad [Internet]. Dubai, Ujedinjeni Arapski Emirati: Bio Rad Laboratories. SYBR Green qPCR supermixes; 2023 [Citirano 3. srpnja 2023]. Dostupno na: <https://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html>

U ovom istraživanju qRT-PCR reakcija izvedena je u dva koraka. Tijekom prvog koraka je iz izolirane tkivne mRNA procesom reverzne transkripcije pomoću reverzne transkriptazesintetizirana cDNA. U drugom koraku dobivena cDNA podvrgnuta je amplifikaciji i detekciji na način kako je prethodno opisano. Konačni rezultat je amplifikacijska krivulja koju shematski prikazuje slika 9. Razlikuju se četiri faze: linearna, rana eksponencijalna, log-linearna (eksponencijalna) i faza platoa. Već je spomenuto da detekcija podrazumijeva određivanje količine umnožene DNA u određenom vremenskom trenutku. Taj vremenski trenutak, odnosno PCR ciklus, određen je točkom na krivulji u kojoj fluorescentni signal prijeđe prag fluorescencije (engl. *threshold*) koji se izračunava uzimajući u obzir činjenicu da je količina amplificirane DNA tijekom eksponencionalne faze proporcionalna količini kalupne DNA na početku reakcije. PCR ciklus u kojem fluorescencijski signal prijeđe prag fluorescencije naziva se Ct vrijednost (engl. *cycle threshold*). Niže Ct vrijednosti znače da je fluorescencijski prag prijeđen u nižim PCR ciklusima, što ukazuje da je količina početne DNA bila veća (39).



**Slika 9. PCR amplifikacijska krivulja.** Faze amplifikacijske krivulje označene su slovima A-D. Siva isprekidana vodoravna linija označava prag fluorescencijskog signala (engl. *threshold*). Trenutak u kojem koncentracija amplikona (PCR produkta) postane dovoljna da fluorescencijski signal dosegne prag označen je s Ct (engl. *cycle threshold*). Na ovom primjeru, prag fluorescencijskog signala dosegnut je u periodu oko 19.2 PCR ciklusa.

Preuzeto i prilagođeno prema: Caraguel CG, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23:2-15.

Kako bi rezultati qRT-PCR reakcije bili što pouzdaniji, poseže se za relativnom metodom kvantifikacije, odnosno usporedbom ekspresije ciljnog gena s endogenom kontrolom koja se naziva referentni ili *housekeeping* gen. Smatra se da su referentni geni, od kojih se najčešće koriste aktin, ubikvitin i ribosomalni geni, stalno i intenzivno izraženi u tkivima zbog čega se ova strategija smatra najboljom za standardizaciju podataka dobivenih tom metodom mRNA kvantifikacije (40). U ovom istraživanju su se kao referentni geni koristili ribosomalni gen *Rpl16* za kontrolu ekspresije gena *Ugt1a* u bedrenom mišiću, jetri, duodenumu i jejunumu i ribosomalni gen *Rps23* za kontrolu ekspresije gena *Ugt1a* u bubregu.

### 3.4.2. Priprema qRT-PCR reakcije

Ploča koja se stavlja u qRT-PCR aparat (BioRad CFX96 Real-Time System, Hercules, CA, USA) sastojala se od 96 jažica. U svaku jažicu stavljeno je ukupno 15  $\mu$ L smjese koja se sastojala od 12  $\mu$ L MIX-a i 3  $\mu$ L cDNA. Svi uzorci rađeni su u duplikatima. Komponente MIX-a i njihovi volumeni prikazani su u tablici 2. Popis početnica korištenih u ovom istraživanju prikazan je u tablici 3.

**Tablica 2.** Popis komponenti i njihovih volumena korištenih za qRT-PCR reakciju.

<b>Komponenta</b>	<b>Volumen/<math>\mu</math>L</b>
SYBR Green	7,5
Forward početnice	0,75
Reverse početnice	0,75
H <sub>2</sub> O	3,0
Ukupno MIX-a	12,0
Uzorak cDNA	3,0
<b>UKUPNO:</b>	<b>15,0</b>

**Tablica 3.** Popis početnica korištenih za qRT-PCR reakciju. Prikazani su sljedovi nukleotida *forward* (F) i *reverse* (R) početnica. Oznaka „m“ prije naziva početnice označava da su ove početnice namijenjene za analizu mišjih gena. Sve početnice kupljene su od istog proizvođača: Microsynth, Balgach, Sankt Gallen, Switzerland.

DNA Oligo Name	DNA sekvenca (5' – 3')
mUgt1auk F	CCCAAAATGATCTGCTTGGTCA
mUgt1auk R	CTGATCGCCAAATAGGGGCA
mRps23 F	AATGCCTTGTGGGTCCTTCC
mRps23 R	CACGACACTTGCCCATCTTG
mRpl16 F	AATTTTGGCACTTGCGGGTG
mRpl16 R	AGTGATGGGCTTGAAAGGGG

Nakon dodavanja smjese MIX-a i cDNA u jažice, na ploču je pažljivo naliježena folija koja sprječava isparavanje smjese iz jažica tijekom zagrijavanja u qRT-PCR uređaju. Prije nego je stavljena u aparat, ploča je centrifugirana na 2000 okretaja tijekom 3 minute na 4 °C. Temperaturni program korišten za reakciju prikazan je na slici 10.



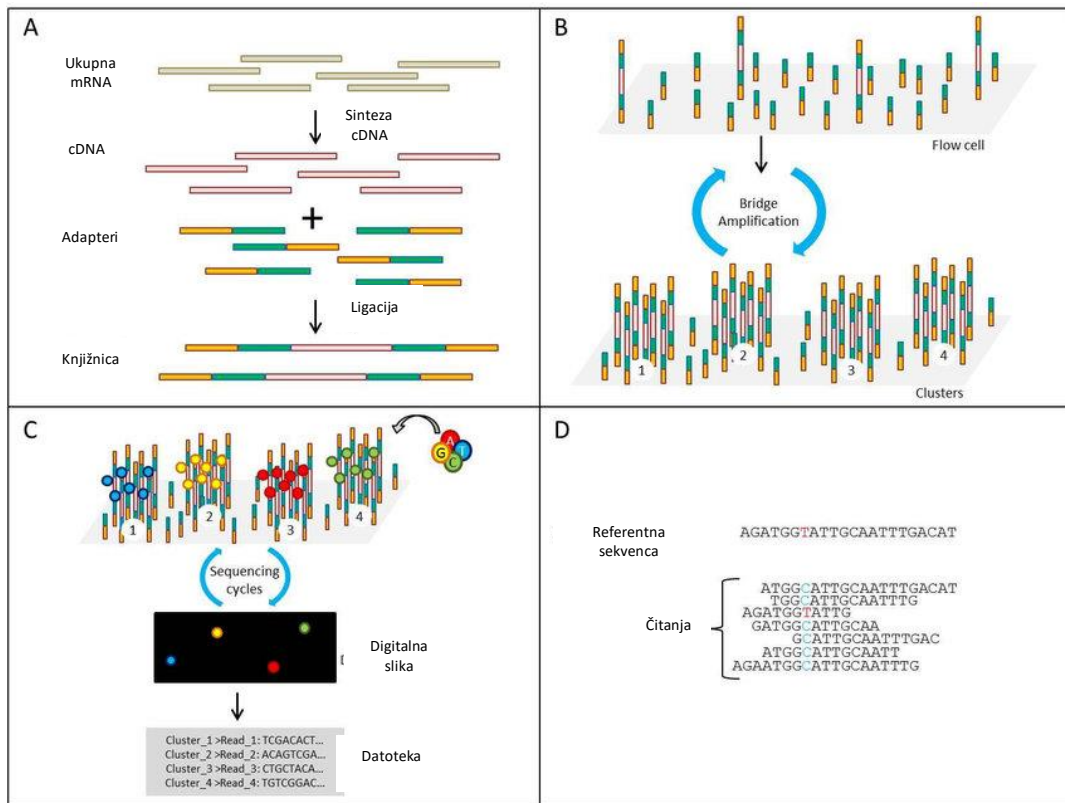
**Slika 10. Temperaturni program korišten u qRT-PCR uređaju.** qRT-PCR uređaj programiran je na način da u prvom dijelu (A) ciklički mijenja temperaturu i amplificira ciljane DNA. U drugom dijelu (B), nakon što je PCR reakcija završena, a ciljane DNA umnožene, uređaj ponovno povećava i smanjuje temperaturu s ciljem razdvajanja lanaca umnožene DNA i nastanka jednostrukih DNA disociranih od molekula boje. Na ovaj način dobiju se krivulje taljenja (engl. *melting curve*) koje moraju biti identične za sve produkte. Ako krivulja taljenja nije ista za sve produkte, postoji mogućnost nespecifičnog umnažanja DNA ili je količina početne DNA bila premala zbog čega je došlo do nespecifičnog vezanja početnica međusobno i nastajanja tzv. *dimer-primer* kompleksa koji lažno povisuju fluorescentni signal.

