

Genotoksični učinak terapijskih doza $\Delta 9$ -tetrahidrokanabinola i irinotekana na humane stanične linije karcinoma crijeva i jetre

Genc, Ana - Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:333785>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2021.

Ana-Marija Genc

1210/N

**GENOTOKSIČNI UČINAK
TERAPIJSKIH DOZA Δ^9 -
TETRAHIDROKANABINOLA I
IRINOTEKANA NA HUMANE
STANIČNE LINIJE KARCINOMA
CRIJEVA I JETRE**

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

ZAHVALA

Neizmjerne sam zahvalna svojoj mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo na svojoj pomoći i prenesenom znanju te na uloženom trudu, vremenu i razumijevanju pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada. Vrijeme koje smo provele radeći skupa zauvijek će mi ostati u lijepom sjećanju upravo zbog Vaše nesebične pomoći, ljubaznosti i susretljivosti.

Najveće hvala mojim roditeljima, bratu, bakama i djedu koji su mi pružali bezuvjetnu ljubav i podršku tijekom cjelokupnog obrazovanja. Hvala vam što ste svaki trenutak proživljavali sa mnom i uvijek imali toliko razumijevanja za mene. Bez vas i vaše ljubavi ne bih bila ovo što jesam.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene tijekom svih uspona i padova te s kojima sam proživjela neke od najljepših trenutaka svoga života. Naša druženja, međusobna pomoć i podrška te trenuci smijeha uljepšavali su svaki dan proveden na fakultetu te vam na svim uspomenama od srca hvala.

Posebnu zahvalu upućujem svom Mateju koji je rado saslušao svaki moj problem i učinio ga manjim te s kojim je uvijek bilo posebno lijepo proslaviti svaki položen ispit. Hvala ti za sve lijepe trenutke i osjećaje kojima si uveselio moj život.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

GENOTOKSIČNI UČINAK TERAPIJSKIH DOZA Δ^9 -TETRAHIDROKANABINOLA I IRINOTEKANA NA HUMANE STANIČNE LINIJE KARCINOMA CRIJEVA I JETRE

Ana-Marija Genc, 1210/N

Sažetak: U većini zemalja svijeta, maligna su oboljenja po učestalosti drugi uzrok smrtnosti stanovništva. O samoj vrsti tumora i njegovoj uznapređovalosti ovisi način liječenja, koji najčešće zahtijeva multimodalni pristup. Irinotekan je jedan od najčešće primjenjivanih citostatika za liječenje metastatskog kolorektalnog karcinoma. Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) je glavna aktivna komponenta konoplje čija se uporaba u medicinske svrhe aktivno razmatra posljednjih nekoliko desetljeća. Cilj ovog rada je istražiti citotoksičnost, genotoksičnost i prooksidacijski učinak različitih koncentracija irinotekana i THC-a. Kao test sustavi korištene su humana stanična linija hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2) i humana stanična linija adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2) koje su bile izložene djelovanju irinotekana i THC-a tijekom 2, 4, 24 i 48 sati. Dokazano je da irinotekan i THC djeluju citotoksično ovisno o duljini tretmana stanica i primijenjenoj koncentraciji. Najveći prooksidacijski učinak zabilježen je na obje stanične linije nakon 4 sata, dok genotoksično djelovanje ponajviše uvjetuju više koncentracije irinotekana.

Ključne riječi: *Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC), irinotekan, citotoksičnost, genotoksičnost, stanične linije HepG2 i Caco-2, in vitro testovi*

Rad sadrži: 79 stranica, 26 slika, 0 tablica, 129 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Draženka Komes*
2. Prof. dr. sc. *Ksenija Durgo*
3. Dr. sc. *Irena Brčić Karačonji*, viši znan. sur., Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb
4. Prof. dr. sc. *Ksenija Marković*

Datum obrane: 29. siječnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

GENOTOXIC EFFECT OF THERAPEUTIC DOSES OF Δ^9 -TETRAHYDROCANNABINOL AND IRINOTECAN ON HUMAN COLON AND LIVER CANCER CELL LINES

Ana-Marija Genc, 1210/N

Abstract: In most countries, cancer is the second leading cause of death. The type of tumor and the stage of the disease will depend on the exact treatment, which usually involves a combination of therapies. Irinotecan is the key anti-cancer drug for the treatment of metastatic colorectal cancer. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) is the main active compound in the Cannabis plant which has been increasingly used in medicine over the past decades. The aim of this work is to investigate the cytotoxicity, genotoxicity and pro-oxidative effects of different concentrations of irinotecan and THC. As a test system, the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and the human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) were exposed to irinotecan and THC during 2, 4, 24, and 48 hours. It has been shown that the cytotoxicity of irinotecan and THC depends on the duration of cell treatments and concentration used. The highest pro-oxidative effect was observed at 4 hours for both cell lines, while genotoxic activity was mostly caused by higher concentrations of irinotecan.

Keywords: *Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), irinotecan, cytotoxicity, genotoxicity, HepG2 and Caco-2 cell lines, in vitro assays*

Thesis contains: 79 pages, 26 figures, 0 tables, 129 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Ksenija Durgo, Full Professor*

Reviewers:

1. PhD. *Draženka Komes*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Irena Brčić Karačonji*, Senior Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor

Thesis defended: 29th January 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KARCINOGENEZA.....	3
2.1.1. Uzroci karcinogeneze.....	3
2.1.2. Karakteristike tumorskih stanica.....	4
2.1.3. Stanični ciklus i apoptoza.....	4
2.1.4. Onkogeni i tumor supresor geni.....	4
2.1.5. Oksidacijski stres.....	5
2.2. ADENOKARCINOM DEBELOG CRIJEVA.....	6
2.3. HEPATOCELULARNI KARCINOM.....	7
2.4. LIJEČENJE TUMORA.....	7
2.5. KEMOTERAPIJA I CITOSTATICI.....	8
2.6. IRINOTEKAN.....	9
2.6.1. Distribucija.....	9
2.6.2. Metabolizam i eliminacija.....	10
2.6.3. Mehanizam djelovanja.....	11
2.6.4. Toksičnost.....	12
2.6.5. Učinci i primjena.....	12
2.7. KONOPLJA.....	13
2.7.1. Kanabinoidi.....	13
2.7.2. Endokanabinoidni receptori.....	14
2.8. Δ^9 -THC.....	14
2.8.1. Farmakokinetika THC-a.....	15
2.8.2. Učinci THC-a.....	17
2.8.2.1. Antikarcinogeni učinak THC-a.....	18
2.8.2.2. Međudjelovanje THC-a i irinotekana.....	18
2.9. <i>IN VITRO</i> TESTOVI TOKSIČNOSTI.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. MATERIJALI.....	21
3.1.1. Biološki test sustavi.....	21
3.1.2. Istraživani spojevi.....	22
3.1.3. Kemikalije.....	23
3.1.4. Priprema otopina.....	24
3.1.5. Laboratorijska oprema.....	28
3.1.5.1. Uređaji.....	28
3.1.5.2. Pribor.....	28

3.2. METODE.....	29
3.2.1. Nasađivanje i kultivacija staničnih linija HepG2 i Caco-2 u monosloju	29
3.2.1.1. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja.....	30
3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću Bürker-Türkove komorice	30
3.2.3. Određivanje citotoksičnog i proliferacijskog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnim linijama HepG2 i Caco-2	30
3.2.3.1. Neutral red test.....	30
3.2.3.2. Klonogeni test.....	31
3.2.4. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnim linijama HepG2 i Caco-2	32
3.2.4.1. Tretman stanica HepG2 i Caco-2 različitim otopinama irinotekana i THC-a za određivanje stupnja karbolnilacije, lipidne peroksidacije i genotoksičnog učinka	32
3.2.4.2. Određivanje ukupnih proteina metodom po Bradfordu	33
3.2.4.3. Kvantificiranje proteinskih karbonila u HepG2 i Caco-2 stanicama tretiranim različitim otopinama irinotekana i THC-a.....	34
3.2.4.4. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije u stanicama HepG2 i Caco-2	35
3.2.5. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na modelnoj DNK i staničnom genetičkom materijalu.....	36
3.2.5.1. Elektroforeza u agaroznom gelu	36
3.2.5.2. Određivanje oštećenja DNK komet testom izazvanih različitim koncentracijama irinotekana i THC-a na staničnim linijama HepG2 i Caco-2	38
3.2.6. Statistička obrada podataka.....	39
4. REZULTATI I RASPRAVA	40
4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG I PROLIFERACIJSKOG UČINKA IRINOTEKANA I THC-a NA STANIČNIM LINIJAMA HEPG2 I CACO-2	40
4.1.1. Određivanje citotoksičnog učinka Neutral red testom	40
4.1.2. Određivanje citotoksičnog i proliferacijskog učinka klonogenim testom.....	46
4.2. ODREĐIVANJE PROOKSIDACIJSKOG I PROTEKTIVNOG UČINKA IRINOTEKANA I THC-a NA STANIČNIM LINIJAMA HEPG2 I CACO-2	50
4.2.1. Određivanje stupnja oksidacije proteina na staničnim linijama HepG2 i Caco-2	50
4.2.2. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije metodom TBARS	54
4.3. ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG I PROTEKTIVNOG UČINKA IRINOTEKANA I THC-a NA MODELNOJ DNK I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU	56
4.3.1. Određivanje oštećenja na plazmidu phiX174 RF1 DNK elektroforezom u agaroznom gelu	56
4.3.2. Određivanje oštećenja DNK na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 komet testom	58
5. ZAKLJUČCI.....	66
6. LITERATURA.....	67

