

Crijevana mikrobiota aktivira prokarcinogen BBN

Ćosić, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:171:702317>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Elena Čosić

CRIJEVNA MIKROBIOTA AKTIVIRA PROKARCINOGEN BBN

Diplomski rad

Akadska godina: 2018./2019.

Mentor: prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr.med.

Komentor: doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov.

Split, rujn, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Molekularna biologija s genetikom
je prihvaćena na 53 sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 53 sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta 53 sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Tema rada
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Ivica Ljubenković.

CRIJEVNA MIKROBIOTA AKTIVIRA PROKARCINOGEN BBN

Elena Ćosić, 116

Sažetak:

UVOD: Svrha istraživanja je bila utvrditi povezanost mikrobioma s pojavom tumora mokraćnog mjehura izazvanog konzumacijom BBN-a (*N-butyl-N-(4-hidroksibutil) nitrozamin*).

MATERIJALI I METODE: Istraživanje je provedeno na miševima C57BL/6J divljeg tipa podijeljenim u 5 skupina: akutni model dvotjednog tretmana BBN-om ("B" - miševi koji su konzumirali 0,05% otopinu BBN-a u vodi za piće kroz dva tjedna), akutni model tretmana 2+2tj BBN/antibiotici (AB - dvotjedni pretretman širokospektralnim antibioticima nakon čega slijedi dvotjedni tretman otopinom BBN (0,05%) i antibiotici u vodi za piće), miševi na dvotjednom tretmanu antibiotika (A2 – miševi na dvotjednom tretmanu isključivo širokospektralnim antibioticima), miševi na četverotjednom tretmanu antibiotika (A4 – miševi na četverotjednom tretmanu isključivo sa širokospektralnim antibioticima), te oni koji piju isključivo vodu (koja se dijeli na dvije eksperimentalne skupine: pozitivna K+ i negativna kontrolna skupina K-). Sva mjerenja provedena su na uzorcima fecesa putem HPLC-a (*Tekućinska kromatografija visoke efikasnosti*).

REZULTATI: Korištenje antibiotika dovelo je do redukcije broja bakterija koje sudjeluju u pretvorbi BBN-a u BCPN (*N-butyl-N-(3-carboxypropyl) Nitrosamine*). Koncentracija prisutnog BCPN-a grupe K+ (s najvišom vrijednosti od 1445,92 µg/ml) bila je značajno veća nego u grupi A (gdje najviša vrijednost iz skupine A2 iznosi 74,34 µg/ml). Izmjerena koncentracija BCPN-a u negativnoj kontroli je iznimno niska (4,58 µg/ml), slična onoj izmjerenoj kod grupe A4. Uzorci fecesa prikupljeni u gornjem dijelu crijeva ($\bar{x} = 1266,89$ µg/ml) imali su veću koncentraciju BCPN-a od onih koji su prikupljeni u donjim dijelovima crijeva ($\bar{x} = 371,26$ µg/ml).

ZAKLJUČAK: Našim istraživanjem utvrdili smo da bakterije crijeva sudjeluju u metabolizmu BBN-a, točnije imaju sposobnost pretvorbe BBN-a u BCPN. Također, zaključili smo da primjena širokospektralnih antibiotika utječe na značajnu redukciju mikrobioma crijeva, odnosno bakterijske kulture crijeva koje sudjeluju u metabolizmu BBN-a, te da postoji razlika u opsegu redukcije mikrobioma crijeva ovisno o trajanju antimikrobne terapije. Isto tako, važno je istaknuti da se različiti dijelovi crijeva razlikuju u vrsti bakterijskih kultura koje ih nastanjuju, točnije gornji dio crijeva brojniji je bakterijama koje imaju sposobnost pretvorbe BBN-a u BCPN.

Ključne riječi: BBN, BCPN, širokospektralni antibiotici, mikrobiom, tumor mokraćnog mjehura

Rad sadrži: 57 stranica, 12 slika, 8 tablica, 25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić - predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Mudnić - član
3. prof. dr. sc. Janoš Terzić - mentor

Datum obrane: 6. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia**

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Molecular biology and genetics
was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.3 and Faculty Council of School of Medicine session no. 2.
Thesis subject:
Mentor: Prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr.med.
Technical assistance: Doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov

GUT MICROBIOTA ACTIVATES PROCARCINOGEN BBN

Elena Ćosić, 116

Summary:

INTRODUCTION: The purpose of the study was to determine the association of the microbiome with the emergence of bladder tumors caused by the consumption of BBN (*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine).

MATERIALS AND METHODS: The study was conducted on wild-type C57BL / 6J mice divided into 5 groups: an acute two-week BBN treatment model ("B" - mice consuming 0,05% BBN solution in drinking water for two weeks), an acute treatment model of 2 + 2 weeks BBN / antibiotics (AB - two weeks pre-treatment with broad spectrum antibiotics followed by two weeks treatment with BBN solution (0,05%) and antibiotics in drinking water), mice on two weeks antibiotic treatment (A2 - two weeks mice treatment with broad-spectrum antibiotics exclusively), mice on a four-week antibiotic treatment (A4 - mice on a four-week treatment with broad-spectrum antibiotics only), and those who drink only water (which is divided into two experimental groups: positive K + and negative control groups K-). All measurements were performed on faeces samples by HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

RESULTS: The use of antibiotics led to a reduction in the number of bacteria involved in the conversion of BBN to BCPN (*N*-butyl-*N*-(3-carboxypropyl) Nitrosamin). The concentration of BCPN present in the K + group (with the highest value of 1445,92 µg / ml) was significantly higher than in group A (where the highest value from the A2 group was 74,34 µg / ml). The measured BCPN concentration in the negative control is extremely low (4,58 µg / ml), similar to that measured in the A4 group. Faeces samples collected in the upper intestine ($\bar{x} = 1266,89$ µg / ml) had a higher concentration of BCPN than those collected in the lower intestine ($\bar{x} = 371,26$ µg / ml).

CONCLUSION: In our study, we found that gut bacteria participate in the metabolism of BBN, more specifically, they have the ability to convert BBN to BCPN. We also concluded that the use of broad-spectrum antibiotics affects the significant reduction of the gut microbiome, respectively the bacterial gut culture involved in BBN metabolism, and that there is a difference in the extent of gut microbiome reduction depending on the duration of antimicrobial therapy. It is also important to point out that different parts of the gut differ in the type of bacterial cultures that inhabit them, more specifically the upper gut is more numerous with bacteria that have the ability to convert BBN to BCPN.

Key words: BBN, BCPN, broad spectrum antibiotics, microbiome, bladder tumor

Thesis contains: 57 pages, 12 figures, 8 tables, 25 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Vedrana Čikeš Čulić, MD, PhD, associate professor - chair person
2. Ivana Mudnić, MD, PhD, associate professor - member
3. Janoš Terzić, MD, PhD, full professor - supervisor

Defence date: September 6, 2019

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem mojem mentoru prof. dr. sc. Janošu Terziću koji mi je ispunio najveće želje koje su se javile u meni tijekom studiranja, odnosno nezaboravno iskustvo rada u laboratoriju te suradnju s predivnim ljudima na projektu o kojem sam mogla samo sanjati. Veliko hvala doc. dr. sc. Ivici Ljubenkovu koji me nesebično pratio i bio uz mene kroz cijelu izradu diplomskog rada te bez kojeg ovaj rad ne bi bio moguć. Hvala Vam na beskrajnoj podršci, strpljivosti, brojnim sugestijama, pohvalama i kritikama.

Hvala mojoj partnerici u laboratoriju, mag. educ. biol. et chem. Blanki Roje koja je bila uz mene i dijelila sa mnom sve trenutke, one loše i one dobre. Hvala cijeloj ekipi s katedre što ste bili uz mene i učinili da mjeseci provedeni u laboratoriju budu jedni od najljepših koje pamtim.

Hvala mag. pharm. Josipi Bukić, koja je uljepšala dane mog studiranja podržavajući me u svim mojim idejama. Hvala ti na svojoj podršci i strpljivosti koju si mi pružala sve ove godine, te isto tako nastavila tijekom pisanja ovog rada.

Hvala mojoj srednjoj školi, svakom kutu gimnazije Franje Petrića u Zadru, a posebno profesorici biologije Tereziji Šabić jer ste u meni razvili beskrajnu ljubav prema prirodnim znanostima, učenju, radu i težnju ka boljem. Hvala Vam što ste mi pomogli da pronađem pravu sebe.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene svakog dana, bili neuništivi oslonac te mi omogućili da ovo studiranje bude najljepši period mog života. Bez Vas ne bih bila ova osoba.

Hvala mojoj obitelji, hvala Vam što ste me usmjeravali kada je trebalo, hvala Vam što ste me podržavali i kada možda nije trebalo, hvala Vam na bezuvjetnoj ljubavi i bezbrižnom djetinjstvu. Hvala Vam što sam osoba kakva danas jesam. Bez Vas ne bih postigla sve što jesam.

Table of Contents

1	UVOD	8
1.1	Mikrobiom	8
1.1.1	Karakterizacija strukture mikrobioma.....	8
1.1.2	Mikrobiom je povezan s patološkim i ostalim stanjima.....	9
1.1.3	Mikrobiom urina	10
1.1.4	Mikrobiom crijeva	12
1.2	Karcinom mokraćnog mjehura	13
1.2.1	Stupnjevanje (graduiranje) tumora.....	13
1.2.2	Stadij tumora.....	14
1.3	BBN	16
1.3.1	Urotelne lezije inducirane BBN-om.....	18
1.3.2	Genetske promjene u BBN-induciranim urotelnim tumorima.....	18
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	19
3	Metode	20
3.1	Ekstrakcija	20
3.2	Kromatografija	21
3.2.1	Tankoslojna kromatografija (TLC)	21
3.2.2	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	23
3.3	Razvoj i validacija HPLC metode	25
3.4	HPLC analiza	30
4	Materijali i razvoj eksperimenta	31
4.1	Eksperimentalne životinje	31
4.2	Eksperimentalni modeli	31
4.2.1	Model izazivanja tumora mokraćnog mjehura u miševa s BBN-om (skupina miševa za eksperiment tipa 1)	31
4.2.2	Model miševa s izmijenjenim mikrobiomom bez indukcije tumora mokraćnog mjehura (skupina miševa za eksperiment tipa 2).....	32
4.3	Uzorkovanje	33
4.4	Obrada uzoraka	34
4.4.1	Razrjeđivanje i priprema uzoraka stolice za ekstrakciju	34
4.4.2	Tankoslojna kromatografija i priprema uzorka za HPLC	35
4.4.3	Parametri validacije.....	36
5	REZULTATI	41
5.1	TLC	41
5.1.1	Eksperiment tipa 1	44
5.1.2	Eksperiment tipa 2	45
6	RASPRAVA	49
7	ZAKLJUČCI	51
8	POPIS LITERATURE	52
9	SAŽETAK	55

1 UVOD

1.1 Mikrobiom

Brojčano gledano, mi smo samo 10% ljudi te 90% bakterije. Na nama i u nama je 10 puta više bakterijskih stanica (preko 100 trilijuna) nego ljudskih. Većina naših mikroba živi u crijevu, osobito u debelom crijevu. Mikrobiom je genetski materijal svih mikroba - bakterije, gljivice, protozoe i virusi - koji žive na, i unutar ljudskog tijela. Skup svih naših mikroba, bakterija, virusa, arhea, mikroskopskih gljivica i parazita, označava se terminom mikrobiota. Broj gena u svim mikroorganizmima jedne osobe je 200 puta veći od broja gena u ljudskom genomu. Mikrobiom teži otprilike jednako kao i pet kovanica od jedne funte (1), dok mikrobiota može ukupno težiti do 2 kg. Jedna trećina našeg mikrobiote crijeva je zajednička većini ljudi, dok su dvije trećine karakteristične za svakoga od nas. Drugim riječima, mikrobiota u našem crijevu je poput osobne iskaznice ili otiska prsta (2). Bakterije crijeva pomažu u probavi hrane, reguliraju imunološki sustav, štite od bakterija koje uzrokuju bolesti i proizvode različite vitamine uključujući vitamine B12, tiamin i riboflavin te vitamin K koji je potreban za stvaranje faktora koji omogućuju zgrušavanje krvi. Mikrobiom općenito nije bio poznat sve do kasnih 1990-ih, tj. analiziranje mikroba bilo je ograničeno mogućnošću njihove kultivacije i analize klasičnim mikrobiološkim postupcima (1).

1.1.1 Karakterizacija strukture mikrobioma

Proučavanje humanog mikrobioma potaknuto je tehnološkim napretkom za obavljanje analiza neovisnih o uzgoju bakterija u bakterijskim kulturama. U većini studija, bakterijski sastav mikrobne populacije identificiran je susekvenciranjem vrlo varijabilnog gena koji kodira bakterijsku 16S rRNA molekulu (u daljnjem tekstu 16S). Nakon sekvenciranja slijedi usporedba dobivenih sljedova nukleotida u tom genu s poznatim bakterijskim sekvencama, na temelju čega se saznaje koje su

bakterije prisutne u ispitivanom uzorku. Druge metodologije za analizu mikrobnih transkriptoma, proteoma i metaboloma pružaju dodatne informacije na ostalim razinama mikrobne fiziologije.

Veliki napredak u karakterizaciji strukture mikrobioma otvorilo je put za tekuće i buduće studije o funkcionalnim interakcijama između mikrobiote i domaćina. Studije o funkciji mikrobiote biti će ključne za razumijevanje uloge mikrobiote u humanoj homeostazi i patogenezi mnogih bolesti. Ekspanzija informacija o ljudskom mikrobiomu u posljednjih nekoliko godina naglašena je podacima prikupljenih kroz nekoliko velikih pokušaja da se karakterizira ljudski mikrobiom, točnije “*The European Metagenomics of the Human Intestinal Tract*” (MetaHIT) i “*The NIH-funded Human Microbiome Project*” (HMP).

U 2010. godini, početna MetaHIT studija izvijestila je o sekvenciranju 3,3 milijuna ne-preklapajućih fekalnih mikrobnih gena, što predstavlja gotovo 200 puta veću količinu mikrobnih DNA sekvenci od broja prijavljenih u svim prethodnim studijama. U srpnju 2014. objavljen je kombinirani skup podataka o sekvenciranju metagenomskog uzorka iz 1267 metagenoma crijeva od 1070 pojedinaca, uključujući 760 europskih uzoraka iz MetaHIT-a, 139 američkih uzoraka iz HMP-a i 368 kineskih uzoraka iz velike studije o dijabetesu. Svaki uzorak sadržavao je oko 750.000 gena ili oko 37 puta veći broj gena nego što se nalazi u ljudskom genomu, a manje od 300.000 gena dijeli više od 50% pojedinaca. Pojava novih gena, identificiranih u najnovijoj studiji, je bila relativno rijetka, odnosno identificirani su u manje od 1% pojedinaca. Smatra se da ova zbirka sadrži gotovo kompletan skup gena za većinu humanih crijevnih bakterija te ilustrira količinu i varijabilnost humanog mikrobioma (3).