### 3.5. RNA sekvenciranje

Sekvenciranje nove generacije (engl. *next generation sequencing*) naziv je za grupu modernih tehnologija koje se upotrebljavaju za određivanje slijedova nukleotida u cijelom genomu, transkriptomu ili dijelovima DNA ili RNA od interesa (41).

RNA sekvenciranje (engl. *RNA sequencing*) je metoda određivanja slijedova nukleotida u svim RNA molekulama prisutnim u uzorku. Za analizu promjena u izražaju pojedinačnih gena koristi se sekvenciranje transkriptoma, odnosno određivanje slijedova nukleotida u ukupnoj mRNA prisutnoj u tkivu koje se istražuje. Iako se naziva RNA sekvenciranje, ovaj postupak se najčešće temelji na određivanju slijedova nukleotida u kopiji DNA (cDNA) jer je biološki stabilnija i pogodnija za amplifikaciju (42).

Prvi korak nakon izolacije tkivne mRNA je njezina fragmentacija. Na ovaj način se velika molekula mRNA usitnjava u manje dijelove pogodne za daljnju analizu. Fragmentaciju uvjetuje analitička platforma koja je odabrana da izvrši sekvenciranje izoliranog materijala. Fragmentirana mRNA se zatim prevodi u cDNA kojoj se dodaju adaptori koji će omogućiti očitavanje slijedova nukleotida sekvencirajućim tehnologijama (42). Na taj se način formira RNA knjižnica koja se može obogatiti poliadenilatnim slijedovima (engl. *poly-A enrichment*). Svrha obogaćivanja RNA knjižnice poliadenilatnim slijedovima je selekcija protein-kodirajuće RNA, odnosno uklanjanje neželjenih, manjih RNA molekula (uglavnom ribosomalne RNA) koje mogu biti izvor pogreške pri analizi rezultata RNA sekvenciranja (43). Tako formirana knjižnica očitava se sekvencirajućim tehnologijama. Očitani fragmenti sjedinjuju se u FASTQ tekstualnu datotetku koja se dalje sravnjuje (engl. *alignment*) s referentnim transkriptomom i kvantificira pomoću različitih algoritama (44). RNA sekvenciranje shematski je prikazano na slici 11.



**Slika 11. Princip sekvenciranja RNA.** **A** Fragmenti mRNA se nakon prevođenja u cDNA obogaćuju sekvencirajućim adapterima čime se formira RNA knjižnica. **B** Umnažanje RNA knjižnice. **C** Na temelju označavanja radioaktivnim dušičnim bazama, sekvencirajuće tehnologije očitavaju sljedove nukleotida u umnoženim molekulama iz knjižnice čime se formira FASTQ datotetka. **D** Očitani sljedovi nukleotida iz FASTQ datoteke sravnjuju se s referentnom sekvencom na temelju položaja određenih nukleotida čime se omogućava kvantifikacija ekspresije analiziranih gena. Poslije se ti podaci iskorištavaju kao baza za analizu biostatističkim algoritmima koji daju informacije o različitim izražaju gena.

Preuzeto i prilagođeno prema: Juarez Paulo. Regulatory mechanisms of mexEF-oprN efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: from mutations in clinical isolates to its induction as response to electrophilic stress. Mjesto publiciranja: Universite Bourgogne Franche-Comte; 2017.

RNA sekvenciranje provedeno je metodom *Illumina*. Provele su ga tvrtke Applied Biological Materials (ABM) Inc. (Richmond, B.C. Canada) za mokraćne mjehure izolirane iz životinja na kroničnom tretmanu BBN-om i Novogene (Peking, Kina) za mokraćne mjehure izolirane iz životinja na akutnom tretmanu BBN-om i antibioticima širokog spektra. Zatraženo je po 40 milijuna čitanja s jednog kraja nakon što je RNA knjižnica obogaćena s RNA koja sadrži poliadenilatne sljedove. *TopHat* algoritam korišten je za sravnjavanje dobivenih sljedova čitanja s transkriptomom miša. Količine pojedinih transkripata u uzorcima mokraćnog mjehura iz istraživanih skupina određene su *Cufflink* algoritmom. Diferencijalna analiza zastupljenosti transkripata gena među skupinama napravljena je *Cuffdiff* algoritmom.



### 3.6. Obrada podataka

qPCR metodom mjerene su relativne promjene izražaja gena *Ugt1a*. Podatci su dobiveni relativnom kvantifikacijom u odnosu na izražaj referentnih gena *Rpl16*, odnosno *Rps23*. Pri obradi podataka korištena je metoda usporedbe  $C_t$  vrijednosti(45).

U prvom koraku izvršena je normalizacija ciljnog gena (*Ugt1auk*) u odnosu na referentni gen (REF.GEN) čime je izračunata  $\Delta C_t$  vrijednost:

$$(I) \quad \Delta C_{tCTRL} = C_{tUgt1auk} - C_{tREF.GEN}.$$

Dobivene  $\Delta C_t$  vrijednosti za pojedinačne uzorke (BBN) su potom uspoređene s prosječnom  $\Delta C_t$  vrijednosti kontrolne skupine (CTRL) čime je izračunata  $-\Delta\Delta C_t$  vrijednost:

$$(II) \quad -\Delta\Delta C_t = -(\Delta C_{tBBN} - \Delta C_{tCTRL}).$$

Konačno, omjer količine gena od interesa (engl. *fold change*, FC) u tretiranoj u odnosu na kontrolnu skupinu proizišao je iz formule:

$$(III) \quad FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}.$$

Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilk testom. Obzirom da je potvrđena normalna distribucija podataka, rezultati su prikazani u obliku prosječnih vrijednosti sa standardnim devijacijama. Značajnost promjene izražaja gena među istraživanim skupinama određena je nesparenim t-testom. Razlike u bazalnoj ekspresiji gena među pojedinim tkivima određene su ANOVA testom (engl. *One Way Analysis of Variance*) s post-hoc Tukey testom. Svi uzorci rađeni su u duplikatima. Statistička obrada rezultata RNA sekvenciranja napravljena je u programskom jeziku „R“. Svi grafički prikazi i statistička obrada rezultata qPCR-a napravljeni su u programu GraphPad Prism7 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD). Izračun relativnih promjena izražaja gena napravljen je u programu Microsoft Office Excell 2021 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Promjena izražaja gena od interesa veća od 2 ( $FC > \pm 2$ ) i vrijednost  $P < 0,05$  smatrani su biološki, odnosno statistički, značajnima za sve rezultate dobivene u ovom istraživanju.