1. UVOD

Prema najnovijim procjenama najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj tijekom 2020. godine je rak debelog crijeva (ECIS, 2020), dok je hepatocelularni karcinom najčešći karcinom koji nastaje u jetri s incidencijom u porastu diljem svijeta (Parkin i sur., 2005).

Višestupanjski proces nastanka raka naziva se karcinogeneza. Velik broj čimbenika na izravan ili neizravan način uključen je u karcinogenezu. Egzogeni čimbenici kao glavni uzroci nastanka i evolucije većine novotvorina dijele se na: fizikalne, kemijske te biološke karcinogene. Kemijski se karcinogeni dijele na dvije osnovne grupe s obzirom na to je li im dokazano mutageno djelovanje u *in vitro* testovima (genotoksični) ili nije (negenotoksični spojevi) (Baba i Cătoi, 2007a).

O vrsti tumora i njegovoj uznapređovalosti ovisi i vrsta primijenjenog liječenja. Najčešće se pritom misli na multimodalni terapijski pristup koji omogućava bolju kontrolu bolesti (NCI, 2020). Jedan od glavnih kemoterapeutika koji se koristi u liječenju raka debelog crijeva, gušterače i pluća je polusintetički derivat kamptotecina irinotekan. Irinotekan je inhibitor DNK topoizomeraze I koji ima citotoksični učinak na stanice zbog izazivanja oštećenja DNK (Wood i sur., 2015). Iako raširena medicinska primjena biljke *Cannabis sativa* (konoplje) datira još od antičkog doba, prepoznavanje i uvođenje konoplje u medicinske svrhe u zapadnu medicinu dogodilo se mnogo kasnije, početkom devetnaestog stoljeća (Zuardi, 2006). Zbog utjecaja na rast, metastaziranje i angiogenezu tumorskih stanica, posljednjih se nekoliko desetljeća aktivno razmatra njena uporaba u medicinske svrhe (Klarić i sur., 2020). Među 600 poznatih spojeva ove biljke nalaze se kanabinoidi. Jedan od najpoznatijih kanabinoida konoplje je Δ^9 -THC ((-)- Δ^9 -*trans*-tetrahidrokanabinol) (ElSohly i sur., 2017). Kanabinoidi se kombiniraju s konvencionalnim citotoksičnim lijekovima s glavnim ciljem ublažavanja i smanjenja nuspojava kemoterapije. Genotoksičan učinak irinotekana utvrđen je raznim *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima, za razliku od THC-a čiji se učinak tek mora ispitati i opravdati (Wood i sur., 2015). Zbog složenog metabolizma irinotekana, kao i THC-a, potrebna su daljnja istraživanja kojima će se tek procijeniti utjecaj THC-a na metabolizam irinotekana pri njihovoj istovremenoj primjeni.

S obzirom na navedeno, cilj ovog rada je ispitati citotoksični, prooksidacijski i genotoksični učinak različitih koncentracija irinotekana i THC-a na humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 te adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2. Odabir ove dvije stanične linije vezan je za činjenicu da je upravo jetra primarni organ za metabolizam i irinotekana i THC-a, dok je ciljno mjesto djelovanja irinotekana epitel crijeva. Dobivenim rezultatima utvrdit će se koncentracije i potrebno vrijeme izloženosti nakon kojeg se počinju ispoljavati citotoksični, prooksidacijski i genotoksični učinci irinotekana i THC-a na tretiranim stanicama. Također, pokazat će se je li citotoksično, prooksidacijsko i genotoksično djelovanje ovisno o koncentraciji te o vrsti stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KARCINOGENEZA

Tumori ili neoplazme su nakupine novih i promijenjenih stanica koje, s obzirom na agresivnost rasta, mogu biti benignog ili malignog oblika. Rak (lat. *cancer*) sinonim je za malignu transformaciju tumora te za razliku od benignog oblika metastazira u obližnja tkiva. Temelji za promatranje tumora kao genetičke bolesti postavljeni su prije više od 100 godina. Pretpostavka da je za razvoj tumora potrebno nekoliko prethodnih mutacija počinje se šire prihvaćati tek u drugoj polovici 20. stoljeća kad brojni istraživači ulažu napore u utvrđivanje gena uključenih u karcinogenezu (López-Lázaro, 2010).

Karcinogeneza je višestupanjski proces nastanka raka koji uključuje tri različite faze: fazu inicijacije, promocije i progresije. Prva su dva stadija podloga pokretanja stanične transformacije, dok treći stupanj određuje transformaciju benignog tumora u maligni oblik, uz održavanje i daljnji razvoj malignosti (Baba i Cătoi, 2007a).

2.1.1. Uzroci karcinogeneze

Mutacije gena u našem se organizmu događaju konstantno. Molekularne analize ljudskih tumora potvrđuju postojanje više različitih mutacija koje mogu nastati kao posljedica nefunkcioniranja gena koji reguliraju rast i diferencijaciju stanica, kao i mehanizme popravka uzrokovanih okolišnim karcinogenima. Brojna klinička, epidemiološka i eksperimentalna istraživanja identificirala su velik broj čimbenika koji su izravno ili neizravno uključeni u karcinogenezu. Prema svojoj prirodi, ti se čimbenici mogu svrstati u egzogene i endogene čimbenike. Pod endogenim čimbenicima smatraju se spontane promjene nastale kao dio normalnog funkcioniranja metabolizma poput oksidacijskog oštećenja DNK. Egzogeni čimbenici kao glavni uzroci nastanka i evolucije većine novotvorina dijele se na: fizikalne karcinogene (različite vrste neionizirajućih i ionizirajućih zračenja), kemijske karcinogene koji se mogu podijeliti na dvije osnovne grupe s obzirom je li im dokazano mutageno djelovanje u *in vitro* testovima (genotoksični) ili nije (negenotoksični spojevi) te biološke karcinogene kao što su virusi (Baba i Cătoi, 2007a).

2.1.2. Karakteristike tumorskih stanica

Tumorske se stanice od normalnih stanica razlikuju po izmijenjenoj kontroli staničnog ciklusa, mutacijama u genima odgovornim za apoptozu, izmijenjenoj komunikaciji između stanica i signalnih molekula, promijenjenom broju dioba, invazivnom rastu, povećanoj telomeraznoj aktivnosti, itd. U tumorskim je stanicama smanjen popravak oštećenja te povećana učestalost pojave kromosomskih aberacija i aneuploidija. Dok je kod normalnih stanica određen broj staničnih dioba, zbog povećane telomerazne aktivnosti u tumorskim stanicama dolazi do nekontrolirane diobe. Angiogeneza i invazija tumorskih stanica u druga tkiva omogućavaju tumorskim stanicama rast i metastaziranje (Baba i Côté, 2007b).

2.1.3. Stanični ciklus i apoptoza

Normalan ciklus rasta i diobe stanice sastoji se od četiri faze: G1 faza u kojoj se stanica priprema za diobu, S faza proces je replikacije DNK, G2 fazu karakterizira rast stanice i priprema za diobu te M faza (mitoza) kojom iz jedne stanice majke nastaju dvije genetički identične stanice kćeri s istim brojem kromosoma. Prve tri faze zajedno čine interfazu, dok mitoza obuhvaća kariokinezu (diobu jezgre) i citokinezu (diobu citoplazme). Nakon citokineze svaka nova stanica iznova započinje svoj stanični ciklus (Pucci i sur., 2000).