1.1.2 Mikrobiom je povezan s patološkim i ostalim stanjima

- Crijevni mikrobiom različit je kod pretilih, odnosno mršavih blizanaca. Pretili blizanci imaju manju raznolikost bakterija i višu razinu probavnih enzima, što znači da su pretili blizanci učinkovitiji u probavi hrane i prikupljanju kalorija. Pretilost je također povezana niskom raznolikošću mikroba u crijevima (1).
- Dijabetes tipa I je autoimuna bolest povezana s manje raznolikim mikrobiomom crijeva. Studije na životinjama su pokazale da bakterije imaju značajnu ulogu u razvoju dijabetesa (1).

- Prašina iz domova s psima može smanjiti imunološki odgovor na alergene i druge uzroke astme zbog promijenjenog sastava mikrobioma crijeva. Smatra se da djeca koja žive s psima imaju manju vjerojatnost razvoja alergija u djetinjstvu (5).
- Transplantacija mikrobiota iz stolice (engl. *faecal microbiota transplant* - FMT) je klinički postupak koji obnavlja bakterije debelog crijeva neke osobe unosom "zdravih" bakterija iz stolice donora (zdravog čovjeka) kolonoskopijom ili klistiranjem. FMT se također koristi za liječenje upala debelog crijeva uzorkovanih bakterijom *Clostridium difficile* (1).

1.1.3 Mikrobiom urina

Nedavno otkriće mikrobni populacija koje se nalaze u urinarnom traktu, nazvano mikrobiom urina ili urobiom, posebno je važno za rak genitourinarnog trakta. Dok se urin tradicionalno smatrao sterilnim, nedavni dokazi doveli su u pitanje ovu dogmu s istraživanjima koja detektiraju mikrobe pomoću učinkovitije kultivacije tih bakterija te na molekularnoj razini, sekvencirajući bakterijsku DNA, u mokraćnom sustavu i mokraćnom mjehuru. Kako je većina tih istraživanja provedena hvatanjem čistog urina i / ili s uzorkom urina iz urinarnog katetera, nije sigurno iz kojeg dijela urinarnog trakta dolaze pojedine vrste bakterija. Uzorci urina mogu sadržavati mikrobe (ili mikrobne fragmente i DNA) koji potječu iz uretre (mokraćne cijevi), mjehura, uretera (mokraćovoda) i / ili bubrega. Uzorci urina prikupljeni "čistim načinom" također mogu biti kontaminirani mikroorganizmima koji žive u ili na vagini ili penisu. *In situ* detekcija bakterija je ograničena na bilo kojem od navedenih anatomskih mjesta. Nadalje, većina je istraživanja bila usredotočena isključivo na bakterije, dok druge mikrobne populacije, kao što su gljivice i virusi u mikrobiomu urina, tek treba razjasniti. Mikrobiom urina može se promijeniti sa starenjem, budući da se u strukturi zajednice mikrobioma urina javljaju dobno specifični rodovi. Nije poznato pridonose li te starosne promjene u mikrobioti urina riziku od urogenitalnog raka kasnije u životu. Razlike vezane za spol su bolje proučavane i identificirane su razlike u sastavu mikrobioma urina muškaraca i žena. Ženska mikrobiota urina sastoji se pretežito od rodova *Lactobacillus* i *Gardnerella*, dok su *Corynebacterium*, *Staphylococcus* i *Streptococcus* većinski rodovi mikrobiote urina kod muškaraca. Kao rezultat toga, može se pretpostaviti da nejednakost u komenzalnoj urogenitalnoj flori

može pridonijeti dobro poznatoj spolnoj nejednakosti incidencije raka urogenitalnog trakta koji je 3 puta češći kod muškaraca (4).

1.1.4 Mikrobiom crijeva

Većina studija koje opisuju mikrobiom ljudskih crijeva u zdravim i bolesnim stanjima naglasile su bakterijsku komponentu, ali i mikrobiom gljivica počinje dobivati priznanje kao temeljni dio našeg mikrobioma. Do danas su studije mikrobioma ljudskih crijeva primarno bile usmjerene na bolesna stanja ili na zdrave pojedince. U sklopu HMP projekta istražen je mikrobiom crijeva sekvenciranjem regije “Internal Transcribed Spacer 2” (ITS2) kao i 18S rRNA gena.

U sklopu studije analizirano je tri stotine sedamnaest uzoraka stolice pomoću sekvenciranja ITS2. Fekalna fungalna raznolikost bila je značajno niža u usporedbi s bakterijskom raznolikošću. U uzorcima su dominirali kvasci, koji su činili 8 od 15 prevladavajućih rodova. Naime, gljivične zajednice bile su karakterizirane visokom prevalencijom *Saccharomyces*, *Malassezia* i *Candida*, s operativnim taksonomskim jedinicama (OTUs) *S. cerevisiae*, *M. restricta* i *C. albicans* u 96,8 88,3 i 80,8% uzoraka. Također, 18S rRNA sekvencijski podaci gena potvrđuju rezultate ITS2; međutim sekvenciranje ITS2 omogućilo je bolju rezoluciju konstituenata mikrobioma relativno niskog broja. Navedene informacije ukazuju na to da je sekvenciranje ITS2 osjetljivija metoda za proučavanje mikrobioma uzoraka stolice. Varijabilnost u HMP kohorti bila je visoka, također otkrivajući da za razliku od bakterijskih zajednica, mikrobiom pojedinca nakon određenog vremena slični mikrobiomu drugih osoba jednako koliko i predhodno vlastitom. Međutim, nekoliko vrsta gljivica bilo je u većini uzoraka, što dokazuje postojanje mikrobioma crijeva (6).

1.2 Karcinom mokraćnog mjehura

Rak mjehura (BC) je često ozbiljno stanje, a razumijevanje faktora rizika za ovu bolest je najvažnije za poboljšanje prevencije bolesti i povećanje svijesti javnosti. Povijesno gledano BC je bio bolest industrijaliziranih regija, a najodgovorniji karcinogeni su duhanski dim i izloženost kemikalijama na poslu. Incidencija i smrtnost BC-a dramatično se razlikuje po regijama i ovisna je o izloženosti faktorima rizika, a također se razlikuje ovisno o ustroju zdravstvenog sustava i demografiji stanovništva. Probirne studije ukazuju na višu stopu preživljavanja ako se provodi *screening* s poznatim faktorima rizika u asimptomatskoj populaciji, ali to još uvijek nije postala standardna praksa.

Rak mokraćnog mjehura (BC) je deveti najčešći rak u svijetu i sedmi najčešći kod muškaraca. Svjetski podaci iz GLOBOCAN-a za 2012. godinu otkrili su da se godišnje javlja oko 430.000 novih slučajeva, a otprilike je 165.000 smrtnih slučajeva. Tri četvrtine novih slučajeva javlja se kod muškaraca, ali smrtnost specifična za bolest veća je u ženskoj populaciji. Razlozi nejednakosti u spolnoj incidenciji i smrtnosti objašnjava se razlikama u hormonskim profilima (aktivnosti puta spolnog steroidnog hormona), ali također i sustavne razlike u pravodobnosti upućivanja žena na pretrage primarne zdravstvene zaštite (7).

1.2.1 Stupnjevanje (graduiranje) tumora

Ocjenjivanje stupnja tumora jedan je od načina procjene težine bolesti, tj. govori nam koliko brzo rak može rasti i / ili se širiti. Tumori mogu biti niskog ili visokog gradusa. Tumorske stanice tumora visokog gradusa vrlo su abnormalne, slabo organizirane, a tumor ima tendenciju da vrlo ozbiljno ugrozi nečije zdravstveno stanje.

1.2.2 Stadij tumora

Stadij raka mokraćnog mjehura određuje se iz malog uzorka tkiva tumora uzetog biopsijom, nakon čega patolog u laboratoriju ispituje uzorak pod mikroskopom te određuje gradus i stadij raka.

S obzirom na uznapređovalost, tumori se dijele na slijedeći način (Slika 1).

Ta: Tumor zahvaća epitel mjehura i ne prodire u unutarnje slojeve.

Tis: Karcinom *in situ* (CIS) - rak visokog gradusa, ne prodire izvan epitela, ali je "ravan" tj. izgleda kao crvenkasta, baršunasta mrlja na površini mjehura.

T1: Tumor prolazi kroz epitel mjehura u laminu propriju, ali ne doseže mišićni sloj.

T2: Tumor raste u sloj mišića mjehura.

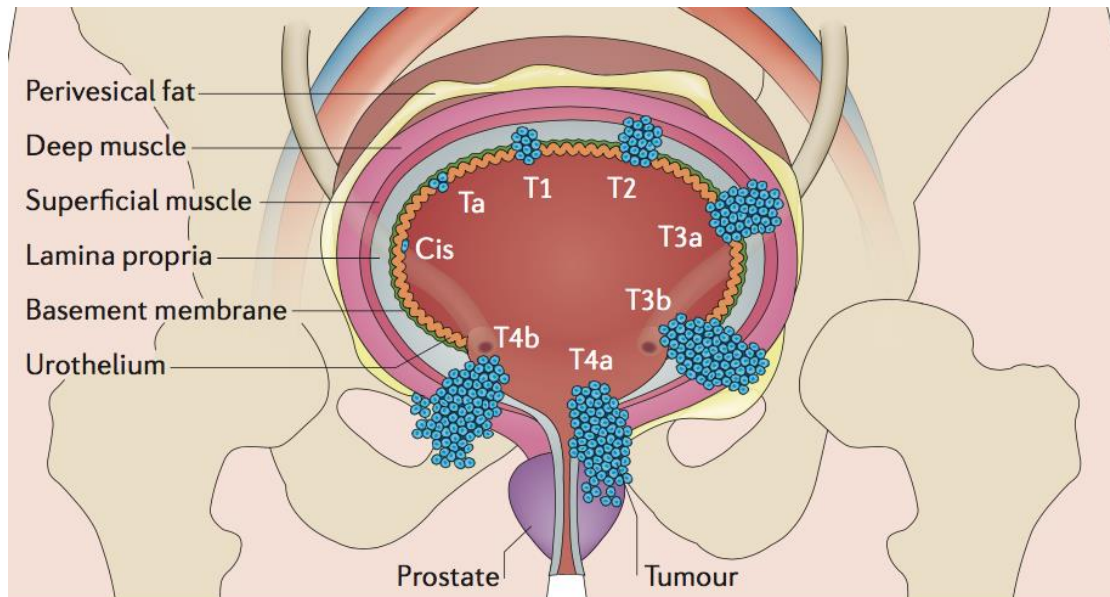
T3: Tumor prolazi kroz mišićni sloj u tkivo koje okružuje mokraćni mjehur.

T4: Tumor se proširio na obližnje strukture mjehura, kao što je prostata u muškaraca ili vagina kod žena.

NMICB

NMICB je rak mokraćnog mjehura koji je invadirao u zid mokraćnog mjehura ali nije zahvatio mišićni sloj, zbog čega ga se naziva ne-mišićni invazivni karcinomi mjehura (NMICB). Ti tumori su stupnjeva od Ta do T1 te su najčešći oblik tumora mjehura. Kod više od polovice bolesnika s tumorom niskog stupnja pojaviti će se recidiv tumora, a oko 6% će napredovati u viši stupanj. Tumori visokog stupnja T1 imaju stopu recidiva od oko 45%, a 17% istih vjerojatno će napredovati u viši stupanj.

Nakon dijagnoze, stope preživljavanja su prilično povoljne za pacijente s NMIBC. Preživljenje kod visokog stupnja bolesti kreće se oko 70-85% kroz 10 godina, dok je stopa preživljenja još veća kod tumora niskog stupnja. Međutim, važno je da se bolest rano dijagnosticira što pomaže liječnicima u predviđanju tijeka bolesti i odabiru najboljeg načina liječenja kako bi se spriječio njegov daljnji rast (8).



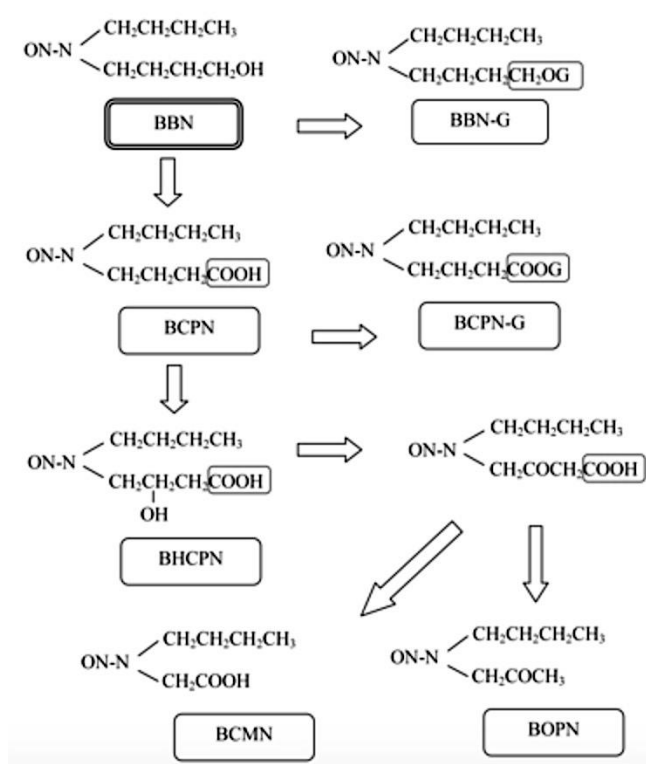
Slika 1. Stadiji raka mokraćnog mjehura određuju se na temelju invazije tumora kroz slojeve tkiva koji čine mjehur. Karcinom *in situ* (Cis) je ravna lezija visokog stupnja smještena u uroteliju. Ta tumori su papilarni tumori u urotelu koje nisu zahvatile laminu propriju. Tumori sa stupnjevima većim od Ta se smatraju invazivnim tumorima. T1 tumori invadiraju laminu propriju, a T2 tumori invadiraju i mišić mjehura. Patolozi često koriste izraz invazivni karcinom urotela u slučajevima kada se gnijezdo tumora nalazi ispod bazalne membrane koja se proteže u laminu propria (tj. T1 tumori), dok urolozi mogu upotrijebiti ovaj izraz za upućivanje na mišićno-invazivne bolesti (tj. T2 tumore), T3a i T3b tumori zahvatili su vanjske slojeve mjehura tkivo, a T4a i T4b tumori invadirali su strukture u susjedstvu mjehura, kao što su prostata ili zdjelični zid. Preuzeto iz: Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. Nat Rev Urol. 2018;15(3):143-154 (23).