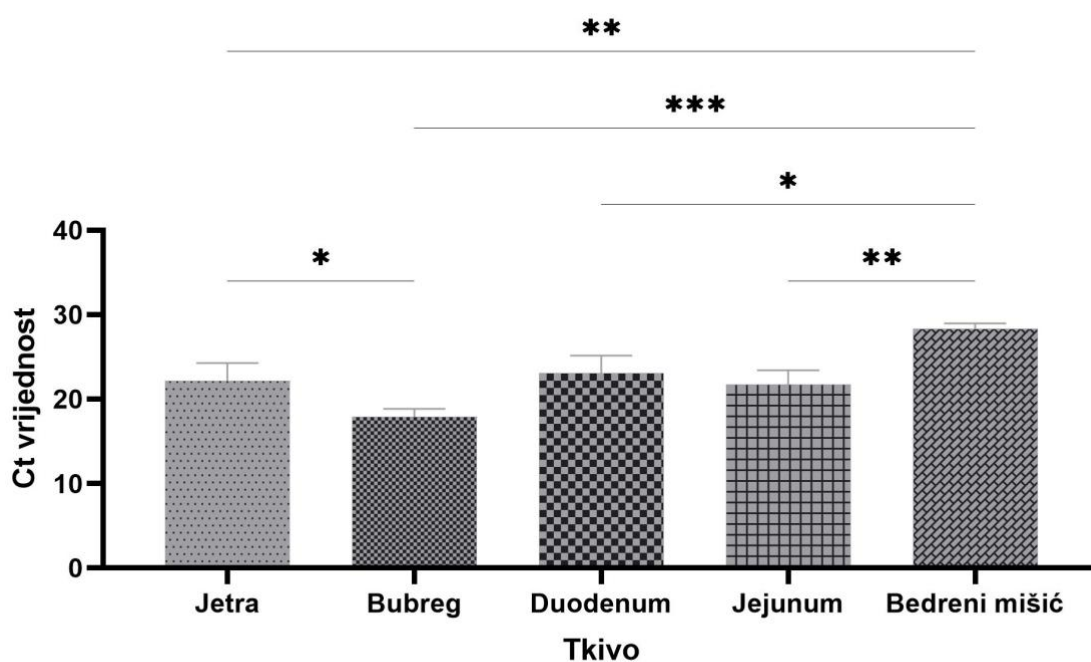
#### **4. REZULTATI**

#### 4.1. Bazalni izražaj gena Ugt1a

Uspoređen je bazalni izražaj gena Ugt1a u jetri, bubregu, duodenumu, jejunumu i bedrenom mišiću u netretiranih miševa (iz tzv. kontrolne skupine) (Slika 12). Bedreni mišić smatran je negativnom kontrolom jer je očekivan mali izražaj tog gena u mišićnom tkivu (visoka prosječna Ct vrijednost), a jetra je uzeta kao pozitivna kontrola s očekivanim velikim izražajem gena (niska prosječna Ct vrijednost). Analizom varijance dobije se statistički značajna razlika u bazalnom izražaju gena Ugt1a među istraživanim tkivima ( $P < 0,001$ ).

Post-hoc testovima, u usporedbi s bedrenim mišićem, statistički značajno veći bazalni izražaj gena Ugt1a pokazala su sva istraživana tkiva: jetra ( $P = 0,01$ ), bubreg ( $P < 0,001$ ), duodenum ( $P = 0,029$ ) i jejunum ( $P = 0,007$ ).

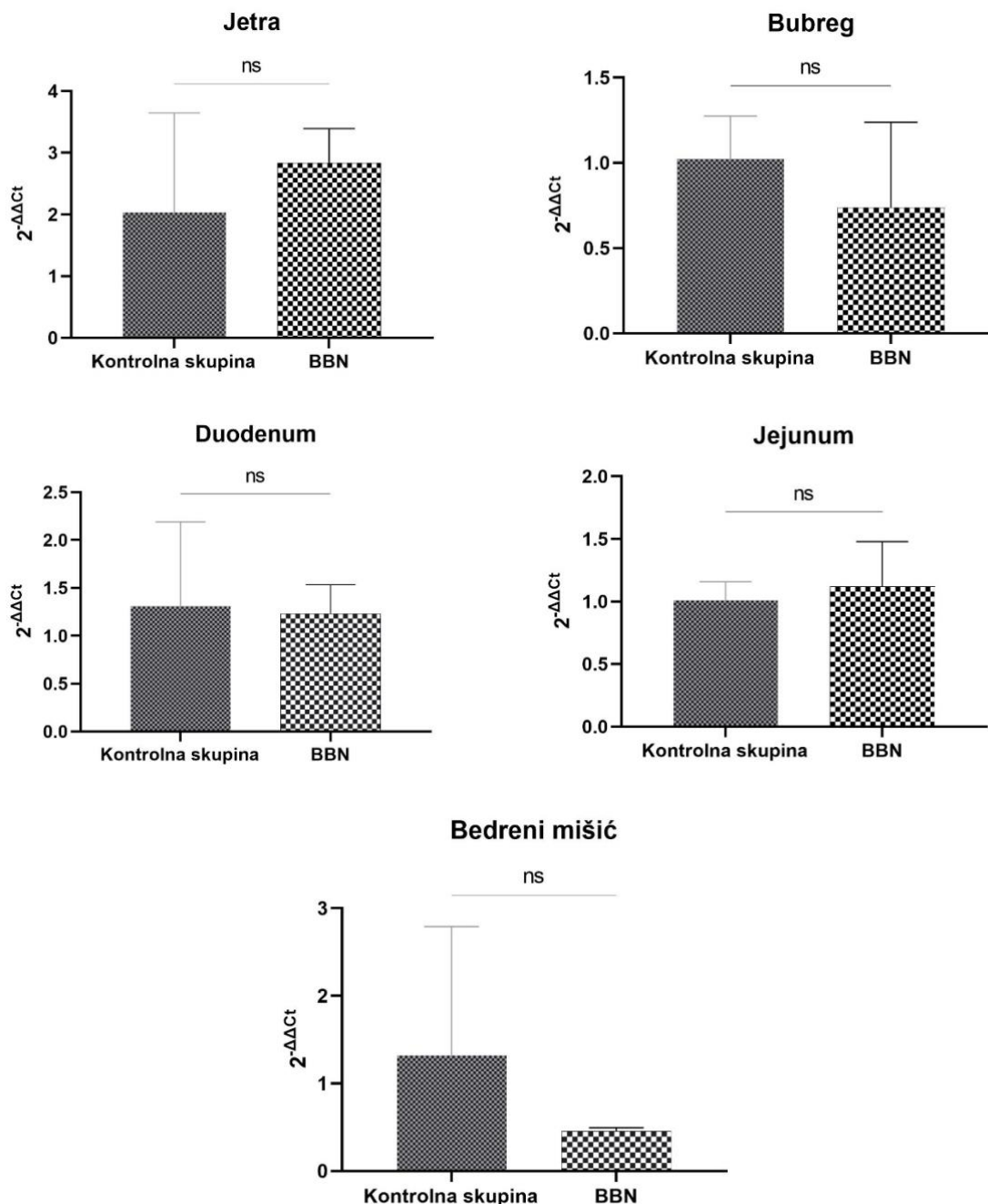
U usporedbi s jetrom, samo je bubreg pokazao statistički značajno veći izražaj gena Ugt1a ( $P = 0,047$ ).



**Slika 12. Bazalni izražaj gena Ugt1a mjereno qPCR-om u tkivima netretiranih miševa.** Razlike u izražaju gena određene su analizom varijance sa post-hoc Tukey testom. Prikazane su prosječne Ct vrijednosti za istraživana tkiva i njihove standardne devijacije. \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$

## 4.2. Utjecaj BBN-a na izražaj gena Ugt1a

Nije dokazana biološki ili statistički značajna promjena izražaja obitelji gena Ugt1a u tkivima miševa tretiranih BBN-om u odnosu na netretirane (Slika 13).

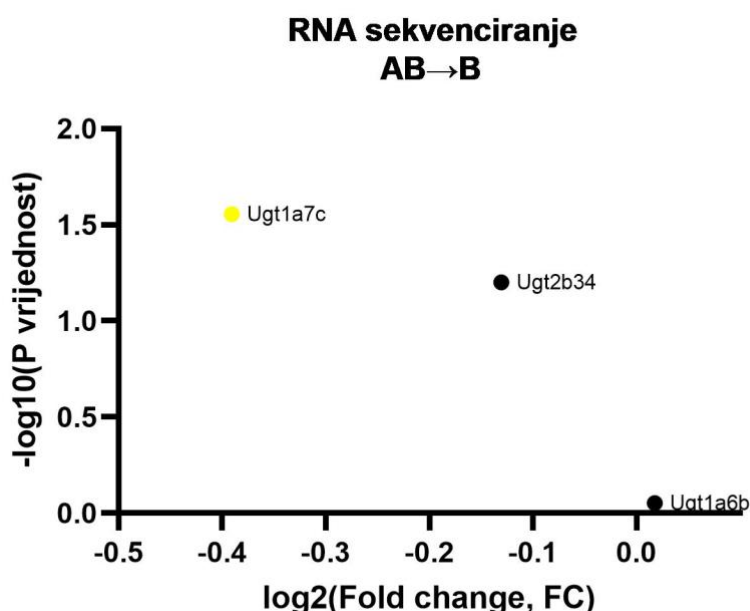


**Slika 13. Promjena izražaja gena Ugt1a mjerena qPCR-om u tkivima miševa akutno tretiranih BBN-om u odnosu na kontrolnu skupinu.** Prikazane su prosječne vrijednosti omjera količine gena od interesa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) i njihove standardne devijacije. Analiza je napravljena nesparenim studentovim t-testom. ns –  $P > 0,05$

### 4.3. Izražaj gena skupine Ugt u mokraćnom mjehuru miševa s reduciranom mikrobiotom i tretiranih BBN-om

Miševi akutno tretirani BBN-om i antibioticima (sekcija 3.1.2.) poslužili su kao eksperimentalni model za proučavanje potencijalnog utjecaja mikrobiote na profil gena iz obitelji Ugt eksprimiranih u mokraćnom mjehuru (Slika 14).