Kako bi se održala stanična homeostaza, stanica posjeduje vlastite biološke i kemijske mehanizme koji su sposobni odrediti programiranu staničnu smrt apoptozu. Smrt u stanicama može biti inducirana i ne-apoptotičkim mehanizmima kao što su nekroza, autofagija, piroptoza, itd. (Tait i sur., 2014). Na taj način organizam uništava neželjene i oštećene stanice iz tkiva. Nemogućnost kontrole staničnog rasta i inhibicija apoptoze glavne su značajke tumorskih stanica. Ciklini i kinaze ovisne o ciklinima glavni su regulatori staničnog ciklusa, dok inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima zaustavljaju stanični ciklus. Poremećaji u pojedinim regulatorima staničnog ciklusa i apoptoze dovode do malignih transformacija i proliferacija tumorskih stanica (Pucci i sur., 2000).

2.1.4. Onkogeni i tumor supresor geni

Mutacijama su podložni i tzv. normalni stanični geni koji se još nazivaju protoonkogenima. Ta grupa gena regulira staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Promjene protoonkogeni nastaju zbog transdukcije, mutacija, kromosomskih translokacija, insercije promotora ili umnožavanja sekvenci DNK. Tada dolazi do nastanka prekomjerne količine

proteinskog produkta koji stimuliraju staničnu diobu onda kad do nje ne treba doći. Mutacije protoonkogeni su dominantne, podudaraju se s nastankom tumora i tada se govori o onkogenima. Izolirano je i okarakterizirano preko 20 onkogeni koji imaju ulogu u procesu nastanka tumora (Baba i Cătoi, 2007a). Najčešće detektirani onkogeni u ljudskim tumorima su ras onkogeni. Ras subporodicu onkogeni čine tri gena: H-Ras, K-Ras i N-Ras. Ras onkogeni su neaktivni vezani za gvanozin difosfat (GDP), dok vezanjem za gvanozin trifosfat (GTP) prelaze u aktivni oblik. Pod utjecajem kemijskih mutagena ras geni podložni su mutacijama. Mutirani ras geni trajno su aktivirani zbog nemogućnosti da hidroliziraju GTP do GDP-a, što dovodi do trajne mitotičke stimulacije stanice (Azmi, 2017).

Stanična dioba prestaje zbog proteina koji su produkti tumor supresorskih gena, odnosno antionkogeni. Ako dođe do mutacije tumor supresorskih gena, ti su mutirani aleli recesivni. Za razliku od protoonkogeni koji se eksprimiraju uslijed mutacija koje su jedan od okidača karcinogeneze, tumor supresorski geni u inaktiviranom obliku povećavaju rizik od nastanka tumora (Baba i Cătoi, 2007a). Gen p53 prvi je otkriveni i jedan od najvažnijih tumor supresorskih gena. Glavna uloga tumor supresorskog gena p53 u organizmu je sprječavanje nastanka tumora zaustavljajući staničnu diobu, aktivirajući enzime za popravak oštećenja ili izazivajući apoptozu. Tumor supresorski gen p53 transkripcijski je faktor sa središnjom domenom naziva DNK-vezno područje (engl. *DNA-binding domain*) koja se specifično i izravno veže na ciljno mjesto molekule DNK. Mutacije na genu p53 odgovorne su za većinu ljudskih tumorskih oboljenja, a više od 80% svih mutacija ovog gena nalazi se u DNK-veznom području. Mutacijom gen p53 ostaje stabilan, ali bez mogućnosti vezanja na DNK i poticanja transkripcije drugih gena (npr. p21 i MDM2) (Scoumanne, 2005).

2.1.5. Oksidacijski stres

Oksidacijsko-redukcijski procesi prirodni su procesi svake stanice. Stanje u kojem oksidacijsko-redukcijski procesi u stanici prelaze u oksidacijsko stanje, što posljedično dovodi do stvaranja prekomjernih količina slobodnih radikala i reaktivnih spojeva kisika (ROS), naziva se oksidacijski stres (Betteridge, 2000).

Pojam ROS obuhvaća slobodne radikale i čestice koje nisu slobodni radikali, ali posjeduju oksidacijsko djelovanje. Slobodni radikali sadrže barem jedan nespareni elektron te čine veći dio struktura u sastavu ROS-a. Neki od njih su superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), peroksilni radikal (RO_2^{\bullet}) i alkoksilni radikal (RO^{\bullet}). Reaktivni kisikovi spojevi koji nisu slobodni radikali su vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina ($HOCl$), ozon (O_3) i

kisik (O_2). Navedene strukture razlikuju se po svojoj toksičnosti i reaktivnosti s ugljikohidratima, proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama (Storz, 2005). Iako slobodni radikali nastaju tijekom normalnog aerobnog metabolizma, višak slobodnih radikala u organizmu jedan je od uzroka starenja i oštećenja tkiva što dovodi do pojave različitih bolesti. Normalne stanice koriste kisik za stvaranje energije u obliku ATP-a kroz proces oksidativne fosforilacije. Taj proces povezuje oksidaciju NADH i $FADH_2$ s fosforilacijom ADP-a u ATP kao glavnog izvora energije za stanicu. Kisik je krajnji primatelj elektrona nastalih oksidacijom NADH i $FADH_2$, stoga oksidativna fosforilacija uvelike ovisi o njemu. Oksidacijom jedne molekule glukoze preko oksidativne fosforilacije nastaje 30 ATP-a, dok glikolizom nastaju samo 2 ATP-a (Nelson i Cox, 2005).

Tumorske stanice pokazuju pojačanu aktivaciju glikolize usprkos dostatnoj količini kisika kako bi zadovoljile svoje energetske potrebe (López-Lázaro, 2008). Ova promjena u metabolizmu O_2 zajednička je značajka tumorskih stanica te igra važnu ulogu u karcinogenezi. Do te promjene vodi smanjena ekspresija proteinskog kompleksa ATP-sintaze nužnog za odvijanje oksidativne fosforilacije te disfunkcija mitohondrija. Neka istraživanja također pokazuju da inaktivacija p53 onkogeno može potaknuti povećanu aerobnu glikolizu kod tumorskih stanica (Matoba i sur., 2006). Prijelaz tumorskih stanica na glikolitički put dovodi do stanične proliferacije i rezistencije na apoptozu.

2.2. ADENOKARCINOM DEBELOG CRIJEVA

Rak debelog crijeva jedan je od najčešćih oblika zloćudnih bolesti u razvijenim zemljama svijeta, dok je incidencija gotovo 10 puta manja u dijelovima Afrike i Azije (Chu, 2011). Prema najnovijim procjenama *Zajedničkog istraživačkog centra (JRC) Europske komisije* najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj tijekom 2020. godine je rak debelog crijeva s 3706 zabilježenih slučajeva (ECIS, 2020).

Većina karcinoma debelog crijeva nastaje iz adenoma. Adenomi ili polipi su tkivne izrasline koje rastu iz sluznice i šire se u lumen debelog crijeva. Iako su polipi benignog oblika, zabrinjava činjenica da većina karcinoma debelog crijeva izrasta iz takvih prethodno benignih adenoma, stoga se u dijagnostici i liječenju promatraju kao premaligni oblici (Chu, 2011).

Mutacije na K-Ras onkogenu najčešće su povezane u progresiji raka debelog crijeva. U bolesnika s adenomima većim od 1 cm nalaze se u otprilike 50% slučajeva. Inaktivacija tumorskog supresorskog gena p53 na 17. kromosomu također ima značajnu ulogu u nastanku

karcinoma debelog crijeva. Kod 60-70% karcinoma debelog crijeva utvrđene mutacije na genu p53 (Rashid i sur., 1999).

Čimbenici koji povećavaju rizik od razvoja raka debelog crijeva su pozitivna obiteljska anamneza, ali i vanjski čimbenici kao što su povećan unos crvenog mesa u prehrani, bolesti poput pretilosti i dijabetesa, pušenje te prekomjerna konzumacija alkohola. Suprotno tome, hrana s većom količinom vlakana, vitamini A, C, E i D, redovita tjelesna aktivnost, hormonska terapija u žena i nesteroidni protuupalni lijekovi mogu djelovati protektivno (Witold i sur., 2018; Pericleous i sur., 2013).

2.3. HEPATOCELULARNI KARCINOM

Hepatocelularni karcinom najčešći je karcinom koji nastaje u jetri s incidencijom u porastu diljem svijeta. Hepatocelularni karcinom je 2,4 puta češći kod muškaraca u odnosu na žene (Parkin i sur., 2005). Kronična infekcija virusom hepatitisa B i/ili C povećava rizik od razvoja hepatocelularnog karcinoma. Podaci za Europu pokazuju da je 60-70% slučajeva osoba s dugotrajnom kroničnom infekcijom virusom hepatitisa C te 10-15% osoba s kroničnom infekcijom virusom hepatitisa B razvilo hepatocelularni karcinom. Od ostalih slučajeva, njih 20% povezano je s prekomjernom konzumacijom alkohola (Trichopoulos i sur., 2011).