1.3 BBN

BBN (*N*-butil-*N*-(4-hidroksibutil) nitrozamin) je bistra žuta tekućina, te je karcinogen koji se dobiva iz N-nitrozo spoja koji se nalazi u dimu cigareta. Metabolit je dibutilnitrozamina (DBN). I DBN i BBN induciraju tumore mokraćnog mjehura, ali DBN također može inducirati tumore jetre i jednjaka. BBN učinkovito izaziva rak mjehura kod laboratorijskih miševa i štakora.. BBN se obično daje oralnim putem, u vodi za piće, u dozi koja je u rasponu od 0,01-0,05%. Međutim, također se može primijeniti supkutano ili uvoditi izravno u mokraćni mjehur intravezikalnim ubrizgavanjem. Kada se BBN primjenjuje u vodi za piće, upotreba neprozirnih boca je neophodna, jer je fotoosjetljiv. Neki autori su izvijestili o intravezikalnom ukapavanju BBN-a s uspješnom indukcijom papiloma i karcinoma kod ženki štakora. Ostale istraživačke skupine koje su koristile isti put primjene BBN-a su proučavali oštećenje i popravak molekula DNA u epitelu mokraćnog mjehura štakora soja "Wistar". Ovaj put primjene ima neke prednosti - činjenica da se spoj nalazi samo u okolini urotela štiti životinje od sistemskog izlaganja. Ipak, konačno, bez obzira na svoje nedostatke, oralna primjena ostaje najčešći put za primjenu BBN-a.

BBN je indirektni kancerogen, tj. nakon ingestije metabolizira se uglavnom u jetri, ali i u mjehuru, u nekoliko metabolita. Alkoholna skupina BBN oksidira se u karboksilnu skupinu enzimskim sustavom alkohol / aldehid dehidrogenaza, što rezultira *N*-butil-*N*-(3-karboksipropil) nitrozaminom (BCPN) (Slika 2). BBN se također pretvara u BBN-glukoronide. Navedena metabolička reakcija katalizirana je uridin difosfat-glukuronoziltransferazom, ali ti metaboliti nemaju karcinogena svojstva. Odnosno, BCPN, za razliku od BBN-glukoronida, je karcinogen mokraćnog mjehura. BCPN dolazi do mokraćnog mjehura kroz urin te je u kontaktu s urotelom, kovalentno se veže na stanične makromolekule te inicira kancerogeni proces. Nekoliko drugih, manjih metabolita, koji su rezultat beta-oksidacije prema Knoop mehanizmu, također se mogu detektirati, kao što je *N*-butil-*N*-(2-hidroksi-3-karboksipropil) nitrozamin, *N*-butil-*N*-(karboksimetil) nitrozamin i *N*-butil-*N*-(2-oksopropil) nitrozamin. Zbog svog mehanizma djelovanja, BBN se smatra genotoksičnim ili DNA-reaktivnim kancerogenom; uzrokuje oštećenje DNA u epitelu mokraćnog mjehura i selektivno inducira tumore mokraćnog mjehura kod miševa i štakora. U BBN-induciranim

tumorima mokraćnog mjehura otkrivene su klonske mutacije, pretežno G-A ili C-T prijelaza (15/27, 56%) i supstitucije T (10/27, 37%) (24).



Slika 2. Metabolizam N-butil-N-(4-hidroksibutil)nitrozamin(BBN). (BBN-G: BBN glikoronid; BCPN: N-butil-N-(3-karboksipropil)nitrozamin; BCPNG: BCPN-glukoronid; BHCPN: N-butil-N-(2-hidroksi-3karboksi-propil)nitrozamin; BCMN: N-butil-N-(karboksimetil)nitrozamin; BOPN: N-butil-N-(2-oksopropil)nitrozamin. Preuzeto iz: C. Vasconwlos-Nobrega, A. Colaco, C. Lopes, P.A. Oliveira. BBN as an Urothelial Carcinogen. In vivo. 2012;26: 727-740 (24).

1.3.1 Urotelne lezije inducirane BBN-om

BBN-om inducirane urotelijske lezije kod glodavaca nalikuju ljudskim urotelijskim lezijama u morfološkim karakteristikama. Međutim, osjetljivost na BBN-inducirane tumore mjehura značajno se razlikuje među sojevima miša i štakora. Mišji i štakorski spektar urotelijskih lezija ovisi o spolu, soju, starosti i razdoblju izlaganja BBN-u. Makroskopske lezije promatrane kod miševa i štakora ovise o duljini izlaganja spoju. Karcinom mokraćnog mjehura kod miševa razvija se relativno rano, makroskopske lezije se mogu uočiti nakon 12 tjednog izlaganja BBN-u (0,05%). Kod štakora, vrijeme izlaganja BBN-u (0,05%) mora biti najmanje 20 tjedana kako bi se omogućio razvoj makroskopskih lezija. Makroskopski, lezije miševa imaju nodularne karakteristike. Dimenzije nodula su varijabilne, u rasponu od nekoliko milimetara do potpunog zauzimanja cijelog lumena mjehura. Mikroskopski, miševi obično razvijaju displaziju, s ili bez hiperplazije, karcinom *in situ* i invazivni karcinom (9).

1.3.2 Genetske promjene u BBN-induciranim urotelnim tumorima

Rak mokraćnog mjehura kod ljudi povezan je s nekoliko genetskih i kromosomskih promjena. Kod miševa postoje neka istraživanja koja opisuju nekoliko genetskih i kromosomskih promjena. Te genetske promjene slične su onima kod ljudi. BBN-inducirani tumori glodavaca, posebno tumori kod miševa, imaju mutacije gena p53, ili mutacije u genima povezanim s p53 putem, posebno kod tumora visokog gradusa. Također, brojni kromosomski poremećaji i mutacije u drugim ključnim genima za kontrolu rasta često su otkriveni u tumorima te vrste, čak i u ranim neinvazivnim stadijima. BBN-inducirani tumori također pokazuju povišenu razinu receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR). Ti nalazi potvrđuju sličnost modela glodavaca s rakom mjehura čovjeka i naglašavaju primjenjivost takvih modela za terapijske studije (9).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost mikrobioma s pojavom tumora mokraćnog mjehura izazvanog konzumacijom kancerogena BBN-a, odnosno ima li mikrobiom utjecaj na metabolizam BBN-a i njegovu konverziju u kancerogeni oblik BPCN. Do odgovora smo pokušali doći ispitivanjem metabolizma karcinogena BBN-a, točnije ispitivanja koncentracije njegovog metabolita BCPN-a u sadržaju fecesa na mišjim modelima (*in vivo*), ali i testiranjem samog fecesa (*in vitro*).

3 Metode

3.1 Ekstrakcija

Ekstrakcija tekućina-tekućina je proces odvajanja koji se sastoji od prijenosa otopljene tvari iz jednog otapala u drugo, pri čemu se dva otapala međusobno ne miješaju ili djelomično miješaju. Često je jedno od otapala voda ili vodena smjesa, a drugo je nepolarna organska tekućina. Kao i kod svih postupaka ekstrakcije, ekstrakcija tekuće-tekuće sadrži korak miješanja (kontaktiranja), nakon čega slijedi korak razdvajanja faza. Važno je uzeti u obzir oba koraka u odabiru otapala i načina rada. Prema tome, dok je snažno miješanje pogodno za prijenos ekstrakta iz jednog otapala u drugo, ono također može narušiti lakoću razdvajanja faza stvaranjem emulzija.

Ravnoteža se postiže kada je kemijski potencijal ekstrahirane otopine jednak u obje faze. Praktično, ovo pravilo dovodi do definicije "koeficijenta distribucije", K , kako slijedi:

$$K = C_1/C_2$$

gdje su C_1 i C_2 ravnotežne koncentracije otopljene tvari u dvije faze. Omjer raspodjele je izraz relativne preferencije otopljene tvari za otapala. U idealnim rješenjima (tj. gdje se može pretpostaviti da je kemijski potencijal proporcionalan koncentraciji) omjer raspodjele pri danoj temperaturi je praktički konstantan, tj. neovisan o koncentraciji.

U nekim slučajevima, učinkovitost postupka ekstrakcije tekuće-tekuće može se značajno poboljšati modificiranjem omjera raspodjele. Prema tome, organska kiselina preferira nepolarno otapalo kada nije disocirana (tj. pri niskom pH) i vodeno otapalo kada je disocirana (tj. pri visokom pH) (12).

Shodno navedenome, kao organsko otapalo za ekstrakciju koristili smo dietil eter, gdje smo nailazili na relativno uobičajenu prepreku opisanu ranije. Točnije, nastajanje emulzija. Opisani problem smo rješavali postupkom centrifugiranja (1 min pri 15000G).

Također, dodavanjem koncentrirane HCl modificirali smo omjer raspodjele s ciljem boljeg prijenosa metabolita.

3.2 Kromatografija

Kromatografija je naziv za grupu laboratorijskih tehnika za razdvajanje složenih smjesa. Naziv potiče od grčkih riječi *chroma* - boja i *grafein* - pisati. Kromatografske metode razdvajanja zasnivaju se na različitoj raspodjeli komponenata uzorka između dvije faze, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Mobilna faza može biti tekuća ili plinska. Stacionarna faza je nepokretna faza, koja je fiksirana u koloni (GC i LC) ili ploči (npr. Silikagel u TLC), na kojoj se određeno vrijeme zadržavaju sastavnice smjese (analiti) koju razdvajamo. Kromatografske metode uključuju kretanje ispitivane smjese, otopljene u "mobilnoj fazi", kroz "stacionarnu fazu" (eluiranje), čime se dijelovi smjese razdvajaju na komponente. Vrijeme za koje analit prođe kroz kromatografski sistem pod određenim uvjetima (temperatura i pritisak) naziva se retencijsko vrijeme (t_R), a vizualni prikaz rezultata kromatografskog postupka naziva se kromatogram. Kromatografija može biti analitička i preparativna. U analitičkoj kromatografiji se obično radi s malim uzorcima i koncentracijama. Preparativna kromatografija se bavi razdvajanjem komponenti iz smjese radi daljnje obrade, pa se može smatrati metodom pročišćavanja (14).

3.2.1 Tankoslojna kromatografija (TLC)

Tankoslojna kromatografija (TLC) je kromatografska tehnika koja se koristi za razdvajanje komponenata smjese koristeći tanku stacionarnu fazu podržanu inertnom podlogom. TLC je analitički alat koji se široko koristi zbog svoje jednostavnosti, relativno niske cijene, visoke osjetljivosti i brzine odvajanja. TLC djeluje na istom principu kao i sva ostale vrste kromatografije. Cilj TLC-a je dobivanje dobro definiranih i dobro odvojenih migracijskih točaka/pruga na kromatografskoj ploči.

Faktor zadržavanja

Nakon razvijanja kromatograma, svaki spoj pojavljuje se u vidu točke ili pruge na različitim udaljenostima od početne crte. Svaka točka/pruga ima svoj faktor zadržavanja (R_f) koji je jednak omjeru udaljenosti migracije pojedinog spoja i ukupne udaljenosti koju je otapalo doseglo. R_f formula je:

$$R_f = \text{udaljenost koju je uzorak prešao} / \text{udaljenost koju je prešlo otapalo}$$

Vrijednost R_f može se upotrijebiti za identifikaciju spojeva zbog njegove jedinstvenosti za svaki spoj, uz uvjet da je kromatografija provedena pod istim kromatografskim uvjetima (vrsta stacionarne faze, omjer otapala). Kada se uspoređuju dva različita spoja pod istim uvjetima, spoj s većom R_f vrijednošću je manje polaran i ima manju tendenciju vezanja za stacionarnu fazu, dok kod polarnog spoja to nije slučaj te ima nižu R_f vrijednost.

Na R_f vrijednosti i obnovljivost mogu utjecati brojni različiti faktori kao što su debljina sloja, vlaga na TLC ploči, zasićenje posude, temperatura, dubina mobilne faze, priroda TLC ploče, veličina uzorka i parametri otapala. Ovi parametri obično uzrokuju povećanje vrijednosti R_f . Međutim, u slučaju debljine sloja, vrijednost R_f se smanjuje jer se pokretna faza kreće sporije po ploči.

3.2.1.A Aparat

3.2.1.A.I Ploče (stacionarna faza)

Ploče se mogu pripremiti u laboratoriju, ali se najčešće kupuju. Silikagel i aluminijev oksid nalaze se među najčešćim stacionarnim fazama, a dostupne su i druge. Također, mnoge ploče sadrže spoj koji fluorescira pod kratkovalnim UV zračenjem (254 nm). Podloga od TLC ploča je od stakla, aluminijska ili plastike.

3.2.1.A.II Otapalo (mobilna faza)

Ispravan odabir otapala je možda najvažniji dio razvijanja TLC odvajanja, a određivanje najboljeg otapala zahtijeva određeni broj pokušaja i pogrešaka. Kao i kod odabira ploče, treba imati na umu kemijska svojstva analita.

Ako je jedna komponenta smjese netopiva u danom otapalu, ali druga komponenta je topljiva u njoj, razdvajanje će uglavnom biti dobro. Koliko brzo spojevi putuju po ploči ovisi o dvije stvari:

Ako je spoj topljiv u otapalu, on imati veći R_f , a ako spoj ima tendenciju jačeg vezanja za stacionarnu fazu, to će uzrokovati manji pomak na kromatogramu veći R_f . Kiseline, baze i jako polarni spojevi često stvaraju duge mrlje, a ne točke u neutralnim otapalima. Duge mrlje otežavaju izračunavanje R_f te mogu prekriti druge sastavnice smjese. Dodavanje malog postotka kiseline (octene ili mravlje) mobilnoj fazi može smanjiti stvaranje mrlja. Za polarne spojeve dodavanje malog postotka metanola također može poboljšati rezultate.

Hlapljiva otapala treba koristiti samo jednom. Ako se mobilna faza koristi više puta, rezultati neće biti konzistentni ili ponovljivi (13).

Shodno navedenome, u našem istraživanju, uzimajući u obzir svojstva našeg uzorka, za stacionarnu fazu odabrali smo Silikagel 60 F254 ploče. Nadalje, za mobilnu fazu odabrali smo smjesu: kloroform:metanol:ledena octena kiselina (18:1:1) koju smo mijenjali nakon svakog drugog razvijanja. Kromatogram smo razvijali u mraku u trajanju od otprilike dva sata.