RNA sekvenciranjem transkriptoma izoliranog iz mokraćnog mjehura miševa tretiranih BBN-om i antibioticima (AB) u odnosu na one tretirane samo BBN-om (B) dobije se statistički značajno smanjen izražaj jedino gena Ugt1a7c ( $P=0,028$ ). Ipak, ta razlika nije prešla prag biološke značajnosti ( $FC < -2$ ).



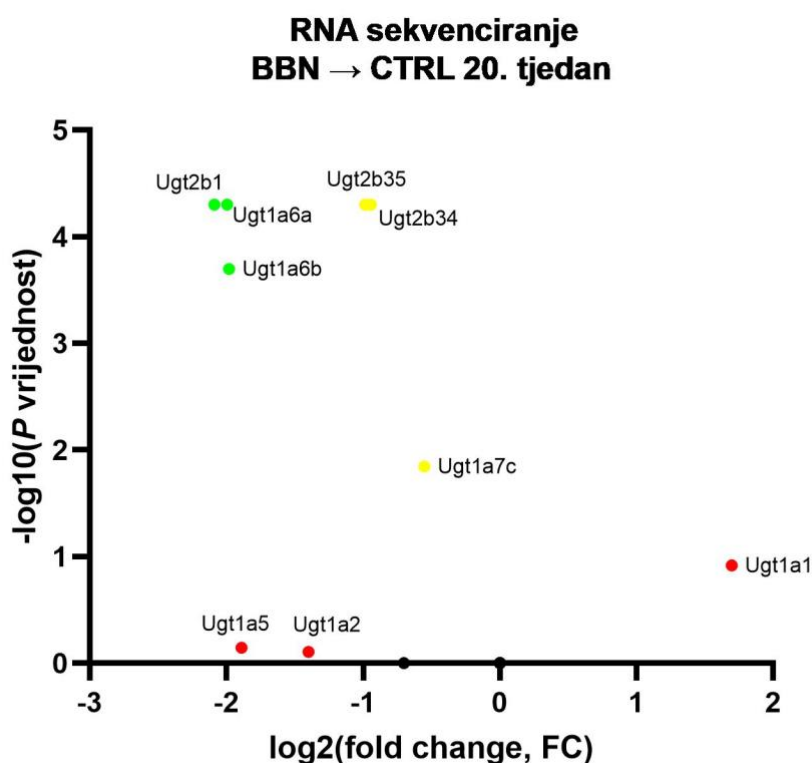
Slika 14. Odnos promjene (FC) i značajnosti izražaja ( $P$  vrijednost) gena skupine Ugt u mokraćnom mjehuru miševa s reduciranom mikrobiotom i tretiranih BBN-om (AB) u odnosu na miševe tretirane samo BBN-om (B). Prikazane su logaritamske FC i  $P$  vrijednosti. Žutom bojom označen je Ugt1a7c, jedini od gena iz skupine Ugt koji je statistički značajno promijenio ( $P < 0,05$ ) izražaj u AB u odnosu na B skupinu. Ta promjena nije bila biološki značajna ( $FC < -2$ ). Ostali geni, označeni crnom bojom, nisu prešli pragove statističke i/ili biološke značajnosti ( $P > 0,05$ ;  $FC < \pm 2$ ). Za najveći broj gena iz obitelji Ugt nije bilo moguće prilagoditi pojedinačne  $P$  vrijednosti zbog čega nisu prikazani na dijagramu.

#### 4.4. Izražaj gena skupine Ugt u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura

mRNA izolirana iz mokraćnih mjehura miševa koji su bili na kroničnom tretmanu BBN-om (sekcija 3.1.3.) podvrgnuta je RNA sekvenciranju (Slika 15).

Statistički značajno smanjen izražaj gena u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo mokraćnog mjehura pokazan je za šest Ugt gena: Ugt1a6a ( $P<0,001$ ), Ugt1a6b ( $P<0,001$ ), Ugt1a7c ( $P=0,039$ ), Ugt2b1 ( $P<0,001$ ), Ugt2b34 ( $P<0,001$ ), Ugt2b35 ( $P<0,001$ ). Od navedenih šest gena, tri su uz statistički značajnu promjenu pokazala i biološki značajno smanjen izražaj u tumorskom tkivu ( $FC>-2$ ): Ugt1a6a, Ugt1a6b i Ugt2b1. Najizraženiji je pad ekspresije za gen Ugt2b1.

Gen Ugt1a1 je jedini pokazao veću ekspresiju u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo mokraćnog mjehura. Ta je razlika bila biološki ( $FC>2$ ), ali ne i statistički značajna ( $P=0,121$ ).



**Slika 15. Odnos promjene (FC) i značajnosti izražaja ( $P$  vrijednost) *UGT* gena u tumorskom u odnosu na kontrolno tkivo mokraćnog mjehura miševa iz kroničnog BBN tretmana.** Prikazane su logaritamske FC i  $P$  vrijednosti. Zelena boja označava gene koji su pokazali statistički značajno promijenjen izražaj koji je prešao biološki prag ( $P<0,05$ ;  $FC>=2$ ). Žuta boja označava gene sa statistički značajnom promjenom izražaja koja ne prelazi prag biološke značajnosti ( $P<0,05$ ;  $FC<2$ ). Crvena boja označava gen koji je prešao biološki prag značajnosti, ali promjena izražaja nije bila statistički značajna ( $P>0,05$ ;  $FC>=2$ ). Svi ostali geni, označeni crnom bojom i neimenovani, nisu prešli pragove ni statističke ni biološke značajnosti ( $P>0,05$ ;  $FC<=2$ ) ili njihova ekspresija u mokraćnom mjehuru uopće nije bila zabilježena.

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Bazalni izražaj gena *Ugt1a*

Usporedili smo bazalni izražaj gena *Ugt1a* u jetri, bubregu, tankom crijevu i skeletnom mišiću. Zanimalo nas je postoji li razlika u izražaju tog gena u bubregu i djelovima tankog crijeva (duodenumu i jejunumu) u odnosu na jetru, koja se tradicionalno smatra glavnim glukuronidacijskim organom (12) i skeletni mišić za kojeg nismo pronašli dokaze o bitnijoj glukuronidacijskoj aktivnosti.

Naši rezultati su pokazali da je izražaj gena *Ugt1a* bio najmanji, iako ne u potpunosti zanemariv, u bedrenom mišiću. Ipak, kako su sva tkiva imala statistički značajno veći izražaj *Ugt1a* u odnosu na mišić (Slika 12), opravdana je odluka prema kojoj je to tkivo uzeto kao “negativna” kontrola pri usporedbi bazalnog izražaja spomenutog gena.

Zanimljivo je da su naši rezultati pokazali da je bazalni izražaj gena *Ugt1a* u jetri gotovo identičan izražaju u duodenumu ( $P=0,916$ ) i jejunumu ( $P=0,997$ ). Opisano se uklapa u rezultate prethodno provedenih istraživanja koja su ovaj rezultat osim mjerenjem izražaja gena, potvrdila i mjerenjem količine proteina (*western blot*), odnosno katalitičkih svojstava enzima (15,46). Jedna studija, koja je mjerila glukuronidaciju niza supstrata u mikrosomima izoliranim iz jetre i svih dijelova tankog crijeva (duodenum, jejunum i ileum), je štoviše pokazala da je glukuronidacijska sposobnost tankog crijeva veća nego glukuronidacijska sposobnost jetre (16). Pitanje glukuronidacijske aktivnosti tankog crijeva u odnosu na jetru ostaje složen problem uzimajući u obzir kontinuiranu izloženost oba organa mnogobrojnim ksenobiotičima, njihovu anatomiju i dimenzije te prisustvo mikrobioma u crijevima što je samo nekolicina faktora koji potencijalno doprinose izražaju gena iz obitelji *Ugt*. Naši rezultati, uklopljeni u rezultate postojećih, opsežnijih istraživanja, impliciraju da tanko crijevo ima značajanu glukuronidacijsku sposobnost. Ipak, za ovakve zaključke treba provesti druga ispitivanja koja će uzeti u obzir prethodno spomenute čimbenike.