Iako se hepatocelularni karcinom sve češće otkriva u asimptomatskoj fazi, teška klinička slika čini ga jednim od najsmrtonosnijih malignih karcinoma s izuzetno rijetkim dugogodišnjim preživljenjem (Trichopoulos i sur., 2011).

2.4. LIJEČENJE TUMORA

Liječenje tumora provodi se na mnogo načina. O samoj vrsti tumora i njegovoj uznapređovalosti ovisit će i vrsta primijenjenog liječenja. Neke od njih, kao što je kirurška operacija, uklanjaju tumorsko tkivo iz organizma, u radioterapiji se koriste visoke doze zračenja kako bi se uništile stanice raka i smanjilo tumorsko tkivo, dok većina vrsta liječenja uključuje uzimanje lijekova (kemoterapija, imunoterapija, ciljana terapija i hormonska terapija). Kod većine se vrsta tumora primjenjuje više vrsta liječenja. Takav multimodalni terapijski pristup omogućava bolju kontrolu bolesti, čime jedna vrsta liječenja potpomaže učincima naknadne druge vrste liječenja (npr. kirurški zahvat i kemoterapija) (NCI, 2020).

Između 85-90% bolesnika s karcinomom debelog crijeva liječi se operativno (Jessup i sur., 1996). Uz kirurški zahvat tumorom zahvaćenog dijela debelog crijeva nužno je odstraniti i limfne čvorove toga područja (Baxter i sur., 2005). Otkrivanje bolesti u ranoj fazi nastanka te

kirurško liječenje za pacijenta mogu značiti potpuno izlječenje. Kemoterapija i radioterapija mogu se provoditi preoperativno, čime je moguće smanjiti masu tumorskog tkiva kao i inoperabilan stadij bolesti učiniti operabilnim.

Kod hepatocelularnog karcinoma također se kao najbolja terapija pokazala kirurška resekcija tumora. U ranom stadiju bolesti kod pacijenata čija veličina tumora ne prelazi 5 cm najbolja je opcija transplantacija jetre. Ostale metode liječenja obuhvaćaju radiofrekventnu ablaciju za pacijente koji nisu kandidati ni za kirurški zahvat ni za transplantaciju, arterijsku kemoembolizaciju kao prvo liječenje za uznapredovalu bolest, dok se sistemska kemoterapija (djelovanje na veći broj organa) te radioterapija kod takvih pacijenata ne preporučaju (Benson i sur., 2009).

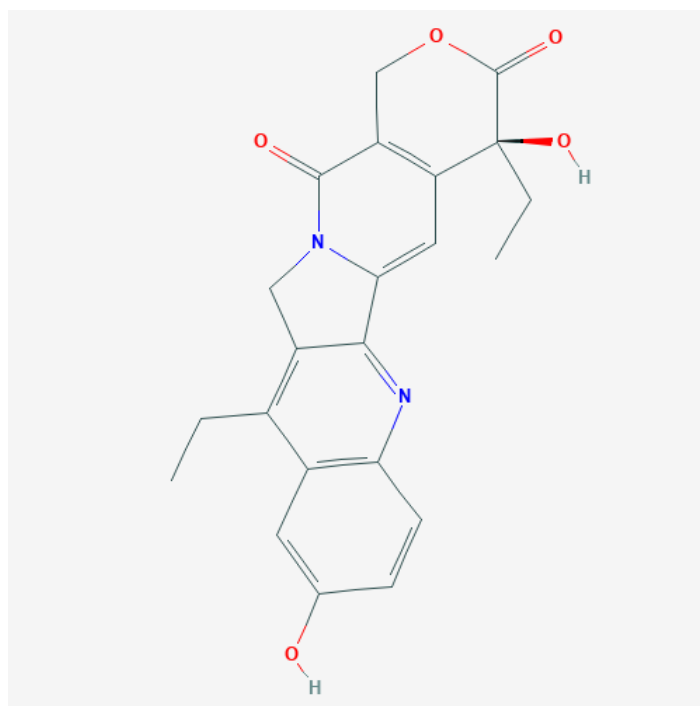
2.5. KEMOTERAPIJA I CITOSTATICI

Kemoterapija u širem smislu obuhvaća klasičnu primjenu terapije citostaticima. Citostatici su lijekovi koji sprječavaju rast tumorske stanice oštećenjem DNK-a ili inhibicijom stanične mitoze čime stanicu tjeraju u programiranu smrt. Na taj način kemoterapija djeluje s ciljem olakšanja tegoba, sprječavanja nastanka metastaza i izlječenja tumora. Klasična kemoterapija nije selektivna u razlikovanju tumorskih stanica od zdravih stanica, već djeluje na stanice koje se brzo dijele. Obzirom na to, mnogi citostatici mogu prouzrokovati različite komplikacije čime se kvaliteta pacijentova života značajno smanjuje (NCI, 2020).

Veći broj citostatika koristi se u liječenju raka debelog crijeva. Najpoznatija kombinacija kojom se dugo liječio uznapredovali stadij bolesti je kombinacija 5-fluorouracila i leukovorina. Brojna klinička ispitivanja potvrdila su da ta kombinacija dovodi do znatno veće antitumorske aktivnosti 5-fluorouracila (Thirion i sur., 2004). Kao zamjena za tu kombinaciju danas se sve češće primjenjuje peroralni fluoropirimidin kapecitabin koji se u organizmu uz pomoć timidin fosforilaze konvertira u 5-fluorouracil. Kapecitabin pokazuje jednaku ili veću učinkovitost u odnosu na 5-fluorouracil te manji broj nuspojava (Giacchetti i sur., 2000). Ostali citostatici u liječenju raka debelog crijeva su oksaliplatin i irinotekan. Oksaliplatin pripada skupini spojeva koji su derivati platine. Oksaliplatinu se pripisuju različiti mehanizmi djelovanja. Poput ostalih spojeva na bazi platine, oksaliplatin inhibicijom sinteze DNK i RNK uzrokuje apoptozu stanica raka. Oksaliplatin također pokazuje sinergizam s drugim citotoksičnim lijekovima, stoga se u kemoterapiji raka debelog crijeva najčešće primjenjuje u kombinaciji s 5-fluorouracilom i irinotekanom (Alcindor i Beauger, 2011).

2.6. IRINOTEKAN

Irinotekan (CPT-11) je polusintetički derivat kamptotecina s antitumorskim djelovanjem te se trenutno koristi u liječenju raka debelog crijeva, gušterače i pluća. Irinotekan uz pomoć enzima karboksilesteraze prelazi u 7-etil-10-hidroksikamptotecin (SN-38) (slika 1) koji inhibira DNK topoizomerazu I, enzim koji sudjeluje u sintezi DNK. To dovodi do ireverzibilnog oštećenja DNK i konačno apoptoze tumorske stanice (de Man i sur., 2018).



Slika 1. Kemijska struktura SN-38 (National Center for Biotechnology Information, 2020a)