3.2.2 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili HPLC (eng. *High performance liquid chromatography* ili *high pressure liquid chromatography*) predstavlja vrstu kromatografije kojom se postižu izuzetno dobra razdvajanja čak i veoma složenih smjesa. HPLC je našla široku primjenu u analitičkoj kemiji i biokemiji, a koristi se za razdvajanja, identifikaciju i kvantitativno određivanje različitih vrsta spojeva (Slika

3). HPLC razdvajanja se zasnivaju na različitoj raspodjeli supstance između dvije faze: tekuće (mobilne faze) koja nosi smjesu analita kroz porozni materijal (stacionarnu fazu), pri čemu, uslijed različite vrste interakcija analita sa stacionarnom fazom, dolazi do razlike u vremenu putovanja komponenti analiziranog uzorka. Visok pritisak omogućava kontinuirani protok mobilne faze kroz sitna zrnca stacionarne faze i uspostavljanje dinamičke ravnoteže sastavnica smjese između mobilne i stacionarne faze. Dinamička ravnoteža je preduvjet dobre selektivne raspodjele komponenti u ispitivanom uzorku.

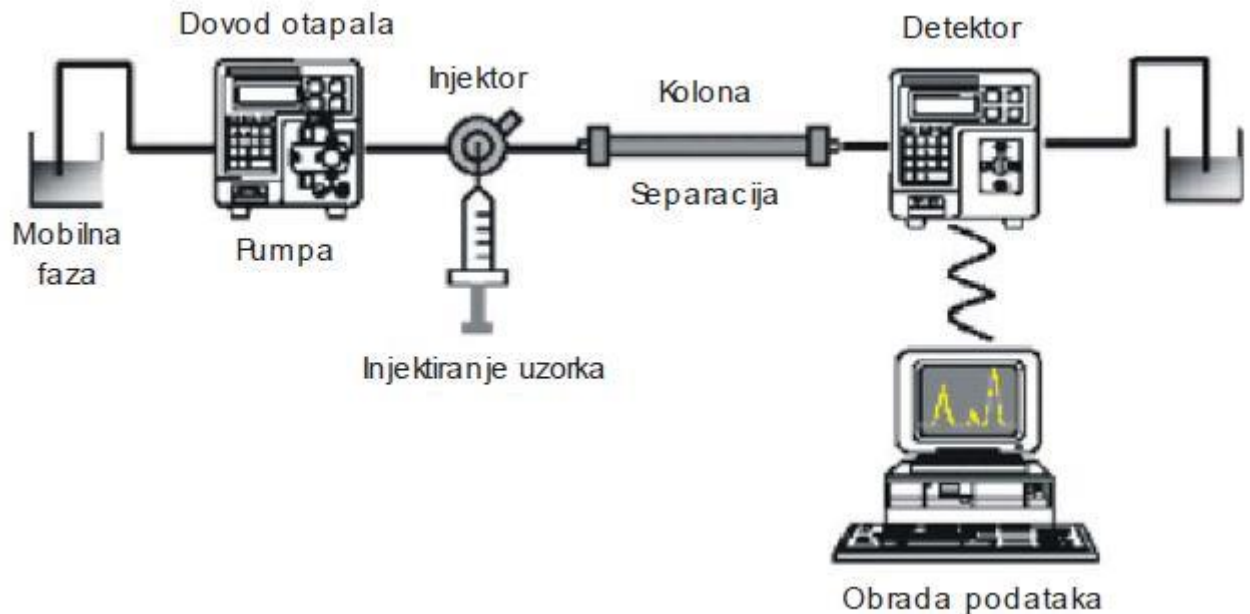
Najveća prednost HPLC je u tome što se mogu analizirati i razdvajati teško hlapljive supstance (za razliku od plinske kromatografije) i što se analize provode pri sobnoj temperaturi. Osnovni dijelovi HPLC sistema su: pumpa - stvara pritisak i omogućava stalnu brzinu mobilne faze, kolona, detektor - najčešće se koriste UV/Vis detektori.

Mobilne faze koje se koriste u HPLC su vodeno-organske smjese. Otapala za mobilnu fazu moraju se međusobno miješati u svim omjerima. Najčešća otapala koja se koriste u HPLC kromatografiji na reverznoj stacionarnoj fazi su voda, metanol i acetonitril.

Stacionarna faza (punjenje HPLC kolona) je materijal napravljen od sitnih čestica Silikagela koje su najčešće modificirane s raznim organskim, najčešće, alkilnim skupinama. U tom slučaju govorimo o nepolarnoj, reverznoj stacionarnoj fazi i to je najčešća stacionarna faza u HPLC tehnici. Ako radimo s kolonama koje su punjene nemodificiranim Silikagelom tada govorimo o polarnoj, normalnoj, stacionarnoj fazi. Koji će tip kolone biti izabran ovisi o spoju kojeg analiziramo i cilju analize.

Postoje različiti tipovi detektora u HPLC tehnici, UV/VIS, detektori na bazi mjerenja fluorescencije, indeksa refrakcije, maseni (MS), NMR i drugi.

Temperatura također utječe na određivanje kod tekućinske kromatografije, posebno kada je riječ o otapalima male molekulske mase (14).



Slika 3. Shematski prikaz HPLC sustava. Shema prikazuje razdvojene ključne elemente HPLC sustava. Preuzeto iz: Nesek, B. (2004) Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni. . Pristupljeno 24. travnja. 2016 (25).

3.3 Razvoj i validacija HPLC metode

U cilju održavanja visoke kvalitete rezultata neke analize, neophodna je pouzdana i točna metoda analitičkog ispitivanja. Ako poznajemo pravila kreiranja metode, razvoj iste ne bi trebalo predstavljati problem.

Širok spektar opreme, kolone, eluentata i operativnih parametara čini da razvoj metode za tekućinsku kromatografiju visoke performanse (HPLC) izgleda složeno. Proces je pod utjecajem prirode analita i prati sledeće korake:

Korak 1 – izbor HPLC metode

Korak 2 – optimizacija metode

Korak 3 – validacija metode

Prilikom razvoja i optimizacije metode prvo pokušavamo raditi s najčešće upotrebljivanim kolonama i stacioniranim fazama (podaci iz literature), trebamo temeljno istražiti binarne mobilne faze prije prelaska na ternarne, te razmišljati o

faktorima koji su značajni za postizanje željenog razdvajanja.

Promjena sastava mobilne faze je najbolji način optimizacije selektivnosti, dok promjena temperature ima značajno manji utjecaj na promjenu selektivnosti. pH će znatno utjecati samo na zadržavanje slabih kiselina i baza.

3.3.1.A Izbor HPLC metode

Prvi korak je pregled literature radi utvrđivanja je li odvajanje već prethodno izvršeno, i ako je, pod kojim uvjetima. Ovo štedi vrijeme, otklanjajući nepotreban eksperimentalni rad.

Razmatranje problema mora sadržati sljedeće korake:

Priprema uzoraka, zahtjeva li uzorak sušenje, koncentriranje, filtraciju, ekstrakciju ili čišćenje? Također potrebno je znati je li potrebno dodavanje reagensa kako bi poboljšali osjetljivost detektora i selektivnosti.

Vrste kromatografije:

HPLC postupak s linearnim gradijentom koristi istu smjesu otapala od početka do kraja analize.

Kod HPLC postupka s gradijentnom eluacijom mijenja se sastav otapala tijekom analize na način da se programirano povećava polarnost otapala tijekom analize na način da se postepeno povećava udio polarnijeg otapala. Ova vrsta kromatografije se koristi naročito kod kompleksnih uzoraka s velikim brojem komponenti (20-30). Postupak se također može koristiti za uzorke koji sadrže analite sa širokim opsegom retencijskih vremena.

Dimenzije kolona:

Klasične analitičke HPLC kolone su dužine od 15- 25 cm s česticama stacionarne faze veličine 5Å. U novije vrijeme koriste se kratke kolone od 5 do 10 cm, s manjim česticama stacionarne faze (3Å i manje) da bi se smanjilo vrijeme potrebno za razvoj metode, a time smanjilo i količinu potrošenih otapala.

Detektori:

Potrebno je postaviti sljedeća pitanja: imaju li analiti kromofore (za UV detekciju)? Je li potrebna selektivnija ili osjetljivija detekcija? Koje su granice detekcije? Zahtjeva li uzorak dodatak reagensa za poboljšanje detekcije.

Za analizu supstanci u tragovima treba koristiti fluorescentni (ako spojevi koje održujemo floresciraju) ili elektrokemijski detektor (u slučaju kada analit ima oksidoredukcijska svojstva). Za preparativnu HPLC analizu poželjan je detektor promjene indeksa prelamanja, jer mjeri visoke koncentracije analita bez preopterećenja.

3.3.1.B Optimizacija sustava

Potrebno je pronaći ravnotežu između kvalitete razdvajanja i vremena koje je potrebno za analizu. Parametri koji nam služe za pronalaženje iste su: dimenzija kolone, veličina čestica punjenje te brzina protoka. Navedeni parametri se mogu mijenjati bez utjecaja faktora kapaciteta ili selektivnosti.

3.3.1.C Validacija metode

Osnovni validacijski parametri koji se sprovode tijekom validacije analitičke metode su:

- točnost
- preciznost
- specifičnost
- granica detekcije/kvantifikacije
- linearnost i radno područje
- robusnost.

Validacija metode mora imati napisan i odobren protokol prije samog korištenja. Sve kemikalije i reagensi koji se upotrebljavaju moraju biti na najvišem (HPLC) stupnju čistoće. Prilikom izrade eksperimenta koristi se deionizirana voda.

Točnost metode

Točnost metode nam govori o podudaranju između stvarne i vrijednosti dobivene primjenom analitičkog postupka određeni broj puta. Točnost se određuje na minimalno tri koncentracijske točke unutar radnog područja. Rijetko se događa da se rezultati nekoliko uzastopno ponovljenih testova preklapaju, stoga rezultat kojim se procjenjuje točnost metode izražava se kao postotak iskorištenja (15).

Preciznost metode

Preciznost metode definiramo kao slaganje između niza mjerenja provedenih iz istog homogenog uzorka prema propisanom analitičkom propisu. Ovisno o uvjetima u kojima se preciznost određuje razlikujemo: ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost. Ako navedene korake provodimo u istom laboratoriju, a ispitivanje provodi ista osoba uz korištenje istih instrumenata i kemikalija govorimo o ponovljivosti. Ponovimo li taj postupak nekoliko puta unutar istog dana, tada govorimo o dnevnoj preciznosti unutar dana, odnosno ako se postupak ponavlja nekoliko dana uzastopno tada govorimo o međudnevnoj preciznosti. Prikazani rezultati trebaju sadržavati standardnu devijaciju (SD) koja predstavlja mjeru raspršenosti podataka u skupu te relativnu standardnu devijaciju (RSD) izraženu u postocima, koja se dobiva dijeljenjem standardne devijacije sa srednjom vrijednosti. Granice prihvatljivosti se definiraju ovisno o vrsti analize, prirodi uzorka te koncentraciji analita (16,17).

Granica detekcije/kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) je najmanja koncentracija ispitivane tvari koja se može detektirati, ali ne i kvantificirati. Za razliku od granice detekcije, granica kvantifikacije (LOQ) predstavlja najnižu koncentraciju kod koje je moguća točna kvantifikacija ispitivane tvari i s kojom se postiže prihvatljivo iskorištenje (*recovery*)

(15).

Linearno dinamičko područje

Linearno dinamičko područje je područje koncentracija analita u kojem imamo linearnu ovisnost koncentracije analita i neke mjerene vrijednosti (apsorbancija, fluorescencija, indeks prelamanja). Ovaj parametar određuje se mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije odabranog spoja pri čemu se preporučuje najmanje pet različitih koncentracijskih razina kroz tri ponavljanja. Procjenjuje se na dva načina: matematički i grafički. Matematički se pomoću regresijske analize izrazi jednadžba pravca ($y = ax + b$) te izračuna koeficijent korelacije (k). Nagib pravca (a) parametar je koji izravno ukazuje na osjetljivost metode. Odsječak pravca (b) uglavnom ukazuje na sustavnu pogrešku. Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza:

-grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije

-grafički prikaz relativnih signala (omjer signala i odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x log skale (15)

Robusnost metode

Robusnost označava otpornost analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Kod ispitivanja robusnosti mijenjaju se radni parametri unutar realnih granica te se prati kvantitativna promjena rezultata. Ako je utjecaj promjene parametra metode unutar specifikacije metode, kaže se da je parametar u području robusnosti metode. Parametre koji bi mogli utjecati na rezultate metode treba držati pod nadzorom i jasno ih naznačiti kod opisa metode. Tipični parametri kod ispitivanja robusnosti metode su stabilnost otopina, dužina trajanja ekstrakcije, ispitivanje utjecaja različitih filtera, provjera preciznosti i linearnosti metode uz rad nekog drugog kemičara i uz korištenje drugih instrumenata i kemikalija u laboratoriju. Kod instrumentalnih metoda tipični parametri su promjena pH vrijednosti mobilne faze, promjena sastava mobilne faze (HPLC) te korištenje različitih kolona.

Također važno je naznačiti da referentne supstance treba svježe pripremiti, jer s vremenom one mijenjaju svoje osobine. Mogući uzroci su: apsorpcija na stijenke posuđa ili razaranje pod utjecajem svjetlosti ili otapala. Uzorci i standardi trebaju se testirati tijekom perioda od najmanje 24 sata, a dobivene vrijednosti se uspoređuju s rezultatima analiza iz svježe pripremljenih standarda.

3.4 HPLC analiza

Koncentracija BBN-a i BCPN-a određena je tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) na aparatu Prekin Elmer Series 200 (autosampler PE Series 200, binarna pumpa PE Series 200, UV/VIS detektor PE Series 200, vakum otplinjač (tekuće faze) PE Series 200, Peltier column owen PE Series 200). Korištena je Ultra Cyano kolona 5 μ m, 250 x 4,6 mm Restek. Detekcija razdvojenih pikova je izvršena pomoću UV detektora pri 239 nm. Kao mobilna faza korištena je smjesa otapala: A: acetonitril/voda = 15/85 uz dodatak 0,05 % TFA (trifluoroctena kiselina), B: acetonitril.

Razdvajanje komponenti je izvedeno primjenom sljedećeg gradijenta:

- 0 min: 100 % A, 0 % B
- 10 min: 100 % A, 0 % B
- 30 min: 20 % A, 80 % B
- 35 min: 20 % A, 80 % B
- 37 min: 100 % A, 0 % B
- 45 min: 100 % A, 0 % B

Protok mobilne faze iznosio je 1,2 ml/min. Injektirano je 10 μ l otopine uzorka, automatski, korištenjem autosampler-a. Kolona je termostatorana pri temperaturi od 30°C.

Komponente prisutne u uzorcima su identificirane uspoređivanjem njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenom standarda. Korišteni su standardi: BBN ($R_t= 7,72$) i BCPN ($R_t= 9,00$).