Bubreg je, prema rezultatima ovog istraživanja, jedino tkivo koje je imalo statistički značajno veći bazalni izražaj *Ugt1a* u odnosu na jetru ( $P=0,047$ ). Iako je opisana razlika ograničena malim uzorkom, nismo prvi koji su primijetili da bubreg značajno doprinosi ukupnoj glukuronidaciji. Naime, rezultati istraživanja koje je imunohistokemijski određivalo izražaj gena *Ugt1a* u jetri, bubregu i dijelovima probavnog sustava, pokazali su da je imunoreaktivnost u dijelovima bubrega, posebno proksimalnom zavijenom kanaliću, značajno veća nego imunoreaktivnost u uzorcima jetre (15). S druge strane, rezultati RNA sekvenciranja transkriptoma bubrega i jetre ukazuju da jetra eksprimira puno širi spektar izoformi gena iz



obitelji Ugt što je čini relevantnijom od bubrega (14). Neovisno o razlikama u ekspresiji gena, nepobitna je činjenica da bubreg svojim glukuronidacijskim kapacitetom značajno uvjetuje uklanjanje ksenobiotika što je potvrđeno istraživanjima koja su određivala kemijsku kinetiku glukuronidacije u bubregu za razne lijekove (47,48).

## 5.2. Izražaj gena Ugt1a u odnosu na tretman BBN-om

Nitrozamini su davno identificirani kao glavni kemijski karcinogeni povezani s pušenjem (49). Većina su indirektni karcinogeni koji se nakon ulaska u organizam aktiviraju pretežno u jetri reakcijama oksidacije,  $\alpha$ -hidroksilacije i karbonilne redukcije. Time nastaju izrazito reaktivne alkilne molekule koje formiraju komplekse s DNA što uzrokuje brojne mutacije koje su osnova za razvoj raka (50). U ovu skupinu kemikalija spada i BBN, dokazani urotelijalni karcinogen koji se koristi za indukciju raka mokraćnog mjehura u eksperimentalnih glodavaca (35). Obzirom da se BBN, osim oksidacijom i  $\alpha$ -hidroksilacijom, metabolizira putem glukuronidacijskog sustava (32), zanimalo nas je utječe li ta kemikalija na izražaj gena Ugt1a u tkivima u kojima je glukuronidacija prethodno dokazana: jetri, bubregu i tankom crijevu (Slika 12) (14–16). Pregledom literature nismo pronašli istraživanja koja su proučavala promjenu izražaja gena iz skupine Ugt u spomenutim tkivima u odnosu na izloženost BBN-u.

Iako su naši rezultati pokazali da postoji blaga tendencija porasta izražaja gena Ugt1a u jetri nakon akutnog tretmana BBN-om, taj porast nije bio statistički značajan ( $P=0,383$ ) zbog čega smatramo da je potrebno provesti slično ispitivanje na većem uzorku mjereći uz izražaj gena i količinu, odnosno aktivnost enzima. Istraživanje koje se bavilo utjecajem dietilnitrozamina (DEN), kemikalije koja se eksperimentalno upotrebljava za indukciju raka jetre, na izražaj gena Ugt1a pokazalo je da akutna izloženost toj tvari statistički značajno povećava ekspresiju spomenutih gena u jetri (49). BBN je metabolit dibutilnitrozamina (DBN), koji je kao i DEN poznati jetreni karcinogen (32). Osim što su dokazani karcinogeni, BBN i DEN imaju snažan proinflamatorni učinak (33,51) te im se metabolizam svodi na oksidaciju i glukuronidaciju (32,52). Uzimajući u obzir navedene sličnosti, očekivali smo da će akutna izloženost BBN-u povećati jetrenu ekspresiju Ugt1a što bi se moglo protumačiti kao kompenzatorni mehanizam čija je svrha ubrzati nastajanje glukuronidiranog, netoksičnog metabolita i smanjiti količinu supstrata iz kojeg će oksidacijom nastati karcinogeni metabolit. Prema preglednom članku koji se bavi biotransformacijom urotelnih karcinogena u obzir treba uzeti i činjenicu da su neki glukuronidirani amini nestabilni u urinu zbog čega se brzo raspadaju čime se ponovno oslobađaju karcinogeni. Prema tome, postoji oprečno mišljenje da postoji

inverzna veza između jetrene glukuronidacije urotelnih karcinogena i aktivnosti procesa upale i nastanka raka u mokraćnom mjehuru. Ipak, čini se da opisano vrijedi za metabolite aromatskih amina, dok su metaboliti BBN-a u urinu stabilni (53).

Bubreg i tanko crijevo se uz jetru smatraju tkivima koja aktivno metaboliziraju ksenobiotike (2). Zbog velike površine sluznice, ksenobiotici se nakon oralne primjene najviše apsorbiraju u tankom crijevu nakon čega slijedi metabolička obrada i ekskrecija putem žuči ili urina (1). Prema našim spoznajama, ne postoje istraživanja koja su potvrdila glukuronidaciju BBN-a u drugim tkivima, osim u jetri i mokraćnom mjehuru (32). Kako su, osim jetre, bubreg i tanko crijevo tkiva sa značajnijim glukuronidacijskim potencijalom (14–16), pretpostavili smo da će akutni tretman BBN-om i u njima promijeniti izražaj gena *Ugt1a*. Suprotno očekivanom, naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu promjenu izražaja spomenutog gena u bubregu ( $P=0,413$ ), duodenumu ( $P=0,873$ ) i jejunumu ( $P=0,645$ ) miševa koji su bili na akutnom tretmanu BBN-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

Blago smanjenje izražaja gena *Ugt1a* u tretiranih u odnosu na netretirane miševe zamijećeno je u tkivu bedrenog mišića, iako ni ova razlika nije bila statistički značajna ( $P=0,345$ ). Glukuronidacijska aktivnost dosada je zabilježena jedino u srčanom mišiću (6), dok za skeletni mišić nije detaljnije ispitivana. Biološki doprinos ovog nalaza je upitan uzimajući u obzir veličinu uzorka te bazalni izražaj ovih gena u skeletnom mišiću (viša Ct vrijednost) zbog čega bi trebalo provesti opširnija ispitivanja koja će uključiti određivanje izražaja pojedinačnih izoformi gena iz skupine *Ugt* uz mjerenje količine i katalitičkih svojstava enzima.

### 5.3. Mikrobiota i izražaj gena skupine *Ugt*

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je definirati promjene izražaja gena iz skupine *Ugt* u odnosu na redukciju crijevne mikrobiote miša koja je postignuta antibioticima širokog spektra uz tretman BBN-om. Rezultati RNA sekvenciranja mokraćnog mjehura tako tretiranih miševa pokazali su statistički značajno smanjenje izražaja jedino gena *Ugt1a7c*.

Crijevne bakterije, virusi i gljivice koji formiraju mikrobiotu prvi su koji dolaze u kontakt s oralno primijenjenim ksenobioticima. Pregledni članak koji proučava ulogu mikrobiote u metabolizmu ksenobiotika opisuje da se izražaj enzima faze II metabolizma ksenobiotika značajno mijenja u odsustvu crijevnih bakterija. Većina istraživanja koje članak uzima u obzir pokazala je značajno smanjenje izražaja gena iz skupine *Ugt* u GF (engl. *germ free*) i SPF (engl. *specific pathogen free*) miševa. Vjeruje se da bakterije, iako nemaju glukuronidacijsku sposobnost, izlučuju metabolite koji reguliraju izražaj spomenutih gena.

Primjer su urolitini koji se, uz epigenetsku regulaciju, spominju kao važan čimbenik koji uvjetuje puno veću ekspresiju Ugt1a10 u crijevima u odnosu na jetru (54). Nije isključeno da ovakva vrsta regulacije posreduje izražaj gena Ugt1a7c u mokraćnom mjehuru. Ipak, ne možemo sa sigurnošću zaključiti je li zamijećena promjena izražaja Ugt1a7c posljedica djelovanja BBN-a ili redukcije mikrobiote zbog čega bi ovaj rezultat trebalo dodatno istražiti.

#### **5.4. Izražaj gena skupine Ugt u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura**

Sekvencirana je ukupna mRNA izolirana iz tumorskog tkiva mokraćnog mjehura miševa koji su bili na kroničnom tretmanu BBN-om (Slika 14). Otprije je poznato da urotel mokraćnog mjehura posjeduje znatan glukuronidacijski kapacitet za kojeg se vjeruje da varira u odnosu na izloženost karcinogenim kemikalijama. Paralelno s time, aktivnost upale, vjerojatnost i brzina nastanka raka mokraćnog mjehura vjerojatno ovise o genetskim varijacijama unutar gena iz obitelji Ugt poznatima kao SNP-ovi (engl. *single nucleotide polymorphisms*) (18). Rezultati ovog dijela našeg istraživanja ukazali su da postoji značajno smanjenje izražaja određenih izoformi gena koje kodiraju enzime glukuronidacijskog sustava u tumorskom u odnosu na kontrolno tkivo mokraćnog mjehura što sugerira da bi geni za spomenute enzime mogli imati specifičnu ulogu u urotelnoj karcinogenezi.