2.6.1. Distribucija

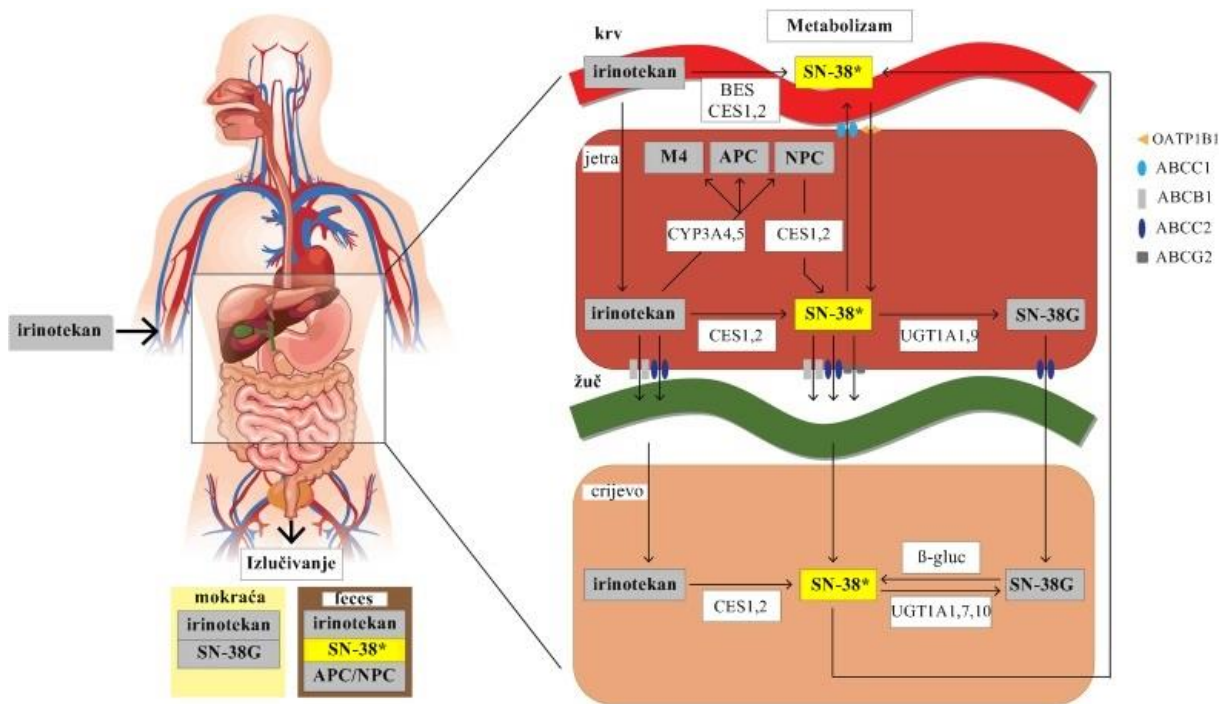
Irinotekan pripada skupini hidrofilnih spojeva. Pri fiziološkom pH, laktonski prsten irinotekana i SN-38 mogu se hidrolizirati u izoformu karboksilata. Kako samo oblik laktona pokazuje antitumorsko djelovanje, mala promjena pH dovodi do promjene farmakokinetike i učinkovitosti irinotekana (Hertzberg i sur., 1989). U krvnoj plazmi dominira karboksilatni oblik irinotekana, dok je veća raspodjela irinotekana laktona u tkivu. Pretvorba irinotekana laktona u karboksilatni oblik unutar cirkulacije izrazito je brza. U plazmi je većina irinotekana i SN-38 vezana za protein albumin, čime je stabiliziran laktonski oblik ovih molekula (Xie i sur., 2002).

2.6.2. Metabolizam i eliminacija

Metabolički put irinotekana (slika 2) u ljudskom tijelu ovisan je o dvije izoforme enzima karboksilesteraza (CES1 i 2) i butirilkolinesteraze (Morton i sur., 1999). CES1 i CES2 lokalizirani su u jetri, debelom crijevu, bubrezima i krvnim stanicama, dok se butirilkolinesteraza uglavnom nalazi u plazmi (Rudakova i sur., 2011). CES2 ima 12,5 puta veći afinitet za irinotekan od CES1 (Humerickhouse i sur., 2000). U krvi, butirilkolinesteraza ima šest puta veću aktivnost od CES-a (Rudakova i sur., 2011). Karboksilesteraze cijepaju piperidin na bočnom lancu u položaju C-10 do 7-etil-10-hidroksikamptotecina (SN-38). Nakon pretvorbe, SN-38 se aktivnim transportom transportira u jetru. Jedno od obilježja SN-38 je kratki poluživot, gotovo odmah nakon formiranja SN-38 nastaje SN-38 glukuronid (SN-38G). Glukuronidacija uridin difosfat glukuronoziltransferazom (UGT 1A1) zaslužna je za pretvorbu SN-38 u SN-38G, čime se SN-38 inaktivira te izlučuje putem žuči (de Man i sur., 2018). SN-38G može dekonjugirati do SN-38 pomoću β -glukuronidaze koju proizvodi crijevna bakterijska flora (Gupta i sur., 1994). Slijedom toga, reaktivacija SN-38 rezultira toksičnošću (dijarejom ili ozljedom epitela) u crijevima čime se taj spoj duže zadržava i u cirkulaciji. Toksičnost se u tom slučaju ublažava primjenom antibiotika s ciljem inhibiranja proliferacije crijevne mikroflore (Takasuna i sur., 1996).

Irinotekan se također metabolizira enzimima citokroma P450 (CYP), odnosno CYP3A4 i CYP3A5, u neaktivne metabolite – APC i NPC. NPC se, za razliku od APC-a, može pretvoriti u SN-38 pomoću CES1 i CES2 u jetri, ali u manjoj količini u odnosu na irinotekan (Dodds i sur., 1998).

Izlučivanje irinotekana i njegovih metabolita van organizma odvija se putem mokraće i fecesa (Xie i sur., 2002).



Slika 2. Metabolizam i izlučivanje irinotekana (de Man i sur., 2018)

2.6.3. Mehanizam djelovanja

Irinotekan inhibira djelovanje topoisomerase I. Topoisomerase su enzimi s iznimno važnim funkcijama za metabolizam molekula DNK kao što su moduliranje uvijanja, premotavanja i okretanja DNK koja se javljaju kao rezultat staničnih procesa poput transkripcije, replikacije i rekombinacije. Topoisomeraza I stvara privremene jednolančane lomove dvostruke uzvojnice DNK. Irinotekan vezanjem na kompleks topoisomerase I-DNK i stvaranjem ovog trostrukog kompleksa ometa funkciju pokretne replikacijske vilice, dolazi do stvaranja dvolančanih DNK lomova što uzrokuje zaustavljanje replikacije DNK. Kao rezultat tog oštećenja dolazi do programirane stanične smrti. Sudar kompleksa irinotekan-topoisomeraza I s replikacijskom vilicom također rezultira zaustavljanjem G2 faze signalizirajući prisutnost oštećenja DNK (Liu i sur., 2000).

Iako je irinotekan specifičan za S-fazu staničnog ciklusa, pri višim koncentracijama irinotekana stanice koje nisu u S-fazi također mogu biti uništene. Tada se mehanizam uništenja stanica bez S-faze povezuje s oštećenjem DNK posredovanim transkripcijom te kroz mehanizam apoptoze (Morris i Geller, 1996).

2.6.4. Toksičnost

Mijelosupresija (smanjenje aktivnosti koštane srži) i dijareja dvije su glavne toksičnosti povezane s liječenjem irinotekanom. Od ostalih nuspojava kod bolesnika liječenih irinotekanom javlja se i neutropenija (smanjenje broja neutrofila u krvi) te astenija (opća tjelesna slabost) (Innocenti i sur., 2009). Toksičnost irinotekana korelira s koncentracijom nastalog SN-38. Razina SN-38 u plazmi i crijevima ovisna je o ekspresiji i aktivnosti karboksilesteraza u serumu i jetri, koje pretvaraju irinotekan u SN-38 te o aktivnosti jetrene glukuronoziltransferaze (UGT 1A1), koja SN-38 pretvara u svoj glukoronizirani i neaktivni oblik SN-38G (de Man i sur., 2018).

SN-38G se u velikoj mjeri eliminira putem žuči (Xie i sur., 2002). U crijevu β -glukuronidaza pretvara neaktivni SN-38G u aktivni SN-38, što može izazvati oštećenje sluznice crijeva. Iz tog se razloga vjeruje da je SN-38 glavni čimbenik dijareje koju stvara irinotekan, a inhibicija crijeвне β -glukuronidaze potencijalna je strategija za smanjenje toksičnosti irinotekana. Stoga su se pacijentima, uz irinotekan, davali i antibiotici poput neomicina i penicilina kako bi se inhibirala mikroflora u crijevima. Simptomi dijareje su se uspješno povukli u šest od sedam liječenih pacijenata (Kehrer i sur., 2001).

Također, provedena su se istraživanja bavila pretpostavkom da se dijareja izazvana irinotekanom može spriječiti utjecajem na ravnotežu prema njegovom karboksilatnom obliku (Ikegami i sur., 2002). U kiselim pH uvjetima dominira laktonski prsten irinotekana koji pri fiziološkom ili višem pH postaje nestabilan i hidrolizira u karboksilatni oblik. Lakton se pasivno prenosi u crijevne stanice što rezultira 10 puta većom koncentracijom laktone od karboksilatnih oblika (Kobayashi i sur., 1999). Stoga je kao potencijalna strategija smanjenja gastrointestinalne toksičnosti irinotekana predložena crijevna alkalizacija (Ikegami i sur., 2002). No, provedena istraživanja u kojima je došlo do mijenjanja crijevnog okoliša alkalizacijom također nisu pokazala rezultate smanjenja crijevne toksičnosti (Karthaus i sur., 2005; Valenti Moreno i sur., 2006).