4 Materijali i razvoj eksperimenta

4.1 Eksperimentalne životinje

Tumorogeni potencijal mikrobioma testirali smo na BBN-inducirnom mišjem modelu za rak mokraćnog mjehura. Koristili smo miševe C57BL/6J divljeg tipa koje smo nabavili od tvrtke Jackson Laboratory. Miševe iz pojedinog legla nasumično smo rasporedili u pokusnu i kontrolnu grupu. Pokusi na miševima odobreni su od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i od Ministarstva poljoprivrede. U istraživanje je uključeno 22 miša koji su težili oko 30 grama. Držani su u kontroliranim uvjetima gdje je temperatura bila $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, a miševi su bili izloženi ciklusu svjetla i tame 12/12 sati.

4.2 Eksperimentalni modeli

4.2.1 Model izazivanja tumora mokraćnog mjehura u miševa s BBN-om (skupina miševa za eksperiment tipa 1)

Prvoj skupini miševa inducirani su tumori BBN-om (akutni model u trajanju od 2 tjedna) te su pili antibiotike širokog spektra kako bi se reducirao broj bakterija (u daljnjem tekstu: grupa AB), a druga grupa miševa kojima su inducirani tumori BBN-om nisu primali antibiotike (u daljnjem tekstu: grupa B). Na početku tretmana miševi su bili stari od 6 do 8 tjedana.

Tako inducirani tumori morfološki i histološki vrlo su slični humanim tumorima (10). Miševi su uzimali BBN u koncentraciji 0,05% u vodi za piće nakon čega su žrtvovani. Miševi koji su primali i antibiotike širokog spektra prvo su stavljeni na predtretman samo s antibioticima u trajanju od 2 tjedna nakon čega smo krenuli s tretmanom u kojem su primali BBN kao 0,05% otopinu i antibiotike. Slijedili smo već uhodani protokol za antibiotski tretman miševa (11).

Kod ovog tipa eksperimenta cilj je bio ustvrditi postoji li razlika u koncentracijama BCPN-a u stolicama miševa skupine koja je bila na tretmanu antibioticima i BBN-om (grupa AB) i one koja je bila tretirana samo s BBN-om (grupa B).

4.2.2 Model miševa s izmijenjenim mikrobiomom bez indukcije tumora mokraćnog mjehura (skupina miševa za eksperiment tipa 2)

U ovom modelu miševi su tretirani samo antibioticima. Prva grupa miševa tretirana je antibioticima 2 tjedna (u daljnjem tekstu: grupa A2), dok je druga grupa miševa tretirana istim antibioticima ali 4 tjedna (u daljnjem tekstu: grupa A4). Zajednički naziv kod interpretacije rezultata za obe skupine u daljnjem tekstu označava se kao A. Kao pozitivnu kontrolu koristili smo sadržaj crijeva miševa koji su pili običnu vodu (u daljnjem tekstu: grupa K+). Dok smo kao negativnu kontrolu koristili sadržaj crijeva istih miševa, kojeg smo nakon uzorkovanja autoklavirali kako bi osigurali medij bez prisutnosti živih bakterijskih stanica (u daljnjem tekstu: K-).

S ovim skupinama miševa cilj je bio utvrditi utječe li mikrobiom crijeva na metabolizam BBN-a.

Imali smo 6 različitih eksperimentalnih skupina:

B – Akutni model, miševi koji su konzumirali samo 0,05% otopinu BBN-a u vodi za piće kroz dva tjedna.

AB – Akutni model, dvotjedni predtretman širokospektralnim antibioticima nakon čega slijedi također dvotjedni tretman otopinom BBN (0,05%) s antibioticima u vodi za piće.

A4 – Miševi na četverotjednom tretmanu antibioticima širokog spektra.

A2 – Miševi na dvotjednom tretmanu antibioticima širokog spektra.

A4 i A2 se zajedno označavaju kao grupa **A**.

K+ – pozitivna kontrolna skupina, miševi koji su pili samo vodu.

K- – negativna kontrolna skupina, miševi koji piju samo vodu, a kojima je stolica autoklavirana. (To jest, u usporedbi s pozitivnom kontrolom, razlike se pojavljuju tek kod obrade uzoraka, svaki uzorak stolice koji pripada negativnoj kontroli biva autoklaviran netom prije inkubacije).

Sastav mješavine antibiotika:

Miševima su davani antibiotici otopljeni u vodi za piće (Tablica 1): 100 µg/ml neomicina, 50 µg/ml vankomicina, 100 µg/ml metronidazola, 50 µg/ml streptomicina i 100 U/ml penicilina. Svježa otopina antibiotika je pripremana svaki tjedan, u bočici volumena 600 ml.

Tablica 1. Korišteni antibiotici. Prikazano je ime, dobavljač i formula pojedinog antibiotika.

ANTIBIOTIK	FIRMA	FORMULA
Vankomycin	Pharma swiss	$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$
Peniciline G sodium salt	Sigma P3032-10MU	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$
Neomycin trisulfate salt hydrate	Sigma N6386-5G	$C_{23}H_{46}N_6O_{13} \cdot 3H_2SO_4 \cdot xH_2O$
Metronidazole	Sigma M3761-5G	$C_6H_9N_3O_3$
Streptomicine sulfate salt	Sigma S6501 25g	$((C_{21}H_{39}N_7O_{12})_2 \cdot 3H_2O_4S)$

4.3 Uzorkovanje

Nakon izolacije probavnog trakta uzet je crijevni sadržaj (feces) iz različitih dijelova crijeva. Točnije, zasebno smo uzorkovali početni dio tankog crijeva (jejunum), debelo crijevo (kolon) te završno crijevo (cekum) (u daljnjem tekstu: grupa sa sufiksom g, d, odnosno c; npr: A4g). Ukoliko skupina nema sufiks (npr: A2) uzorkovan je kompletan sadržaj crijeva (tj. iz svih dijelova probavnog sustava).

4.4 Obrada uzoraka

4.4.1 Razrjeđivanje i priprema uzoraka stolice za ekstrakciju

Korak 1:

Prvi korak za uzorke fecesa koje smo koristili u eksperimentu tip.1 (grupe B i AB) uključuje direktno razrjeđivanje prikupljenih uzoraka crijevnog sadržaja s 2 ml destilirane vode.

Dok je isti korak za uzorke crijevnog sadržaja korištenih u eksperimentu tip 2 (grupe A, K+ i K-) nešto složeniji. Naime, riječ je o miševima koji su bili samo na tretmanu antibioticima, ili su pili samo vodu – kontrolna skupina. Već smo napomenuli da je cilj ovog eksperimenta otkriti mogu li bakterije iz crijeva metabolizirati BBN-a u njegov kancerogeni metabolit BCPN. Ako mogu, željeli smo utvrditi je li se ta sposobnost smanjila redukcijom crijevne flore pod utjecajem vremenski duljeg antibiotskog tretmana.

Shodno tome, kako BBN nije prisutan u uzorku, dodajemo ga naknadno. Točnije, u svaku posudicu sa stolicom dodali smo 2 ml 0,05% BBN-a (ista koncentracija koja je prisutna u vodi za piće). Tako pripravljene uzorke inkubirali smo 20 sati pri 37⁰C. Važno je napomenuti da su uzorci za negativnu kontrolu (grupa K-) autoklavirani prije predhodno navedenog koraka.

Korak 2:

Nakon prvog koraka, svi uzori prolaze kroz istu proceduru. Sve uzorke smo centrifugirali (1700G, 20 min) te filtrirali kroz Nylon injekcijske filtere (0,45 μ m, 13 mm).

4.4.2 Tankoslojna kromatografija i priprema uzorka za HPLC

Tankoslojna kromatografija je kromatografska tehnika koja se koristi za razdvajanje komponenata smjese koristeći tanku stacionarnu fazu podržanu inertnom podlogom.

Tablica 2. Protokol izvođenja tankoslojne kromatografije. Protokol taksativno i u pravilnom slijedu navodi pojedine radnje koje su dio postupaka tankoslojne kromatografije i pripreme za HPLC.

1	Pripravljeni uzorak stolice razrijedili smo destiliranom vodom do 2 ml
2	U uzorak smo dodali smo 13,5 μ l 12N HCl
3	Ekstrahirali smo uzorak 3 puta uzastopno s 2 ml etil-acetata. Nakon svakog dodatka etil-acetata smjesa je vorteksirana 45 s
4	Gornji organski sloj koji smo skupili u zasebnu epruvetu te sušili bezvodnim natrijevim sulfatom
5	Centrifugirali smo uzorke 2 min pri 1500g, te dekantirali organski sloj u nove epruvete
6	Postupak uklanjanja otapala sušenja proveli smo u vakuumskom koncentratoru (speedVac), vrijeme sušenja variralo je o količini zaostale vode, ali trajalo je ukupno oko 40 min (nakon oko 20 min sušenja, uzorak smo prebacivali u male eppendorf tubice od 1,5 ml te nastavili sušenje još oko 20 min)
7	Osušeni talog na dnu tubice otopili smo u 200 μ l etil-acetata te nanosili na ploču za razvijanje – Silikagel 60 F254. TLC kromatografiju smo razvijali sa smjesom: kloroform:metanol:ledena octena kiselina (18:1:1) u mraku. Uz uzorke na ploču se nanosila i otopina BBN odnosno BCPN koja nam je služila da nakon kromatografije možemo odrediti trake koje nam sadrže željene spojeve.
8	Nakon provedene tankoslojne kromatografije, sastrugali smo odgovarajuće trake s ploče, a svaki dobiveni uzorak otopili u 4 ml acetona. Najčešće smo nanosili dva uzorka.
9	Nakon jednostavne ekstrakcije filtrirali smo pojedini uzorak kroz Nylon syringe filtere (0,45 μ m, 13 mm)
10	Alikvot od 3,5 ml tako dobivenog uzorka koncentrirali smo u vakuumskom koncentratoru (SpeedVac) do potpunog sušenja oko otprilike 30 min
11	Dobiveni talog nakon sušenja otpili smo u 200 μ l smjese izopropanol:acetonitril (4:1) te prebacili u HPLC vijale s umetkom za male volumene (200 μ l).

4.4.3 Parametri validacije

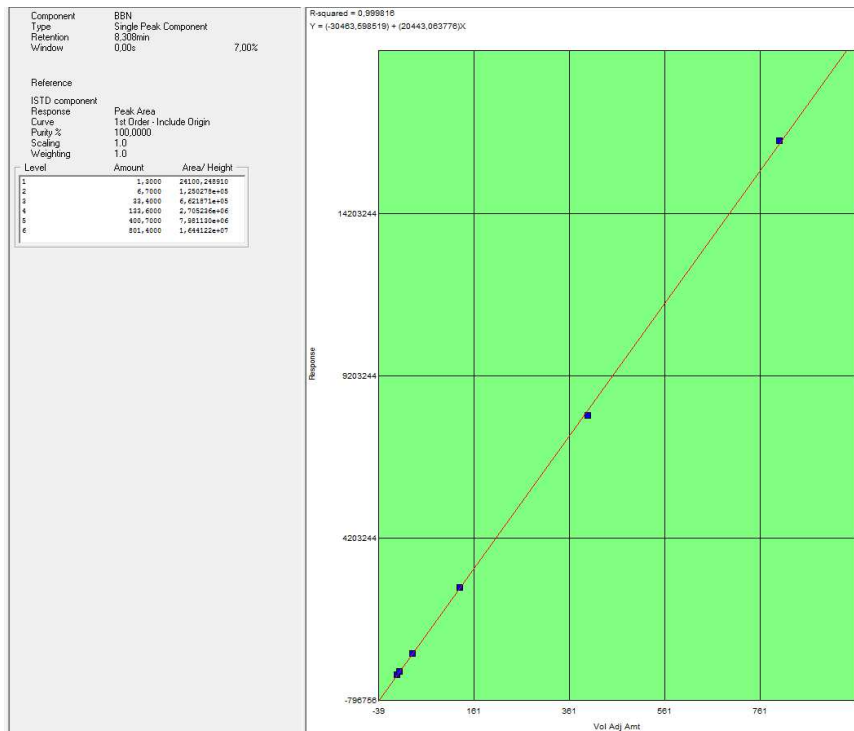
4.4.3.A Linearnost

Linearnost metode određena je pomoću radnog standarda BBN-a i BCPN-a, pripremljenih na sljedeći način: u odmjernu tikvicu od 25 ml odvagano je 40 mg BBN-a, odnosno BCPN-a. Tikvice su nadopunjene do oznake smjesom izopropanola i acetonitrila (4:1). Iz radnog standarda napravljena su razrjeđenja kao što je prikazano u Tablici 3.

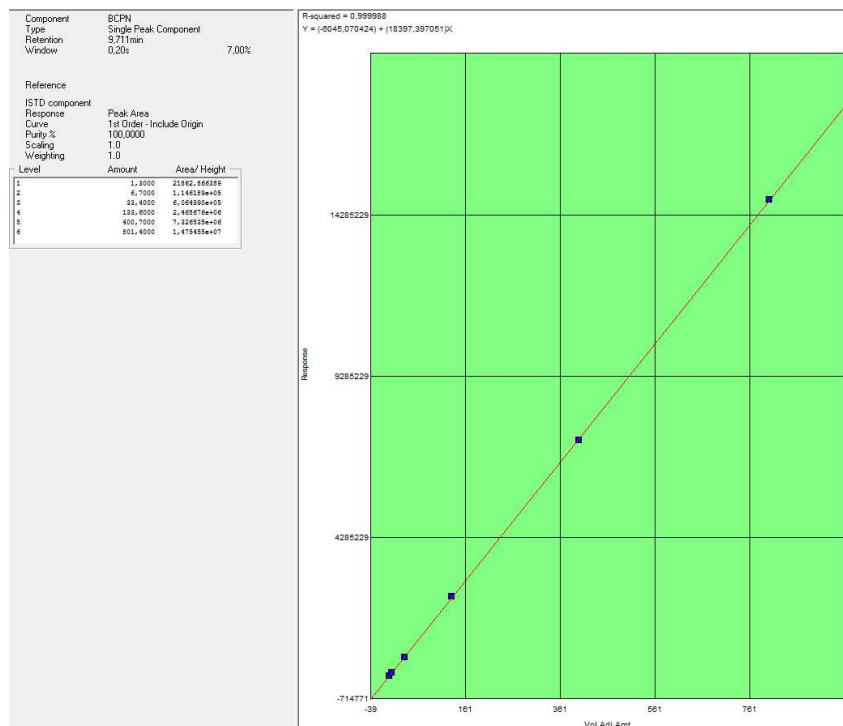
Tablica 3. Određivanje linearnosti metode. Iz radnog standarda napravljeno je 6 razrjeđenja u svrhe određivanje linearnosti te granice detekcije i kvantifikacije kako slijedi:

oznaka	Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)
K5	801,40
K4	400,70
K3	133,57
K2	33,39
K1	6,68
K0	1,34
K00	0,45

Pet otopina je analizirano (K4 – K0) i određena je površina ispod kromatografske krivulje. Pomoću računalnog programa nacrtan je baždarni dijagram iz kojeg je određena jednadžba pravca i koeficijent regresije (Slika 4, 5).