##### **5.4.1. Ugt1a6**

Mišji gen Ugt1a6, za razliku od ljudskog, ima dvije funkcionalne kopije nazvane Ugt1a6a i Ugt1a6b. Obzirom da su supstrati i tkivna distribucija navedenih gena identični (55), o njima ćemo raspravljati kao o jednom genu, Ugt1a6.

Ugt1a6 je primarno izražen u jetri, bubregu, crijevima, mozgu i mokraćnom mjehuru, a njegov enzimski ekvivalent metabolizira nekoliko supstrata od kojih su najspecifičniji paracetamol i serotonin. Pretpostavlja se da taj enzim metabolizira i neke kemijske karcinogene kao što su N-hidroksilirani amini. Pregled literature koji opisuje funkciju i tkivno specifičnu regulaciju Ugt1a6 sugerira da u tumorima mokraćnog mjehura postoji smanjenje izražaja tog gena (56). Isto pokazuju i naši rezultati prema kojima je izražaj Ugt1a6 (izražaj obje funkcionalne kopije) bio skoro četiri puta manji u tumorskom u odnosu na kontrolno tkivo mokraćnog mjehura. Ne zna se mehanizam putem kojeg dolazi do primijećene negativne modulacije izražaja tog gena u tumorskom tkivu, ali postoje pretpostavke prema kojima u procesu karcinogeneze dolazi do složene disregulacije brojnih receptorskih sustava i transkripcijskih čimbenika koji ovise o dobi, spolu i genetskim polimorfizmima (18). Prema jednoj teoriji, BBN negativno djeluje na aktivnost aril-hidrokarbonskog receptora (engl. *aryl-*

*hydrocarbon receptor*, AhR) koji je važan pojačivač transkripcije gena Ugt1a6 u miševa. Još uvijek se malo zna o ulozi AhR-a u regulaciji izražaja gena iz skupine Ugt kod ljudi (56). Uz AhR, spominje se uloga transkripcijskog čimbenika osjetljivog na oksidativni i elektrofilni stres, Nrf-2, za kojeg se vjeruje da je potaknut kemikalijama koje pojačavaju oksidativni stres u mokraćnom mjehuru i koji može dovesti do pojačanog izražaja gena za enzime glukuronidacijskog sustava i posljedičnog aktivnijeg metaboliziranja karcinogena što bi moglo usporiti razvoj tumora (29, 30).

#### **5.4.2. Ugt2b1**

Gen Ugt2b1 je primarno izražen u jetri, a njegov enzimski produkt metabolizira androgene i estrogene (57, 58). Do sada je potvrđena njegova uloga u metabolizmu okolišnog estrogena bisfenola A za kojeg je dokazan stimulativni učinak na rast stanica karcinoma dojke (58). U literaturi se ne pronalaze istraživanja koja su kvantificirala izražaj ovog gena u tkivu mokraćnog mjehura, zdravom ili tumorskom. Naši rezultati RNA sekvenciranja pokazali su da je izražaj tog gena više od četiri puta manji u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo mokraćnog mjehura. Opisanu promjenu je teško objasniti obzirom da do sada sličan rezultat nije potvrđen. Ipak, jedno istraživanje koje je proučavalo regulaciju izražaja gena za enzime koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika pokazalo je da u miševa s utišanom ekspresijom gena AhR (AhR KO miševi) postoji smanjen izražaj gena Ugt2b1 u jetri (59). Kako BBN smanjuje izražaj gena AhR u mokraćnom mjehuru (56), primijećena negativna regulacija Ugt2b1 u tumorima mokraćnog mjehura bi se potencijalno mogla objasniti smanjenom aktivnošću tog transkripcijskog čimbenika.

Iako je apsolutni izražaj Ugt2b1 u zdravom i tumorskom tkivu bio nizak, značajna promjena izražaja tog gena koju su naši rezultati pokazali u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo mogla bi biti jedan od čimbenika koji doprinosi urotelnoj karcinogenezi. Već je spomenuto da su supstrati UGT2B1 spolni hormoni. Oni, a najviše androgeni, djelujući preko nuklearnih receptora (ER $\beta$ , AR, AhR) u epitelnim stanicama mokraćnog mjehura, smanjuju izražaj gena glukuronidacijskog sustava, između ostalog i Ugt2b1. To dovodi do nakupljanja neglukuronidiranih spolnih hormona čiji se negativni modulacijski učinak na izražaj gena iz skupine Ugt sumira s učinkom BBN-a što oštećuje detoksifikacijsku sposobnost mokraćnog mjehura zbog čega urotelne stanice podliježu štetnim učincima karcinogena (18).

### 5.4.3. Ugt2b34 i Ugt2b35

Ugt2b34 i Ugt2b35 su najvećim dijelom eksprimirani u jetri i organima probavnog sustava (6). Supstrati koji se metaboliziraju putem enzima koje ovi geni kodiraju još nisu u potpunosti poznati. Primijećeno je da sudjeluju u glukuronidaciji opioida i 4-metillumbeliferona koji se istražuje kao opcija za liječenje hepatocelularnog karcinoma (60). U našem istraživanju, ova dva gena su pokazala statistički, ali ne i biološki značajno smanjenje izražaja u tumorskom u odnosu na kontrolno tkivo mokraćnog mjehura. Obzirom da literatura opisuje da ova dva gena podliježu regulacijskim učincima transkripcijskih čimbenika AhR i Nrf-2 (61), zamijećena negativna promjena izražaja mogla bi biti posljedica smanjene aktivnosti tih čimbenika koja nastaje zbog izloženosti urotelnih stanica BBN-u (18).

### 5.4.4. Ugt1a7c

Mišji gen Ugt1a7 ima tri kopije od kojih su dvije (Ugt1a7a i Ugt1a7b) nefunkcionalne dok je jedna, Ugt1a7c funkcionalna. Ugt1a7c je najviše izražen u tankom i debelom crijevu, dok je ekspresija u jetri zanemariva (6). Smatra se da su primarni supstrati enzimskog produkta gena Ugt1a7 aromatski ugljikovodici i heterociklički amini iz hrane, zraka i duhanskog dima (62).

Identificirane su četiri alelne varijante Ugt1a7 kod ljudi koje su posljedica postojanja polimorfizama u tom genu (62). Funkcionalno, svaka od tih alelnih varijanti ima varijabilnu katalitičku aktivnost zbog čega je uloga ovog gena istraživana u etiologiji više vrsta raka. Kako su ta istraživanja dala nekonzistentne rezultate, provedena je metaanaliza koja je objedinila podatke 22 studije iz tog područja. Prema rezultatima metaanalize, polimorfizmi Ugt1a7 dovode se u vezu s nastankom raka glave i vrata, jetre, gušterače, debelog crijeva, pluća i mokraćnog mjehura. Rezultati vezani za mokraćni mjehur pokazuju da osobe s alelnom varijantom Ugt1a7\*3 imaju 1,5 puta veće izgleda za razvoj raka nego osobe s uobičajenom Ugt1a7\*1 varijantom. Ipak, ovi rezultati su ograničeni jer je u metaanalizu bila uključena samo jedna studija koja je povezala urotelnu karcinogenezu i gen Ugt1a7. Štoviše, analiza je provedena samo na osobama azijskog podrijetla kod kojih je prevalencija raka mokraćnog mjehura puno veća zbog čega rezultati možda nisu u potpunosti primjenjivi na svjetsku populaciju (63). Rezultati RNA sekvenciranja koje smo proveli na tumorskom tkivu mokraćnog mjehura miša ukazuju da je izražaj tog gena gotovo dva puta manji u tumorskom u odnosu na kontrolno tkivo. Kako u literaturi nismo pronašli studije koje se osim polimorfizimima bave usporedbom izražaja Ugt1a7 u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo

mokraćnog mjehura, nije bilo moguće usporediti dobiveni rezultat s rezultatima drugih istraživanja. Također, vjeruje se da gen Ugt1a7 minimalno podliježe tipičnim regulacijskim čimbenicima Ugt ekspresije kao što su prije spomenuti AhR i Nrf-2 (64) pa dobiveni rezultat nije moguće objasniti mehanizmima negativne regulacije opisanima za druge izoforme gena iz obitelji Ugt.

#### **5.4.5. Ugt1a1**

Gen Ugt1a1 ima najveću grupusupstrata i spada u najproučavanije gene koji kodiraju enzime iz metabolizma ksenobiotika (6). Iz perspektive urotelne karcinogeneze zanimljiv je jer je jedini od gena u ovom istraživanju koji je pokazao tendenciju povećanja izražaja u tumorskom u odnosu na kontrolno tkivo mokraćnog mjehura. To povećanje nije bilo statistički, ali je bilo biološki značajno. Opisano je teško uklopiti u postojeća istraživanja koja su pokazala suprotne rezultate (18).