2.6.5. Učinci i primjena

Irinotekan je učinkovit pri liječenju širokog raspona malignih bolesti. Irinotekan svoju najistaknutiju ulogu ima kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim citostaticima koji se primjenjuju kao terapija za liječenje raka debelog crijeva. Irinotekan je također pokazao protutumorsku aktivnost kod raka jednjaka, želuca, gušterače, pluća, leukemije i limfoma, kao i kod malignog tumora središnjeg živčanog sustava (Rothenberg, 2001; Conroy i sur., 2011).

Krvno-moždanu barijeru čini prijelaz između krvi i cerebrospinalne tekućine. Što je veća topljivost neke tvari u lipidima, to je lakši prolaz te tvari (ksenobiotika) u mozak. Iako irinotekan pripada skupini hidrofilnih spojeva, uspješno prolazi krv-mozak barijeru. U pretkliničkim ispitivanjima pokazao je citotoksično djelovanje na stanice tumora središnjeg živčanog sustava. Njegova protutumorska aktivnost također je dokazana protiv stanica glioblastoma, najagresivnijeg tumora mozga s otpornošću na više lijekova (Vredenburg i sur., 2009).

2.7. KONOPLJA

Jedna od najviše spominjanih i najprepoznatljivih biljaka današnjice zasigurno je konoplja (lat. *Cannabis*). Ta jednogodišnja dvodomna biljka pripada porodici Cannabaceae, a o broju njenih vrsta u rodu kanabisa već se dulje vrijeme raspravlja. Dio botaničke struke ovaj rod dijeli na tri vrste: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis* (Schultes i sur., 1974). Međutim, usprkos ovim različitim taksonomskim tumačenjima, konoplja se obično tretira kao jedna, vrlo raznolika vrsta *C. sativa* L. (Small i Cronquist, 1976), dok su *C. sativa*, *C. indica* i *C. ruderalis* prepoznate kao sorte *C. sativa* L. Ekonomski važnije i raširenije su sorte *sativa* i *indica*, dok se sorta *ruderalis* rjeđe uzgaja i to uglavnom na području sjevera Himalaje, otkuda se smatra da je biljka konoplja i potekla (Merlin, 2003).

Uzgoj i upotreba konoplje (*C. sativa*) provodi se zadnjih 5000 do 6000 godina (Jiang i sur., 2006). Raširena medicinska primjena ove biljke datira još od antičkog doba. Prvi izvještaj o ljekovitoj primjeni konoplje seže iz šestog stoljeća pr.Kr. s područja Bliskog istoka i Azije. Prepoznavanje i uvođenje konoplje u medicinske svrhe u zapadnu medicinu dogodilo se mnogo kasnije, početkom devetnaestog stoljeća (Zuardi, 2006). Zbog utjecaja na rast, metastaziranje i angiogenezu tumorskih stanica, ali i drugih bolesti poput multiple skleroze i Parkinsonove bolesti, posljednjih se nekoliko desetljeća aktivno razmatra njena uporaba u medicinske svrhe (Klarić i sur., 2020).

2.7.1. Kanabinoidi

Do sada je identificirano ili izolirano oko 600 spojeva iz *C. sativa*. Među detektiranim spojevima se nalazi oko 120 kanabinoida. Kanabinoidi su terpenofenolni spojevi koji su kemijski srodni terpenima. Prvi izolirani biljni kanabinoid, kanabinol (CBN), otkriven je u ekstraktu ulja konoplje. U ostale najpoznatije i najvažnije prirodne kanabinoide konoplje ubrajaju se (-)- Δ^9 -*trans*-tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC) i kanabidiol (CBD) (ElSohly i sur.,

2017). Osim biljnih kanabinoida, razlikujemo endogene (anandamid i 2-arahidonoilglicerol) i sintetske kanabinoide (JWH-018, JWH250, JWH-122, RCS-04). Endokanabinoide je organizam sisavaca sposoban samostalno sintetizirati, dok su sintetski kanabinoidi psihoaktivne supstance dobivene kemijskim putem u laboratoriju. Ti spojevi oponašaju učinke biljnih ili endogenih kanabinoida (Castaneto i sur., 2014; Piomelli, 2013).

2.7.2. Endokanabinoidni receptori

Najprije se smatralo kako lipofilna kemijska struktura Δ^9 -THC-a djeluje nespecifičnim interakcijama sa staničnim membranama mijenjajući njihovu fluidnost (Lawrence i Gill, 1975). Danas se zna da se u najvećoj mjeri kanabinoidi vežu na dva G-protein kanabinoidna receptora CB1 i CB2 otkrivena u tkivu sisavaca. CB1 dio je centralnoga živčanog sustava, dok je receptor CB2 nađen na stanicama imunološkog sustava. Uz njih, pojam endokanabinoidnog sustava prvotno je uključivao i endogene ligande anandamid i 2-arahidonoilglicerol te pet enzima uključenih u njihovu biosintezu (Huffman i sur., 1997).

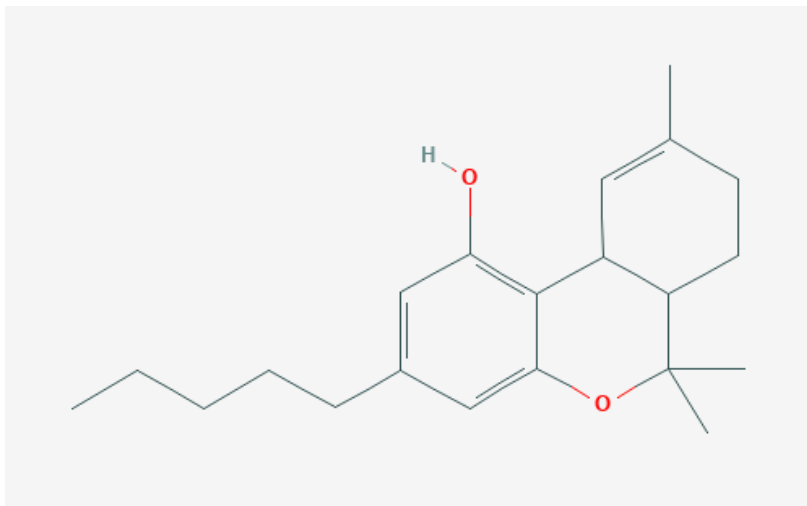
Kanabinoidne receptore mogu aktivirati endokanabinoidi, biljni kanabinoidi poput THC-a, ali i sintetski kanabinoidi. Aktivacija CB1 i CB2 receptora dovodi do inhibicije adenilil-ciklaze čime endokanabinoidi sudjeluju u regulaciji stanične razine cAMP-a, molekule izuzetno važne za biološke procese i prijenos signala (Fulmeri Thewke, 2018). Osim toga, aktivacija CB1 receptora inhibira dva tipa Ca^{2+} ionskih kanala te aktivira K^+ kanale (Mackie i sur., 1993; McAllister i sur., 1999).

Endokanabinoidni sustav dio je različitih procesa u organizmu sisavaca sa svojom kardiovaskularnom, gastrointestinalnom, imunološkom, bihevioralno-kognitivnom, antiproliferativnom i reproduktivnom funkcijom (Mouslech i Valla, 2009). Posljednjih se godina znanstvena otkrića bave razumijevanjem endokanabinoidnog sustava i fitokanabinoida u okviru njihovog antikarcinogenog djelovanja. Taj pristup daje onkološkim bolesnicima nadu za liječenje simptoma uzrokovanih kemoterapijom, kao i razvoj novih terapijskih metoda liječenja (Laezza i sur., 2020).

2.8. Δ^9 -THC

Aktivna tvar THC ((-)- Δ^9 -*trans*-tetrahidrokanabinol) (slika 3) viskozna je smola topljiva u većini organskih otapala (Sharma i sur., 2012). Koncentracija THC-a u konoplji općenito varira ovisno o vrsti konoplje, uzgoju i zrelosti biljke te brojnim drugim faktorima. Iako su geni uključeni u sintezu kanabinoida prisutni u svim stanicama u biljci, THC se u najvećoj

koncentraciji nalazi unutar cvijeta ženske biljke (Hazekamp, 2007). Biljka sadrži neaktivni oblik tetrahidrokanabinolinske kiseline (THCA) koji reakcijom dekarboksilacije prilikom zagrijavanja postiže svoj aktivni oblik tetrahidrokanabinol (Sharma i sur., 2012).