Slika 4. BBN kalibracijska krivulja. Za kalibraciju je korišteno pet razrjeđenja radne otopine (K4, K3, K2, K1, K0), a slika je preuzeta iz računalnog programa.



Slika 5. BCPN kalibracijska krivulja. Za kalibraciju je korišteno pet razrjeđenja radne otopine (K4, K3, K2, K1, K0), a slika je preuzeta iz računalnog programa.

4.4.3.B Preciznost

Ponovljivost odnosno preciznost pripreve određena je mjerenjem otopine razrjeđenja radnog standarda koncentracije K3. Međupreciznost je određena također mjerenjem otopine razrjeđenja radnog standarda (K3) koje je pripremio isti analitičar i analizirao na istom instrumentu, drugi dan te na istoj koloni prema propisanoj analitičkoj metodi.

Za izračunavanje ponovljivosti, otopina svakog standarda koncentracije K3 injektirana je 6 puta, te su izračunate relativne standardne devijacije i koeficijenti odstupanja (Tablica 4).

Za izračunavanje međupreciznosti (Tablica 5) korišteni su podatci 24.07 i 25.07 (Tablica 4) gdje smo izračunali odstupanje među danima, po formuli koja slijedi:

$$\frac{\text{raspon}}{\text{aritmetička sredina}} \times 100$$

Tablica 4. Određivanje ponovljivosti (preciznosti) metode. Rezultati su prikazani kao standardne devijacije te kao koeficijenti odstupanja.

spoj	datum	Standardna devijacija	Koeficijent odstupanja (%)
BBN	23.07	6,033	4,5
	24.07	2,5	1,36
	25.07	4,85	2,6
BCPN	23.07	6,09	4,52
	24.07	2,03	1,1
	25.07	5,4	2,9

Tablica 5. Određivanje međupreciznosti metode. Rezultati su prikazani kao rasponi i odstupanja.

naziv	raspon	Odstupanje (%)
BBN	3,21	1,74
BCPN	0,71	0,38

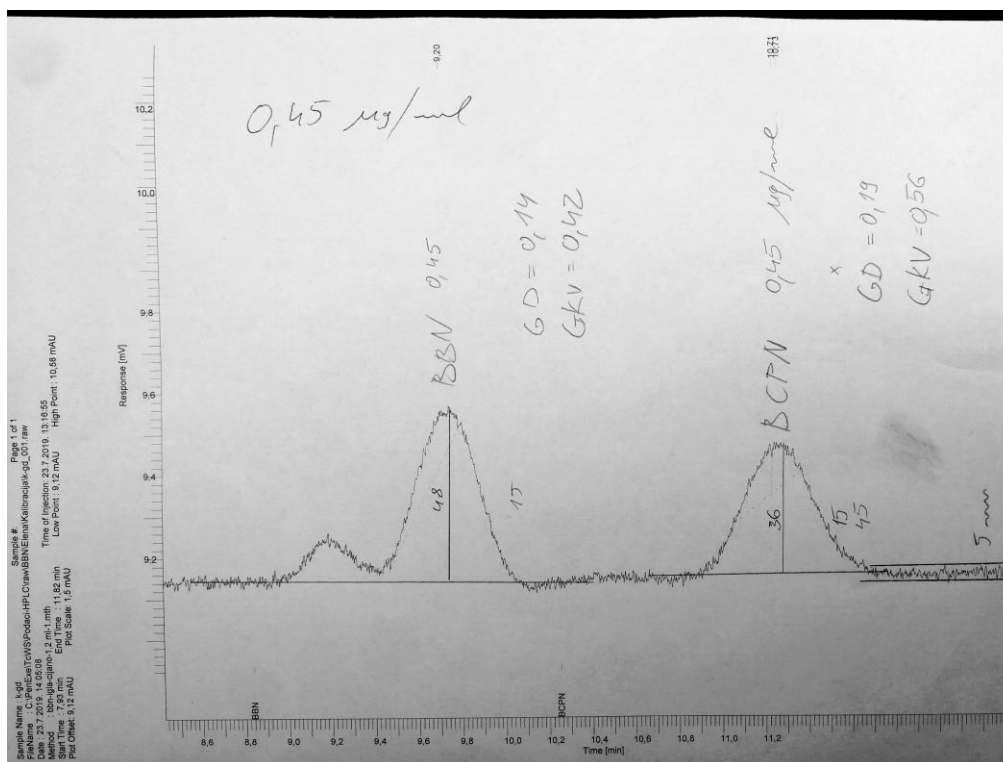
4.4.3.C Granica detekcije i kvantifikacije

Uzorak smo pripremili na način da smo u odmjernu tikvicu od 25 ml odvagali 40 mg BBN-a, odnosno BCPN-a. Tikvice su nadopunjene do oznake smjesom izopropanol:acetonitril (4:1). Iz radnog standarda napravljena su razrjeđenja kao što je prikazano u Tablici 3. Konačna koncentracija analita u otopini bila je 0,45 µg/ml.

Granice detekcije i kvantifikacije koje su prikazane u Tablici 6. određene su izračunavanjem omjera signala i šuma. Omjeri signala i šuma korišteni za procjenu granica detekcije i kvantifikacije iznosili su 3:1 za granicu detekcije i 9:1 za granicu kvantifikacije (Slika 6).

Tablica 6. Određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije metode ($c = 0,45$ µg/ml) za spojeve: BBN i BCPN.

spoj	granica detekcije (GD) (µg/ml)	Granica kvantifikacije (GK) (µg/ml)
BBN	0,14	0,42
BCPN	0,19	0,56

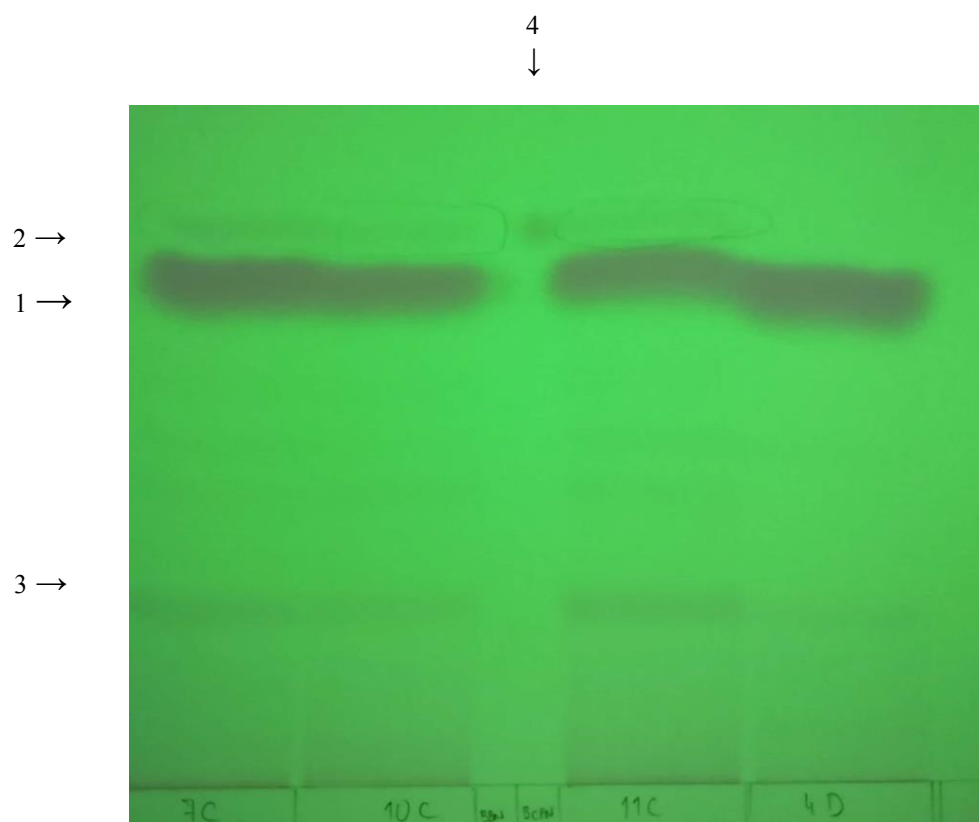


Slika 6. Prikaz omjera signala i smetnji ("šum") korištenih za procjenu granica detekcije i kvantifikacije. Na osi X prikazano je retencijsko vrijeme (vrijeme zadržavanja na koloni), dok se na Y osi nalazi signal (odziv detektora). Na kromatogramu je prikazan grafički zapis HPLC analize razrijeđenja K00 koncentracije 0,45 µg/ml (Tablica 3). Prvi obilježeni pik pripada BBN-u, dok drugi pripada BCPN-u.

5 REZULTATI

5.1 TLC

Kao što smo ranije opisali u metodama, svaki uzorak prošao je razdvajanje komponenti putem tankoslojne kromatografije. Uglavnom smo nanosili 2 uzorka s ponavljanjima, točnije nanosili smo četiri pruge na jednu kromatografsku ploču. U sredinu smo stavljali standarde BBN-a i BCN-a kako bi bili sigurni gdje se isti nalaze u samim uzorcima nakon razdvajanja. Linearno od standarda bi obilježili prugu za koju pretpostavljamo da je BCPN te je sastrugali. Primjer razvijene kromatografske ploče pod UV svjetlom prije struganja može se vidjeti na Slici 7.



Slika 7. Razvijena kromatografska ploča. Kromatografska ploča je razvijena pod UV svjetlom. Tamna široka linija (strelica 1) označava BBN, a slabije vidljiva tamna linija (strelica 2) označava BCPN. Strelica 3 označava nečistoće koje su se izolirale zajedno s testiranim molekulama dok strelica 4 označava standard BCPNa koji je korišten u mjerenjima.

HPLC

Svi rezultati (Tablica 7 i Tablica 8) dobiveni su metodom HPLC-a, a navedene koncentracije izražene su u $\mu\text{g/ml}$. Očitane vrijednosti koncentracija BCPN-a u odgovarajućim HPLC izvještajima nakon svake pojedinačne provedbe eksperimenta korigirane su ovisno o masi uzorka te korištenog alikvota. Iste su se koristile za grafičko prikazivanje i usporedbu svih rezultata.

Masa uzorka dobivena je razlikom masa pune tubice i tubice nakon samog uzorkovanja.

Alikvot korišten u izračunima jest onaj koji je korigiran ovisno o volumenu korištenog za TLC (u usporedbi s pretpostavljenih 2 ml) te o uzetom volumenu acetona nakon otapanja strugotina s TLC ploče (u usporedbi s pretpostavljenih 3,5 ml).

korekcija alikvota:

$$A = \frac{a}{2} \cdot \frac{3.5}{a(\text{acetone})}$$

gdje je:

A – korigirani alikvot

a – uzeti volumen za TLC

a (acetone) – uzeti volumen acetona

Tablica 7. podatci i rezultati za eksperiment tip 1. Svakom pojedinom uzorku pridružena je masa fecesa koja je korištena za analizu te je zabilježen točan alikvot etil-acetata koji je korišten za TLC kao i alikvot acetona. Uzimajući sve to u obzir, u stupcu broj 4 nalaze se korigirane vrijednosti alikvota za svaki uzorak. U sljedećem stupcu nalazi se očitana, izmjerena koncentracija BCPN-a nakon analize na HPLC-u, te korigirana vrijednost kada smo u obzir uzeli masu fecesa i korištene alikvote.

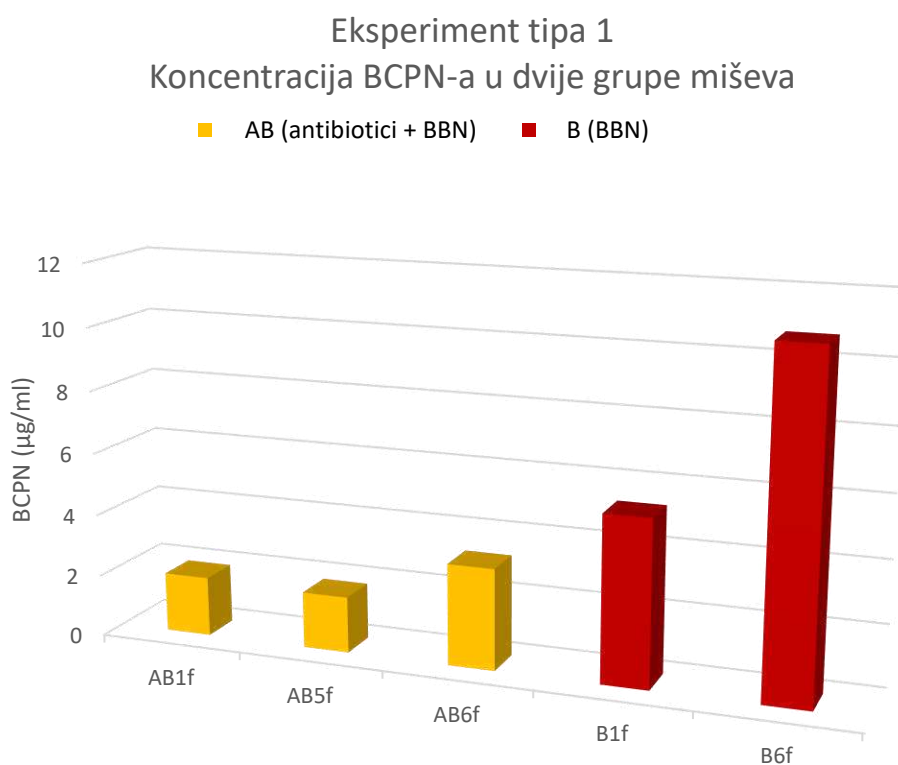
naziv	masa fecesa (g)	aliquot (ml)	korigirani alikvot (ml)	koncentracija (µg/ml)	korigirana koncentracija (µg/ml)
K-1	0,8021	1,5	1,555466667	2,3608	4,578164452
A4 1	1,4658	1,55	1,505290323	14,9573	15,36026671
A4 2	1,0083	1,935 ml za TLC, acetona alikvot 1,805 ml	1,717880994	1,9191	3,269647342
A4 3	1,1146	1,98 ml za TLC, acetona alikvot 3,5 ml	1,01010101	3,0932	2,803197958
A2 1	0,7587	1	2	3,4424	9,074469487
A2g3	0,3289	1,55	1,290322581	7,9505	31,19096892
A2g4	0,3746	1,6	1,25	11,134	37,15296316
A2 2	0,525	1,75	1,142857143	19,8805	43,27727891
A2c5	0,3814	1,66	1,204819277	15,9079	50,25208332
A2d6	0,1033	1,5	1,333333333	5,7597	74,34269119
K+c1	0,1936	1,66	1,204819277	42,114	262,0855322
K+c2	0,1308	1,955 ml za TLC, acetona alikvot 3,5 ml	1,023017903	43,9157	343,4751324
K+d3	0,162	1,75	1,142857143	50,7046	357,7044092
K+d4	0,1	1,885 ml za TLC, acetona alikvot 3,5 ml	1,061007958	49,1774	521,7761273
K+g5	0,1194	1,75	1,142857143	113,6539	1087,857382
K+g6	0,1472	1,65	1,212121212	175,5931	1445,924736

Tablica 8. podatci i rezultati za eksperiment tip 2. Opis: vidi pod Tablicu 7.

naziv	masa fecesa (g)	aliquot (ml)	korigirani alikvot (ml)	koncentracija (µg/ml)	korigirana koncentracija (µg/ml)
AB1f	0,5985	700 ul	2,85	0,4023	1,915714286
AB5f	0,9305	1,6 ml TLC, 1 ml za ekstrakciju, 3 ml acetona	2,9165	0,5771	1,808825524
AB6f	0,4988	1,6 ml TLC, 1 ml za ekstrakciju, 3 ml acetona	2,9165	0,5574	3,259136127
B1f	0,5165	700 ul	2,85	0,9642	5,320367861
B6f	0,3851	1,6 ml TLC, 1 ml za ekstrakciju, 3 ml acetona	2,9165	1,4191	10,74735173

5.1.1 Eksperiment tipa 1

Graf (Slika 8) pokazuje da je koncentracija BCPN-a u grupi miševa koja je dobivala BBN zajedno s antibioticima (grupa AB) značajno niža od koncentracije BCPN-a u grupi miševa koji su uzimali samo BBN (grupa B). Nakon napravljenog T testa dobivena je p vrijednost od 0,07354758, što nije statistički značajno ali je očit trend porasta količine BCPNa u grupi miševa bez antibiotika. Također se nameće zaključak da u narednim istraživanjima pokus potrebno napraviti većem broju uzoraka kako bi rezultati bili vjerodostojniji.