#### **5.5. Ograničenja provedenog istraživanja**

Glavno ograničenje provedenog istraživanja je mali uzorak. Osim toga, smatramo da bi značaj gena trebalo testirati na sve tri osnovne biološke razine što podrazumijeva transkripciju, translaciju i funkciju proteinskog produkta. Stoga, da bi rezultati ove studije bili u potpunosti biološki relevantni, trebalo bi provesti opširnije istraživanje koje bi na većem broju eksperimentalnih životinja potvrdilo korelaciju između ekspresije gena, količine enzimskog produkta i katalitičke aktivnosti glukuronil transferaza.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Usporedba bazalnog izražaja gena *Ugt1a* u jetri, duodenumu, jejunumu, bubregu i mišiću pokazala je da je glukuronidacijski sustav aktivan u testiranim tkivima uz najmanji izražaj u mišiću. Također, bubrezi i tanko crijevo možda imaju aktivniji glukuronidacijski sustav nego jetra.
2. Akutna izloženost BBN-u, ne mijenja značajno izražaj gena *Ugt1a* u jetri, bubregu i dijelovima tankog crijeva. Primijećena tendencija porasta izražaja gena u jetri nije bila statistički značajna te zahtijeva opsežnije istraživanje.
3. Značajno smanjen izražaj izoforme *Ugt1a7c* u mokraćnom mjehuru miševa s reduciranom mikrobiotom tretiranih BBN-om sugerira da bi njegoa glukuronidacija i izlučivanje moglo ovisiti o prisutnosti i metaboličkoj aktivnosti mikrobiote.
4. Sekvenciranje RNA izolirane iz tumora mokraćnog mjehura miševa, izazvanih BBN-om, pokazalo je statistički i biološki značajnu promjenu izražaja više gena iz obitelji *Ugt*, a što ukazuje da glukuronidacija ima važnu ulogu u urotelnoj karcinogenezi.



## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Croom E. Metabolism of xenobiotics of human environments. U: Progress in molecular biology and translational science. 2012. str. 31-88.
2. Xu C, Li CYT, Kong ANT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. Arch Pharm Res. 2005;28:249-68.
3. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. Clin Liver Dis. 2017;21:1-20.
4. Gail McCarver D, Hines RN. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. J Pharmacol Exp Ther. 2002;300:361-6.
5. Yang G, Ge S, Singh R, Basu S, Shatzer K, Zen M, i sur. Glucuronidation: driving factors and their impact on glucuronide disposition. Drug Metab Rev. 2017;49:105-38.
6. Buckley DB, Klaassen CD. Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. Drug Metab Dispos. 2007;35:121-7.
7. Naritomi Y, Nakamori F, Furukawa T, Tabata K. Prediction of hepatic and intestinal glucuronidation using in vitro–in vivo extrapolation. Drug Metab Pharmacokinet. 2015;30:21-9.
8. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, i sur. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. Pharmacogenetics. 1997;7:255-69.
9. Meech R, Hu DG, McKinnon RA, Mubarakah SN, Haines AZ, Nair PC, i sur. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily: New members, new functions, and novel paradigms. Physiol Rev. 2019;99:1153-222.
10. Mackenzie P, Gregory P, Gardner-Stephen D, Lewinsky R, Jorgensen B, Nishiyama T, i sur. Regulation of UDP glucuronosyltransferase genes. Curr Drug Metab. 2003;4:249-57.
11. Oda S, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. Epigenetic regulation of the tissue-specific expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A10. Biochem Pharmacol. 2014;87:660-7.

12. Izukawa T, Nakajima M, Fujiwara R, Yamanaka H, Fukami T, Takamiya M, i sur. Quantitative analysis of UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A and UGT2B expression levels in human livers. *Drug Metab Dispos.* 2009;37:1759-68.
13. Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24:555-71.
14. Tourancheau A, Rouleau M, Guauque-Olarte S, Villeneuve L, Gilbert I, Droit A, i sur. Quantitative profiling of the UGT transcriptome in human drug-metabolizing tissues. *Pharmacogenomics J.* 2018;18:251-61.
15. Bellemare J, Rouleau M, Harvey M, Popa I, Pelletier G, Têtu B, i sur. Immunohistochemical expression of conjugating UGT1A-derived isoforms in normal and tumoral drug-metabolizing tissues in humans. *J Pathol.* 2011;223:425-35.
16. Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, i sur. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem.* 2000;275:36164-71.
17. Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology.* 1999;116:149-60.
18. Sundararaghavan VL, Sindhvani P, Hinds TD. Glucuronidation and UGT isozymes in bladder: new targets for the treatment of uroepithelial carcinomas? *Oncotarget.* 2017;8:3640-8.
19. Collier AC, Yamauchi Y, Sato BLM, Rougée LRA, Ward MA. UDP-glucuronosyltransferase 1a enzymes are present and active in the mouse blastocyst. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:1921-5.
20. Collier AC, Ganley NA, Tingle MD, Blumenstein M, Marvin KW, Paxton JW, i sur. UDP-glucuronosyltransferase activity, expression, and cellular localization in human placenta at term. *Biochem Pharmacol.* 2002;63:409-19.
21. Muraca M, Fevery J. Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver. *Gastroenterology.* 1984;87:308-13.

22. Gallagher CJ, Balliet RM, Sun D, Chen G, Lazarus P. Sex Differences in UDP-glucuronosyltransferase 2B17 expression and activity. *Drug Metab Dispos.* 2010;38:2204-9.
23. Ullrich D, Münzel PA, Beck-Gscheidmeier S, Schröder M, Bock KW. Drug-metabolizing enzymes in pharyngeal mucosa and in oropharyngeal cancer tissue. *Biochem Pharmacol.* 1997;54:1159-62.
24. Lee YH, Sauer B, Johnson PF, Gonzalez FJ. Disruption of the *c/ebp α* gene in adult mouse liver. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6014-22.
25. Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the *Hnf-1 α* knockout mouse. *Mol Cell Biol.* 1998;18:3059-68.
26. Girard H, Lévesque E, Bellemare J, Journault K, Caillier B, Guillemette C. Genetic diversity at the UGT1 locus is amplified by a novel 3' alternative splicing mechanism leading to nine additional UGT1A proteins that act as regulators of glucuronidation activity. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17:1077-89.
27. Lévesque E, Girard H, Journault K, Lépine J, Guillemette C. Regulation of the UGT1A1 bilirubin-conjugating pathway: Role of a new splicing event at the UGT1A locus. *Hepatology.* 2007;4:128-38.
28. Sakamoto M, Itoh T, Tukey RH, Fujiwara R. Nicotine regulates the expression of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in humanized UGT1 mouse brain. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015;30:269-75.
29. Iida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:6424-31.
30. Benson AB. Oltipraz: A laboratory and clinical review. *J Cell Biochem.* 1993;53:278-91.
31. Fantini D, Glaser AP, Rimar KJ, Wang Y, Schipma M, Varghese N, et al. A Carcinogen-induced mouse model recapitulates the molecular alterations of human muscle invasive bladder cancer. *Oncogene.* 2018;37:1911-25.
32. Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. *In Vivo.* 2012;26:727-39.

33. Degoricija M, Korac-Prlic J, Vilovic K, Ivanisevic T, Haupt B, Palada V, i sur. The dynamics of the inflammatory response during BBN-induced bladder carcinogenesis in mice. *J Transl Med.* 2019;17:394.
34. Yao R, Lemon WJ, Wang Y, Grubbs CJ, Lubet RA, You M. Altered gene expression profile in mouse bladder cancers induced by hydroxybutyl(butyl)nitrosamine. *Neoplasia.* 2004;6:569-77.
35. Korac-Prlic J, Degoricija M, Vilović K, Vujević S, Terzić J. BBN-driven urinary bladder cancer mouse model. *Methods Cell Biol.* 2021;163:77-92.
36. Roje B, Elek A, Palada V, Bom J, Iljazović A, Šimić A, i sur. Microbiota alters urinary bladder weight and gene expression. *Microorganisms.* 2020;8:421.
37. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). U: *Methods in enzymology.* 2013. str. 67-74.
38. Canene-Adams K. General PCR. U: 2013. str. 291-8.
39. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005;39:75-85.
40. Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM. Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPS reprogramming process. *Sci Rep.* 2018;8:8716.
41. Børsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;18:78-89.
42. Chu Y, Corey DR. RNA sequencing: Platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22:271-4.
43. Viscardi MJ, Arribere JA. Poly(a) selection introduces bias and undue noise in direct RNA-sequencing. *BMC Genomics.* 2022;23:530.
44. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol.* 2013;31:46-53.
45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 2001;25:402-8.