Slika 3. Molekula Δ^9 -THC (National Center for Biotechnology Information, 2020b)

2.8.1. Farmakokinetika THC-a

Na djelovanje THC-a utječu mehanizmi farmakokinetike (apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija). Apsorpcija THC-a varira ovisno o načinu primjene. Glavni, odnosno najčešći način primjene je pušenje, odnosno inhalacija. Inhalacijom se postiže brza apsorpcija THC-a koja rezultira brzim djelovanjem te aktivne tvari u središnjem živčanom sustavu. Bioraspoloživost THC-a nakon pušenja varira ovisno o dubini i vremenu trajanja udisanja dima. Maksimalne koncentracije THC-a postižu se unutar desetak minuta nakon primjene (Huestis, 2007). U usporedbi s inhalacijom, apsorpcija THC-a nakon oralne primjene relativno je spora te rezultira maksimalnom koncentracijom THC-a četiri do šest sati nakon primjene. Oralna bioraspoloživost THC-a je zbog metabolizma prvog prolaza kroz jetru znatno niža u odnosu na inhalaciju te iznosi 10-20% (Wall i sur., 1983). Zbog niske bioraspoloživosti THC-a oralnim putem, razvijeni su alternativni načini uzimanja pripravaka s THC-om. Jedan od takvih je lijek *Sativex*® za ublažavanje mišićnih grčeva koji se javljaju kod osoba koje boluju od multiple skleroze. *Sativex*® se primjenjuje sublingvalno kako bi se izbjegao metabolizam prvog prolaska kroz jetru. Metabolizam THC-a kroz jetru moguće je

izbjeći i rektalnom primjenom u obliku čepića. Bioraspoloživost THC-a rektalnim putem približno je dvostruko veća od bioraspoloživosti oralnim putem (Huestis, 2007). Iz istih razloga, u fokusu ispitivanja je i primjena transdermalnih pripravaka. Pretpostavka je da bi transdermalni unos THC-a trebao rezultirati manjim brojem negativnih nuspojava te općenito smanjiti zlouporabu konoplje zbog sporije distribucije THC-a u mozak ovim putem (Huestis, 2007).

Molekula THC-a (slika 3) lipofilnog je karaktera te se distribuira najprije u visokopokrvljena tkiva kao što su pluća, srce, mozak i jetra. THC se akumulira u masnom tkivu te se polako oslobađa nazad u krv. Dio THC-a zadržava se u mozgu, no omjer koncentracija THC-a u masnom tkivu i mozgu iznosi približno 21 : 1 nakon 7 dana i 64 : 1 nakon 27 dana uzastopne izloženosti (Huestis, 2007). Adams i Martin proučavali su doze THC-a potrebne za induciranje farmakoloških učinaka kod ljudi. Na temelju bioraspoloživosti utvrdili su da bi nakon pušenja cigarete s konopljom koja sadrži 2-22 mg THC-a 1% ove doze bilo pronađeno u mozgu (Adams i Martin, 1996). Volumen raspodjele THC-a je visok i iznosi 10 L kg⁻¹ (Huestis, 2007). THC također prolazi kroz posteljicu, a lipofilni karakter molekule odgovoran je i za nakupljanje THC-a u majčinu mlijeku (Perez-Reyes i Wall, 1982).

Metabolizam THC-a odvija se u jetri, a poluvrijeme života kod povremenih potrošača konoplje iznosi 1,3 dana, dok je za stalne potrošače to vrijeme čak 5-13 dana (Smith-Kielland i sur., 1999). Primarni metabolit oksidacije u jetri je 11-hidroksi-THC (11-OH-THC), a ta je reakcija katalizirana djelovanjem enzima citokrom P450 CYP2C9. Daljnjim reakcijama oksidacije 11-OH-THC prevodi se u neaktivni metabolit THC-COOH. THC-COOH i njegov glukuronidni konjugat glavni su krajnji produkti biotransformacije u većini vrsta, uključujući čovjeka. Osim jetre kao primarnog organa za metabolizam THC-a, u metabolizam THC-a uključena su ostala tkiva kao što su mozak, crijeva i pluća (Huestis, 2007).

Više od 65% apsorbirane doze kanabinoida izlučuje se fecesom, a približno 20% urinom (Wall i sur., 1983). Većina njih (80-90%) izlučuje se tijekom 5 dana od dana primjene kao hidroksilirani i karboksilirani metaboliti. Vodotopljivi glukuronidi izlučuju se urinom, dok 11-OH-THC prevladava u fecesu. Zbog izuzetno lipofilnog karaktera, THC se sporo oslobađa iz masnog tkiva, a kao posljedica enterohepatičke cirkulacije produljeno vrijeme polživota kod pacijenata koji kronično primjenjuju kanabinoide je za oko četiri dana (Johansson i sur., 1988).

2.8.2. Učinci THC-a

Primarni psihoaktivni sastojak konoplje THC povezan je s mnogim farmakološkim učincima kod životinja i ljudi. Iako se sve više ispituje njegov terapijski potencijal u medicinske svrhe, kronična upotreba THC-a potencijalno može dovesti do ovisnosti i poremećaja u ponašanju, kao i povećati rizik od razvoja psihoza (Gage i sur., 2016).

THC je parcijalni agonist CB1 i CB2 receptora. Većinu farmakoloških učinaka ostvaruje preko presinaptičkih CB1 receptora u mozgu posredujući inhibiciju i stimulaciju lučenja neurotransmitora, što objašnjava agonističko-antagonistički učinak THC-a na ponašanje (Morales i sur., 2017). Učinci na ponašanje uključuju osjećaj euforije, opuštenosti, promijenjenu percepciju, manjak koncentracije i kratkoročno pamćenje te intenziviranje normalnih osjetilnih iskustava. Također su zabilježene promjene raspoloženja poput osjećaja panike. Fiziološki učinci uključuju tahikardiju, suhoću usta i grla, povećani apetit, vazodilataciju i smanjenu brzinu disanja (Howlett i sur., 1990). Postoje dokazi da upotreba kanabisa može ubrzati shizofreniju ili pogoršati njene simptome (Gage i sur., 2016).

Dugotrajno pušenje cigarete s konopljom može povećati rizik od nastanka raka dišnog sustava (Bloom i sur., 1987). Također, visoke doze THC-a uzrokuju promjene u količini muških spolnih hormona testosterona, što ima negativan utjecaj na spermatogenezu (Hsiao i Clavijo, 2018).

S druge strane, sve je veći interes, kako znanstvenika i stručnjaka, tako i samih pacijenata, za uporabom metoda alternativne medicine, posebice medicinske konoplje, u liječenju neurodegenerativnih bolesti poput multiple skleroze, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti te raznih oblika raka. Na životinjskim je modelima dokazano da medicinski lijekovi koji oponašaju endokanabinoidni metabolizam značajno ublažavaju kliničke simptome navedenih patoloških stanja (Bari i sur., 2006). Dosadašnja klinička ispitivanja pokazuju analgetičko djelovanje THC-a i sintetskih kanabinoida dronabinola, nabilona i nabixsimolsa kod bolesnika s multiplom sklerozom te bolesnika s karcinomima. Također, THC i njegovi sintetski izomeri koriste se za ublažavanje simptoma mučnina izazvanih kemoterapijom te s ciljem liječenja kaheksije uslijed maligne bolesti stimulacijom apetita (Whiting i sur., 2015). Od ostalih učinaka, novijim se istraživanjima nastoji utvrditi kako povremena upotreba konoplje utječe na poboljšanje kvalitete sna (Babson i sur., 2017).

2.8.2.1. Antikarcinogeni učinak THC-a

U tumorskom je tkivu povećana ekspresija kanabinoidnih CB1 i CB2 receptora, a maksimalno djelovanje THC pokazuje upravo u tkivima gdje su kanabinoidni receptori eksprimirani u velikoj mjeri. Endokanabinoidni sustav predmet je sve većeg broja istraživanja u okviru onkologije, a pripisuje mu se utjecaj na rast, metastaziranje i angiogenezu tumorskih stanica (Guzmán, 2003). Prema dosad provedenim istraživanjama, dokazano je da THC inhibira rast tumorskih stanica pluća (Preet i sur., 2008). Antiproliferacijsko, angiogenetsko, antimetastatsko i apoptotično djelovanje THC-a dokazano je kod raka dojke (Caffarel i sur., 2006). Indikacije za konoplju kod onkoloških bolesnika vezane su za ublažavanje simptoma mučnine i povraćanja nakon kemoterapije, smanjenje boli i poticanje apetita. Problem gubitka apetita i gubitka tjelesne mase prisutan je u preko 50% bolesnika s karcinomom. Provedeno istraživanje pokazalo je učinak THC-a u poboljšanju apetita kod bolesnika s uznapredovalim karcinomom, a primijenjena doza iznosila je 5 mg dnevno (Strasser, 2006).