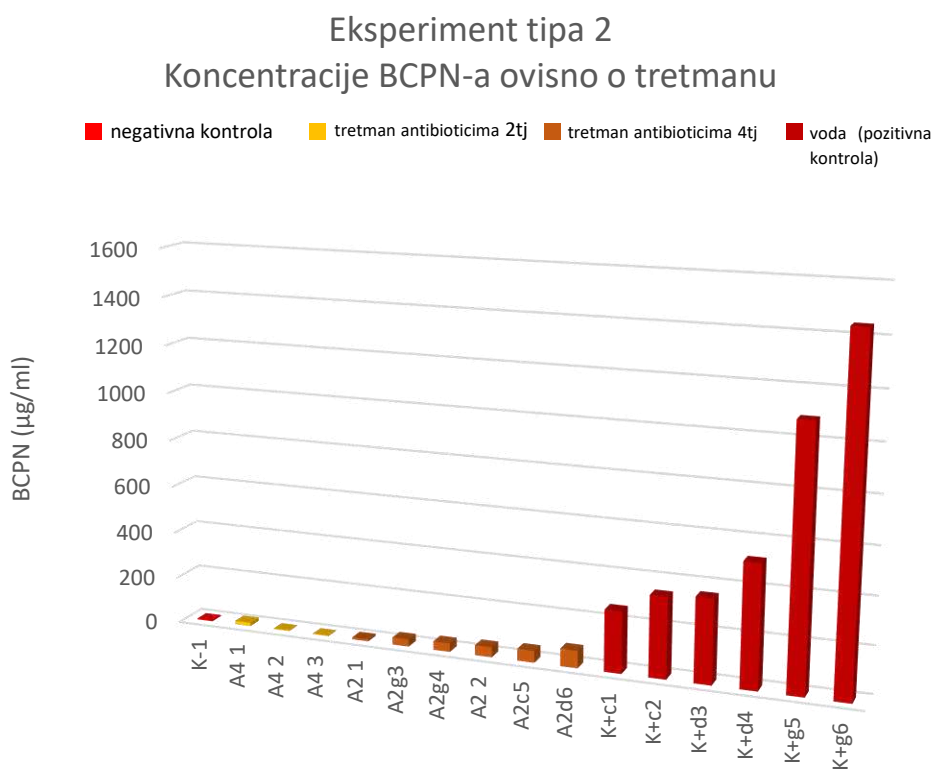


Slika 8. Rezultati eksperimenta tip 1. Prikazane su koncentracije BCPNa u stolici miševa koji su uzimali antibiotike i BBN (miševi AB1f, AB5f i AB6f), te u stolici miševa koji su uzimali samo BBN (B1f i B6f).

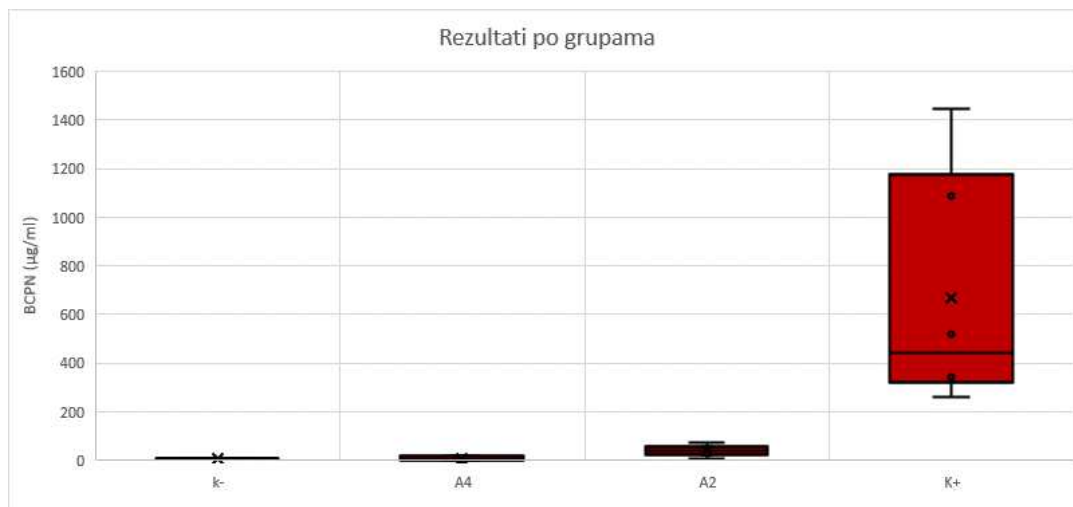
5.1.2 Eksperiment tipa 2

Promotrimo li graf (Slika 9) možemo uočiti da je koncentracija proizvedenog BCPN-a najmanja kod negativne kontrole. Koncentracija se linearno povećava navedenim slijedom: A4 (miševi na četverotjednom tretmanu isključivo sa širokospektralnim antibioticima), A2 (miševi na dvotjednom tretmanu isključivo sa širokospektralnim antibioticima) te K+ (pozitivna kontrolna skupina, miševi piju samo vodu).

Iste rezultate prikazali smo i box plot-om (Slika 10) kako bi usporedbe grupa bile razumljivije i jasnije vidljive.



Slika 9. Grafički prikazani rezultati za eksperiment tip 2. Prikazane su koncentracije BCPNa u stolici miševa koji su bili na četverotjednom tretmanu isključivo sa širokospektralnim antibioticima (A41, A42, A43), miševa na dvotjednom tretmanu isključivo sa širokospektralnim antibioticima (A21, A2g3, A2g4, A22, A2c5, A2d6), miševa koji su pili samo vodu (K+c1, K+c2, K+d3, K+d4, K+g5, K+g6), te miša koji je pio samo vodu gdje je uzorak fecesa prethodno autoklaviran (K-1).

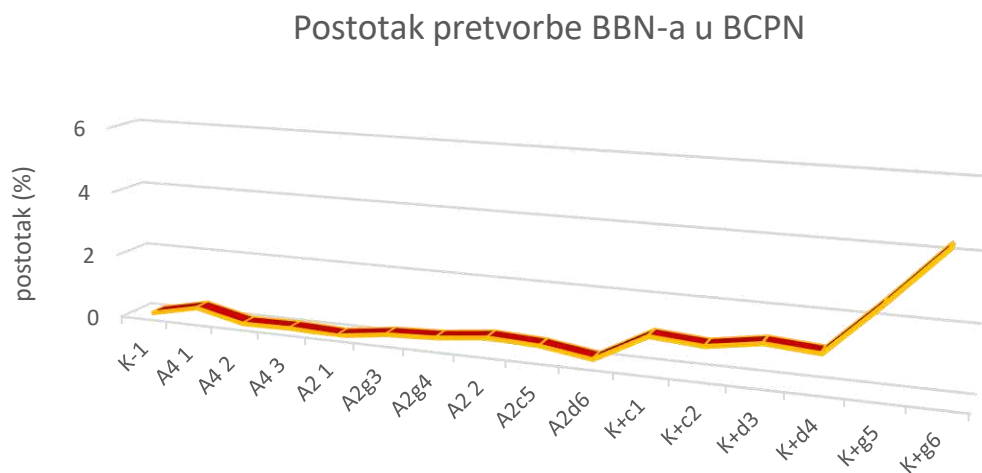


Slika 10. Prikaz rezultata box plot-om za eksperiment tip 2. Koncentracije su prikazane kao medijan koji dijeli područje rezultata na dva dijela (donji i gornji kvartil) te kao intervali koji ukazuju na najmanju i najveću vrijednost.

Uporedimo li pozitivnu kontrolu s grupom koja je bila na tretmanu antibioticima (grupa A) na prvi pogled je vidljiva razlika. Ista je potvrđena T test-om ($p = 0,00139703$), čime potvrđujemo statističku signifikantnost.

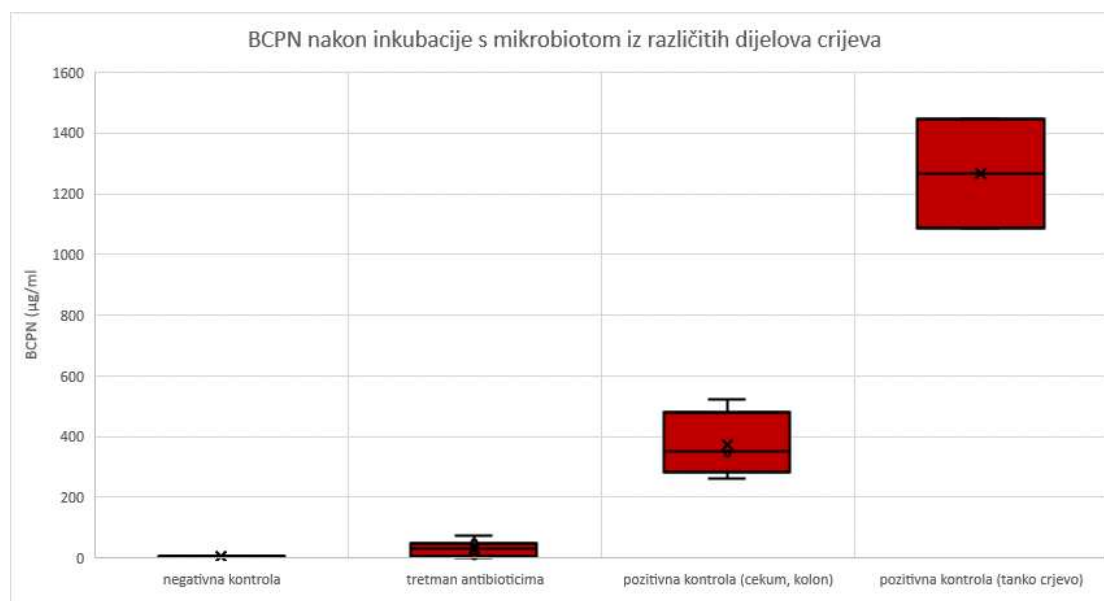
Nadalje, razlika između grupe miševa koja je bila na tretmanu antibioticima 2 tjedna, i one koja je bila na tretmanu antibioticima 4 tjedna također je potvrđena statistička signifikantnost gdje p vrijednost iznosi 0,0376259.

Također, smatrali smo kako bi bilo zanimljivo izračunati i prikazati koji postotak BBN-a uistinu prelazi u BCPN u pojedinom uzorku. Prisjetimo se da je svaki uzorak inkubiran u 2 ml 0,05% otopine BBN-a. Jednostavnim računom dolazimo do toga da je uzorak inkubiran s 1 μ l BBN-a, odnosno 1 mg BBN-a. Uzimajući u obzir masu pojedinog uzorka i konačni volumen od 200 μ l koji koristimo za HPLC analizu dobili smo konačnu masenu koncentraciju BBN-a koju smo hipotetski doveli do HPLC analize. Usporedivši istu s očitanom koncentracijom BCPN-a nakon analize (Tablica 8), dobili smo postotak BBN-a koji se metabolizirao u BCPN (Slika 11).



Slika 11. Postotak pretvorbe BBN-a u BCPN za eksperiment tip 2. Prikazan je relativni udio BCPN-a (prema BBN-u) u stolici. Sadržaj crijeva miševa koji nisu dobivali antibiotike (K+) pokazuje veći postotak konverzije BBN-a u BCPN od onih koji su ih pili (A2 i A4). Isto je potvrđeno statističkim testom ($p = 0,00316105$).

Promotrimo li rezultate unutar iste grupe uvidjeli smo kako je u gornjem dijelu crijeva koncentracija značajno viša, isto smo potvrdili statističkim testom gdje p vrijednost iznosi 0,00280465. Rezultat je statistički signifikantan, a rezultat opravdavamo pretpostavkom da je gornji dio crijeva bogatiji aerobnim bakterijama koje su zaslužne za metabolizam kancerigena BBN-a. Navedeno je jasno vidljivo na grafikonu u nastavku (Slika 12).



Slika 12. Koncentracija BCPN-a nakon inkubacije, pregled između i unutar skupina. Koncentracije su prikazane kao medijan koji dijeli područje rezultata na dva dijela (donji i gornji kvartil) te kao intervali koji ukazuju na najmanju i najveću vrijednost. Redom su prikazani: koncentracija kod uzoraka negativne kontrole, onih miševa koji su bili na tretmanu antibioticima (2 ili 4 tjedna) te kod uzoraka miševa koji su pili samo vodu (pozitivna kontrola). Istu smo raščlanili na dvije podskupine: cecum i kolon te tanko crijevo kako bi razlika u koncentracijama bila jasno vidljiva. Isto je potvrđeno T test-om gdje je $p = 0,00280465$.