46. Fisher MB, Paine MF, Strelevitz TJ, Wrighton SA. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev.* 2001;33:273-97.
47. Gaganis P, Miners JO, Brennan JS, Thomas A, Knights KM. Human renal cortical and medullary UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): Immunohistochemical localization of UGT2B7 and UGT1A enzymes and kinetic characterization of *S*-naproxen glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323:422-30.
48. Gill KL, Houston JB, Galetin A. Characterization of in vitro glucuronidation clearance of a range of drugs in human kidney microsomes: Comparison with liver and intestinal glucuronidation and impact of albumin. *Drug Metab Dispos.* 2012;40:825-35.
49. Chen G, Dellinger RW, Sun D, Spratt TE, Lazarus P. Glucuronidation of tobacco-specific nitrosamines by UGT2B10. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:824-30.
50. Li Y, Hecht SS. Metabolism and DNA adduct formation of tobacco-specific N-nitrosamines. *Int J Mol Sci.* 2022;23:5109.
51. Tolba R, Kraus T, Liedtke C, Schwarz M, Weiskirchen R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab Anim.* 2015;49:59-69.
52. Landerer S, Kalthoff S, Paulusch S, Strassburg CP. UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms affect diethylnitrosamine-induced carcinogenesis in humanized transgenic mice. *Cancer Sci.* 2020;111:4266-75.
53. Zhang Y. Understanding the gender disparity in bladder cancer risk: The impact of sex hormones and liver on bladder susceptibility to carcinogens. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2013;31:287-304.
54. Collins SL, Patterson AD. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10:19-32.
55. Uchihashi S, Nishikawa M, Sakaki T, Ikushiro S ichi. Comparison of serotonin glucuronidation activity of UDP-glucuronosyltransferase 1a6a (Ugt1a6a) and Ugt1a6b: Evidence for the Preferential Expression of Ugt1a6a in the Mouse Brain. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013;28:260-4.
56. Walter Bock K, Köhle C. UDP-Glucuronosyltransferase 1A6: Structural, functional, and regulatory aspects. *U: 2005. str. 57-75.*

57. Grosse L, Chouinard S, Pâquet S, Verreault M, Trottier J, Bélanger A, i sur. Androgen glucuronidation in mice: When, where, and how. *Biology (Basel)*. 2022;11:403.
58. Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, i sur. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*. 1999;340:405-9.
59. Aleksunes LM, Klaassen CD. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR $\alpha$ -, and Nrf2-null mice. *Drug Metab Dispos*. 2012;40:1366-79.
60. Kurita A, Miyauchi Y, Ikushiro S, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Comprehensive characterization of mouse UDP-glucuronosyltransferase (Ugt) belonging to the Ugt2b subfamily: Identification of Ugt2b36 as the predominant isoform involved in morphine glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;36:199-208.
61. Yang N, Sun R, Liao X, Aa J, Wang G. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and their related metabolic crosstalk with internal homeostasis: A systematic review of UGT isoforms for precision medicine. *Pharmacol Res*. 2017;121:169-83.
62. Tseng CS, Tang KS, Lo HW, Ker CG, Teng HC, Huang CS. UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma risk and onset age. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:1758-63.
63. Han SX, Wang L, Wu DQ. The association between UGT1A7 polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol*. 2012;36:e201–6.
64. Buckley DB, Klaassen CD. Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , and nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Drug Metab Dispos*. 2009;37:847-56.

## **8. SAŽETAK**



**Ciljevi istraživanja:** i Međusobno usporediti bazalni izražaj gena Ugt1a u metabolički važnim tkivima miša. ii Utvrditi promjenu izražaj gena Ugt1a u jetri, bubregu i tankom crijevu nakon akutnog tretmana BBN-om. iii Odrediti utječe li redukcija mikrobiote antibioticima na izražaj gena sustava Ugt u mokraćnom mjehuru miševa tretiranih BBN-om. iv Odrediti postoji li promijenjen izražaj pojedinačnih izoformi gena sustava Ugt u tumorima mokraćnog mjehura miševa.

**Materijali i metode:** Eksperiment je izveden u Laboratoriju za istraživanje raka pri Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Od sedam miševa soja C57BL/6J četiri su uzimala BBN u vodi za piće (pokusna grupa), a tri su pila vodu (kontrolna grupa). Metodom qRT-PCR kvantificiran je izražaj gena Ugt1a u jetri, bubregu, duodenumu, jejunumu i bedrenom. Nadalje, provjerena je aktivnost gena glukuronidacijskog sustava analizirajući ranije prikupljene podatke RNA sekvenciranja tumorskog tkiva kao i zdravog tkiva mokraćnog mjehura miša nakon antibiotske redukcije mikrobiote i tretmana BBN-om.

**Rezultati:** Jetra, duodenum, jejunum i bubreg imaju značajno veću ekspresiju, glavnog glukuronidacijskog gena Ugt1a nego bedreni mišić. U odnosu na jetru, samo je bubreg pokazao značajno veći izražaj gena Ugt1a. Nije pronađena značajna promjena izražaja gena Ugt1a nakon tretmana miševa BBN-om. U tumorskom tkivu mokraćnog mjehura miševa primijećena je značajno niža ekspresija šest izoformi gena sustava Ugt, i to: Ugt1a6a, Ugt1a6b, Ugt1a7c, Ugt2b1, Ugt2b34 i Ugt2b35. U mokraćnom mjehuru miševa s antibiotski reduciranom mikrobiotom i tretiranih BBN-om primijećen je statistički značajno manji izražaj gena Ugt1a7c.

**Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja ukazuju da jetra nije jedini organ sa značajnom glukuronidacijskom sposobnošću jer je visoka razina izražaja gena Ugt1a pronađena u bubregu i tankom crijevu. Konzumacija BBN-a nije značajno promijenila izražaj gena Ugt1a u metabolički relevantnim tkivima miša. Mikrobiota bi, također, mogla imati važnu ulogu u regulaciji izražaja gena iz sustava Ugt u mokraćnom mjehuru. Smanjen izražaj gena za enzime glukuronidacijskog sustava u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura ukazuje da je smanjenje glukuronidacijske sposobnosti možda povezano s urotelnom karcinogenezom.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Glucuronidation system activity in the metabolically important mouse tissues

**Objectives:** i To compare the basal expression of the Ugt1a gene in metabolically important mouse tissues. ii To determine the change in the expression of the Ugt1a gene in the liver, kidney, and small intestine after acute treatment with BBN. iii To determine whether the reduction of microbiota with antibiotics affects the expression of the Ugt system in the urinary bladder of mice treated with BBN. iv To determine whether there is an altered expression of individual isoforms of the Ugt genes in mice bladder tumors.

**Materials and methods:** The experiment was conducted in the Cancer Research Laboratory at the Department of Immunology and Medical Genetics, University of Split School of Medicine. Of the seven C57BL/6J mice, four took BBN in drinking water (experimental group), and three drank water (control group). The expression of the Ugt1a gene in the liver, kidney, duodenum, jejunum, and femoral muscle was quantified using the qRT-PCR method. Furthermore, the activity of the glucuronidation system genes was analyzed using previously collected RNA sequencing data of urinary bladder tumor tissue as well as mouse urinary bladder tissue after antibiotic reduction of microbiota and two-week BBN treatment.

**Results:** Liver, duodenum, jejunum, and kidney have significantly higher expression of the main glucuronidation gene Ugt1a compared to the skeletal muscle. Compared to the liver, only the kidney showed a significantly higher expression of the Ugt1a gene. No significant change in Ugt1a gene expression was found after treatment of mice with BBN. In the murine urinary bladder tumor tissue, a significantly lower expression of six Ugt isoforms was observed, namely: Ugt1a6a, Ugt1a6b, Ugt1a7c, Ugt2b1, Ugt2b34 and Ugt2b35. A statistically significant lower expression of the Ugt1a7c gene was observed in the urinary bladder of mice with antibiotic-reduced microbiota and treated with BBN.

**Conclusion:** The results of this study indicate that the liver is not the only organ with significant glucuronidation capacity, as a high level of Ugt1a gene expression was found in the kidney and small intestine. BBN consumption did not significantly change the expression of the Ugt1a gene in metabolically relevant mouse tissues. The microbiota could also play an important role in the regulation of urinary bladder Ugt genes expression. Decreased expression of genes for enzymes of the glucuronidation system in urinary bladder tumor tissue indicates that a possible decrease in glucuronidation capacity may be related to the urothelial carcinogenesis.