6 RASPRAVA

Rak mokraćnog mjehura je ozbiljno zdravstveno stanje, a ljudski mikrobiom tema o kojoj se u posljednje vrijeme sve više spoznaje te ga se povezuje s raznim stanjima. Nedavna otkrića postojanja urogenitalnog mikrobioma dovode do potrebe da se istraži uloga mikrobioma u patogenezi malignih bolesti urogenitalnog trakta, uključujući i mokraćni mjehur. Trenutno još nije jasno utječe li mikrobiom urina na razvitak i progresiju tumora mokraćnog mjehura, ili je obrnuto, tumor, kada se razvije, utječe na sastav i raznolikost mikroorganizama u mjehuru (18). Postoji već jasna povezanost između infekcija mokraćnog mjehura i razvitka tumora te je uloga mikrobioma u raku genitourinarnog trakta područje koje zaslužuje daljnja istraživanja. Naime postojanje kroničnih infekcija genitourinarnog trakta neki autori smatraju značajnim čimbenikom rizika za razvoj određenih malignih oboljenja, kao što je karcinom skvamoznih stanica mokraćnog mjehura nakon parazitske infekcije sa *Shistosoma haematobium* (19, 20).

Terapijsko pitanje uvijek dolazi zadnje i najkritičnija je točka svakog istraživanja. Mi ga se nismo dotakli, ali kako su nedavno otkriveni crijevni mikrobnii učinci na razvoj raka i odgovor na neke vrste terapija (21, 22), očekujemo otkrivanje sličnih interakcija vezanih i za rak mokraćnog mjehura.

Ako se vratimo na eksperimente provedene na životinjskim modelima, karcinogeneza mokraćnog mjehura izazvana nitrozaminom je uspješno inhibirana uz *Lactobacillus casei* Shirota bakterijski soj (4). Istraživači su probioticima spriječili rast sekundarnog tumora i modulirali proizvodnju citokina, a kod životinja tretiranih probioticima uočeni su blaži stupnjevi bolesti. Međutim do sada ne postoje studije koje opisuju odnose mikrobioma s metabolizmom BBN-a.

Kako je istraživanje napredovalo, smjer našeg istraživanja se mijenjao. Početak istraživanja je bio fokusiran na analizu uzoraka urina miševa, ali budući su izmjerene koncentracije bile preniske, odlučili smo područje rada usmjeriti na uzorke crijevnog sadržaja koji je znatno bogatiji mikrobiotom nego urin. Analizom istih dobiveni su značajno viši time i pouzdaniji rezultati.

Usporedimo li analizirane uzorke koji pripadaju eksperimentu 1, evidentno je da uzorci koji pripadaju grupi B pokazuju veću koncentraciju od analiziranih uzoraka koji pripadaju grupi AB (Slika 8). Točnije, pronađena je znatno viša koncentracija BCPN-a u uzorku crijevnog sadržaja miševa koji nisu bili na tretmanu antibioticima

od one u uzorcima miševa koji su bili na tretmanu antibioticima. Shodno navedenome možemo zaključiti da tretman antibioticima dovodi do redukcije broja bakterija koje sudjeluju u pretvorbi BBN-a u BCPN. Poznato je da antibiotici utječu na mikrobiom crijeva, ali do sada se nije bilo proučavanja bakterijskih sojeva koji imaju sposobnost metaboliziranja BBN-a. Također moramo razmotriti mogućnost da antibiotici samo reduciraju sposobnost određenih bakterija za pretvorbu BBN-a. Uzimajući u obzir obje mogućnosti, možemo zaključiti da mikrobiom crijeva ima važnu ulogu u metabolizmu BBN-a.

Nadalje, osvrnemo li se na eksperiment tip 2, uvidjeti ćemo da rezultati potvrđuju zaključke dobivene u prethodnoj vrsti eksperimenta. Ako usporedimo rezultate koji su dobiveni analizom crijevnog sadržaja miševa grupe A i K⁺ može se primjetiti da je koncentracija prisutnog BCPN-a u analiziranim uzorcima grupe K⁺ značajno veća nego u grupi A. To nas dovodi do istog zaključka kao i kod prethodne vrste eksperimenta: antibiotici značajno utječu na egzistenciju crijevnog mikrobioma, odnosno bakterijskih kultura koje sudjeluju u metabolizmu BBN-a. Nadalje, ako sagledamo rezultat negativne kontrole gdje smo bakterijske stanice ubili autoklaviranjem, vidimo da je koncentracija izmjerenog BCPN-a iznimno niska. Koncentracija BCPN-a u ovom slučaju je slična onoj izmjerenoj kod grupe A, što nas navodi na zaključak da autoklaviranje učinkovito dokida metaboliziranje BBN-a.

Također, analiziramo li detaljnije rezultate unutar istih skupina, možemo doći do još specifičnijih zaključaka. Unutar K⁺ skupine, možemo primijetiti postojanje razlike između uzoraka koji su prikupljeni u različitim dijelovima crijeva. Uzorci koji su prikupljeni u gornjem dijelu tankog crijeva (jejunum) imaju veću koncentraciju BCPN-a od onih koji su prikupljeni u ostalim dijelovima crijeva, što nas navodi na zaključak da je gornji dio crijeva bogatiji bakterijama koje sudjeluju u metabolizmu BBN-a. Analiziramo li rezultate unutar skupine A, točnije usporedimo li A2 i A4 jasno je da duža uporaba antibiotika dovodi do još veće redukcije mikrobioma crijeva. Može se zaključiti da bakterijske vrste koje sudjeluju u metabolizmu BBN-a nakon četverotjedne terapije antibioticima gotovo da i nema.

Kao što smo naveli ranije, mikrobiom urina je slabo istraženo područje, a terapijske mogućnosti koje će uključivati mijenjanje mikrobiote treba tek istražiti. Ljudski mikrobiom je još velika nepoznanica, a metabolizam BBN-a vrlo interesantna tematika koja zaslužuje dodatna istraživanja te ima potencijal za terapijske i preventivne primjene.

7 ZAKLJUČCI

- Bakterije crijeva sudjeluju u metabolizmu BBN-a, točnije mogu pretvoriti BBN-a u BCPN.
- Primjena antibiotika širokog spektra uzrokuje značajnu redukciju mikrobioma crijeva, odnosno bakterija koje sudjeluju u metabolizmu BBN-a.
- Postoji razlika u opsegu redukcije mikrobioma crijeva ovisno o trajanju antimikrobne terapije.
- Različiti dijelovi crijeva razlikuju se u vrsti bakterijskih kultura koje ih nastanjuju, točnije gornji dio crijeva brojniji je aerobnim bakterijama koje imaju sposobnost pretvorbe BBN-a u BCPN.

8 POPIS LITERATURE

1. The Center for Ecogenetics and Environmental Health [Internet]. University of Washington. Dostupno na: https://depts.washington.edu/ceeh/downloads/FF_Microbiome.pdf
2. European Society of Neurogastroenterology and Motility [Internet]. Vienna. Dostupno na: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/en/about-gut-microbiota-info/>
3. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(1):69-75.
4. Markowski MC, Boorjian SA, Burton JP, Hahn NM, Ingersoll MA, Maleki Vareki S i sur. The Microbiome and Genitourinary Cancer: A Collaborative Review. *Eur Urol*. 2019;75(4):637-46.
5. Fujimura KE, Demoor T, Rauch M, Faruqi AA, Jang S, Johnson CC, Boushey HA, Zoratti E, Ownby D, Lukacs NW, Lynch SV. House dust exposure mediates gut microbiome Lactobacillus enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. 2014;111(2):805-10.
6. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC. The gut mycobium of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*. 2017;5(1):153.
7. Cumberbatch MGK, Noon AP. Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer. *Transl Androl Urol*. 2019;8(1):5-11.
8. Urology Care Foundation [Internet]. The Official Foundation of the American Urological Association. Dostupno na: <https://www.urologyhealth.org/urologic-conditions/non-muscle-invasive-bladder-cancer#Grading%20and%20Staging>
9. Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. *In Vivo*. 2012;26(4):727-39.
10. Kobayashi T, Owczarek TB, McKiernan JM, Abate-Shen C. Modeling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):42-54.

11. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D i sur. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254–8.
12. TaoFeng, MinSun, ShiqingSong, HainingZhuang, LingyunYao. Evaluation Technologies for Food Quality. 2019;12: 219-265.
13. Libretexts Chem [Internet]. California State University Affordable Learning. Dostupno na: https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos%2C_Techniques%2C_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography
14. Banković J. Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje polifenolnih jedinjenja u odabranim biljnim čajevima [diplomski rad]. Prirodno-matematički fakultet (odjel za kemiju) Sveučilišta u Nišu; 2016.
15. Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna nacčela. *Svijet po mjeri*, 61-64, <<http://www.akreditacija.hr/casopis>>. Pristupljeno 22. svibnja 2016.
16. Gupta, V, Jain ADK, Gill NS, Gupta K. Development and validation of HPLC method - a review. *Int Res J Pharm App Sci*. 2012;2(4):17-25.
17. Sabir AM, Moloy M, Parminder BS. HPLC method development and validation: a review. *Int Res J Pharm*. 2013;4:39-46.
18. Alfano M, Canducci F, Nebuloni M, Clementi M, Montorsi F, Salonia A. The interplay of extracellular matrix and microbiome in urothelial bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2016;13:77–90.
19. Burger M, Catto JW, Dalbagni G. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63:234–41.
20. Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:97–111.
21. Roy S, Trinchieri G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:271–85.
22. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015;348:80–6.

23. Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol.* 2018;15(3):143-154.
24. C. Vasconwlos-Nobrega, A. Colaco, C. Lopes, P.A. Oliveira. BBN as an Urothelial Carcinogen. *In vivo.* 2012;26: 727-740.
25. Neseck, B. (2004) Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni. Pristupljeno 24. travnja. 2016.

9 SAŽETAK

UVOD: Svrha istraživanja je bila utvrditi povezanost mikrobioma s pojavom tumora mokraćnog mjehura izazvanog konzumacijom BBN-a (*N-butyl-N-(4-hidroksibutil) nitrozamin*).

MATERIJALI I METODE: Istraživanje je provedeno na miševima C57BL/6J divljeg tipa podijeljenim u 5 skupina: akutni model dvotjednog tretmana BBN-om ("B" - miševi koji su konzumirali 0,05% otopinu BBN-a u vodi za piće kroz dva tjedna), akutni model tretmana 2+2tj BBN/antibiotici (AB - dvotjedni predtretman širokospektralnim antibioticima nakon čega slijedi dvotjedni tretman otopinom BBN (0,05%) i antibiotici u vodi za piće), miševi na dvotjednom tretmanu antibiotika (A2 – Miševi na dvotjednom tretmanu isključivo sa širokospektralnim antibioticima, miševi na četverotjednom tretmanu antibiotika (A4 – Miševi na četverotjednom tretmanu isključivo sa širokospektralnim antibioticima), te oni koji piju isključivo vodu (koja se dijeli na dvije eksperimentalne skupine: pozitivne K⁺ i negativne kontrolne skupine K⁻). Sva mjerenja provedena su na uzorcima fecesa putem HPLC-a.

REZULTATI: Korištenje antibiotika dovelo je do redukcije broja bakterija koje sudjeluju u pretvorbi BBN-a u BCPN (*N-butyl-N-(3-carboxypropyl) Nitrosamine*). Koncentracija prisutnog BCPN-a grupe K⁺ (s najvišom vrijednosti od 1445,92 µg/ml) bila je značajno veća nego u grupi A (gdje najviša vrijednost iz skupine A2 iznosi 74,34 µg/ml). Izmjerena koncentracija BCPN-a u negativnoj kontroli je iznimno niska (4,58 µg/ml), slična onoj izmjerenoj kod grupe A4. Uzorci fecesa prikupljeni u gornjem dijelu crijeva (\bar{x} = 1266,89 µg/ml) imali su veću koncentraciju BCPN-a od onih koji su prikupljeni u donjim dijelovima crijeva (\bar{x} = 371,26 µg/ml).

ZAKLJUČAK: Našim istraživanjem utvrdili smo da bakterije crijeva sudjeluju u metabolizmu BBN-a, točnije imaju sposobnost pretvorbe BBN-a u BCPN. Također, zaključili smo da primjena širokospektralnih antibiotika utječe na značajnu redukciju mikrobioma crijeva, odnosno bakterijske kulture crijeva koje sudjeluju u metabolizmu BBN-a, te da postoji razlika u opsegu redukcije mikrobioma crijeva ovisno o trajanju antimikrobne terapije. Isto tako, važno je istaknuti da se različiti dijelovi crijeva razlikuju u vrsti bakterijskih kultura koje ih nastanjuju, točnije gornji dio crijeva brojniji je bakterijama koje imaju sposobnost pretvorbe BBN-a u BCPN.

Osnovni podatci:

Ime i prezime: Elena Ćosić

Datum rođenja: 30. studenog 1994. godine

Mjesto rođenja: Zadar, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Put Nina 57a, 23000 Zadar

Broj telefona: +385 91 3011194

e-adresa: elena.zd@hotmail.com

Obrazovanje:

2013. - 2018. Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2009. - 2013. Matematička gimnazija "Franjo Petrić"- MIOC, Zadar

2001. - 2009. Osnovna škola "Šimuna Kožičića Benje", Zadar

Radno iskustvo:

veljača 2018.- rujan 2018. Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna „Grad“.

svibanj 2014.- rujan 2018. Savjetovanje o dodatcima prehrani i kozmetici u ljekarnama.

siječanj 2017.– travanj 2018. Project Manager for Business Development and Finance Aiesec, Split

rujan 2016. – rujan 2018. Predstavnik studija farmacije u Studentskom zboru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

rujan 2015. – rujan 2018. Zamjenik predstavnika studija farmacije u Studentskom zboru Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

veljača 2019. – srpanj 2019. Usavršavanje na Karlovom Sveučilištu u Pragu u sklopu laboratorija farmakologije.

Nagrade i priznanja:

-Osvojeno prvo mjesto na Natjecanju u marketinškim vještinama, Zagreb 2017.

-Nagrada za znanstveni rad "Antioksidacijska svojstva i sastav ekstrakta zelenog čaja u ovisnosti načinu pripreme" na 6. Simpoziju studenata farmacije i biokemije „FARMEBS 2017“.

-Priznanje o sudjelovanju na međunarodnoj izložbi „International Exhibition of Fine-artist Physicians“ održanoj u Zagrebu 2018 godine.

Projekti:

-Voditeljica sektora financija međunarodnog skupa „Practical Knowledge for Students“ 2019 godine.

-Član organizacijskog odbora Humanijade 2019 godine.

-Organizator humanitarnog projekta „Dan žena“ održanog u Splitu 2018 godine.

-Organizator humanitarnog projekta „Ljubičasti dan“ održanog u Splitu 2018 godine.

Znanja i vještine:

-engleski jezik (C1), slovenski jezik (B2)

-vozačka dozvola B kategorije