Potrebna su detaljnija istraživanja vezana uz upotrebu konoplje kao moguće terapije koja bi onkološkim bolesnicima uvelike dala nadu za daljnje liječenje.

2.8.2.2. Međudjelovanje THC-a i irinotekana

Posljednjih godina postoji značaj interes za upotrebu medicinske konoplje u kombinaciji s konvencionalnom terapijom citostaticima (Pyszniak i sur., 2016). Kanabinoidi se kombiniraju s konvencionalnim citotoksičnim lijekovima s glavnim ciljem ublažavanja i smanjenja nuspojava kemoterapije. Međutim, zbog složenog metabolizma irinotekana, kao i THC-a, potrebna su daljnja istraživanja kojima će se tek procijeniti utjecaj THC-a na metabolizam irinotekana. Osim nedostatnih podataka o terapijskoj učinkovitosti THC-a, interakcije kanabinoid-lijek mogu biti povezane s potencijalno negativnim učincima što izaziva brojne proturječnosti (Ujváry i Hanuš, 2016). Zajedničko obilježje citostatika i kanabinoida je relativno usko terapijsko područje djelovanja te dugo poluvrijeme života (Smith-Kielland i sur., 1999). Također, i THC i irinotekan supstrati su enzima citokroma P450 (Dodds i sur., 1998; Yamaori i sur., 2010). Kanabinoidi se zbog svoje lipofilnosti i značajne enterohepatične recirkulacije sporo otpuštaju iz masnog tkiva, što otežava njihovu eliminaciju iz organizma (Johansson i sur., 1988).

Rezultati istraživanja provedeni na štakorima pokazuju da klinički učinci irinotekana uz djelovanje Δ^9 -THC-a mogu biti promijenjeni. Doza irinotekana od 100 mg kg⁻¹ tjelesne mase, kao i kombinirani tretman irinotekana i THC-a uzrokuju umjereni stupanj leukopenije i

neutropenije. Relativno niska doza THC-a (7 mg kg^{-1} tjelesne mase) u kombiniranom liječenju s irinotekanom prouzrokuje niži broj leukocita u odnosu na jednokratnu primjenu doze irinotekana. Taj podatak sugerira na veće citotoksične učinke u kombiniranom liječenju. Također, izlučivanje nekonjugiranog oblika THC-COOH urinom značajno je povećano kod kombiniranog tretmana irinotekana i THC u usporedbi s THC-om, što ukazuje na moguću interakciju lijekova i inhibicijske učinke kanabinoida. Ovi su rezultati u skladu s prijavljenim inhibitornim učincima kanabinoida na metabolizam irinotekana što bi moglo objasniti veću leukopeniju u kombiniranom liječenju u usporedbi s irinotekanom (Prester i sur., 2018).

S druge strane, dokazano je da primjena medicinske konoplje koja je sadržavala 18% THC-a (konzumirana jednom dnevno kao čaj (200 ml čaja, 1 g/L) u vremenskom periodu od 3 tjedna) nije značajno ometala farmakokinetiku irinotekana (600 mg) te se kao takva primjenjuje svaka 3 tjedna kod bolesnika s rakom debelog crijeva (Engles i sur., 2007). Ostala provedena istraživanja na ovu temu potvrđuju da je akutna jetrena toksičnost nakon terapije irinotekanom ublažena u prisutnosti THC-a (Prester i sur., 2018; Pacher i Mechoulam, 2011). Potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se istražila učinkovitost i sigurnosni profili kanabinoida koje onkološki bolesnici mogu zaprimiti tijekom kemoterapije kako bi postigli najveći omjer koristi i rizika u terapiji (Prester i sur., 2018).

2.9. IN VITRO TESTOVI TOKSIČNOSTI

In vitro testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, itd. (Kniewald i sur., 2005). Prednost takvih testova je cijena troškova za njihovo provođenje, etički razlozi, rezultati su dostupni u relativno kratkom vremenu te je moguća interpretacija i prijenos rezultata na čovjeka. Primjena *in vitro* staničnih kultura temelji se na interakciji ispitivane tvari i bioloških sustava, a dobiveni se rezultati mogu koristiti za daljnja *in vivo* istraživanja. Nedostatak *in vitro* testova je upravo to što ne mogu u potpunosti zamijeniti *in vivo* ispitivanja (npr. ispitivanje metaboličkih promjena) (Fent, 2001). Kultura stanica predstavlja pojedinačne stanice izdvojene iz tkiva ili organa koje je potrebno nacijepiti u hranjivom mediju kako bi se održale njihove specifičnosti u *in vitro* uvjetima. Subkultiviranjem stanica prisutnih u primarnoj kulturi dobivajuse stanične linije. U svrhu znanstveno-istraživačkih radova najčešće se koriste kontinuirane stanične linije koje odlikuje brza proliferacija i smanjena potreba za serumom (Freshney, 2000).

Posljednjih godina velik broj ispitivanja svojstva biološki aktivnih tvari bavi se upravo njihovim antitumorskim djelovanjem. Pri *in vitro* ispitivanju biološke aktivnosti prirodnih spojeva, kao što je THC, najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije iz banke stanica. Više različitih metoda ispitivanja daje informacije o mehanizmu djelovanja i citotoksičnosti ispitivane tvari. Potencijal antitumorskog djelovanja nekog spoja zatim se potvrđuje *in vivo* ispitivanjima te usmjerava k fazi razvoja novih antitumorskih lijekova. (Kitaeva i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

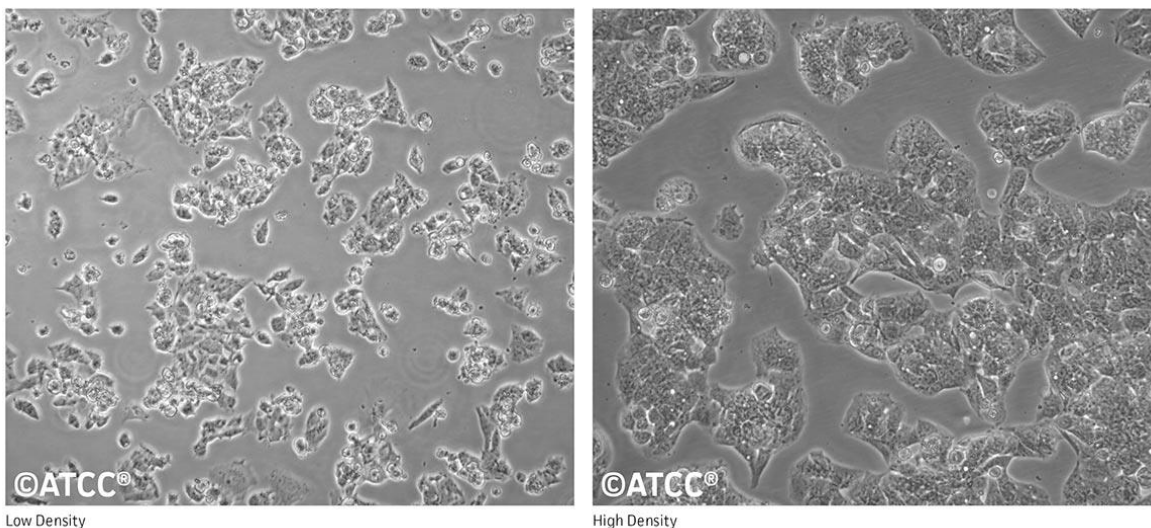
3.1.1. Biološki test sustavi

U ovom su istraživanju korištene kontinuirane humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 te adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2.

Stanična linija HepG2 (slika 4) dobivena je iz jetre hepatocelularnog karcinoma petnaestogodišnjeg dječaka bijele rase (Mersch-Sundermann i sur., 2004). Zbog značajne uloge jetre kao metaboličkog organa, stanična linija HepG2 redovito se koristi u *in vitro* testovima. Primjena HepG2 stanične linije posebno je važna kao prvi korak u ispitivanjima spojeva potencijalnog antitumorskog djelovanja (Batra i Sharma, 2013). Najistaknutije uloge ove stanične linije svakako su u raznim ispitivanjima lijekova, u studijama metabolizma jetre i toksičnosti ksenobiotika te otkrivanju okolišnih i prehrambenih citotoksičnih i genotoksičnih parametara (Mersch-Sundermann i sur. 2004).

ATCC Number: HB-8065

Designation: Hep G2

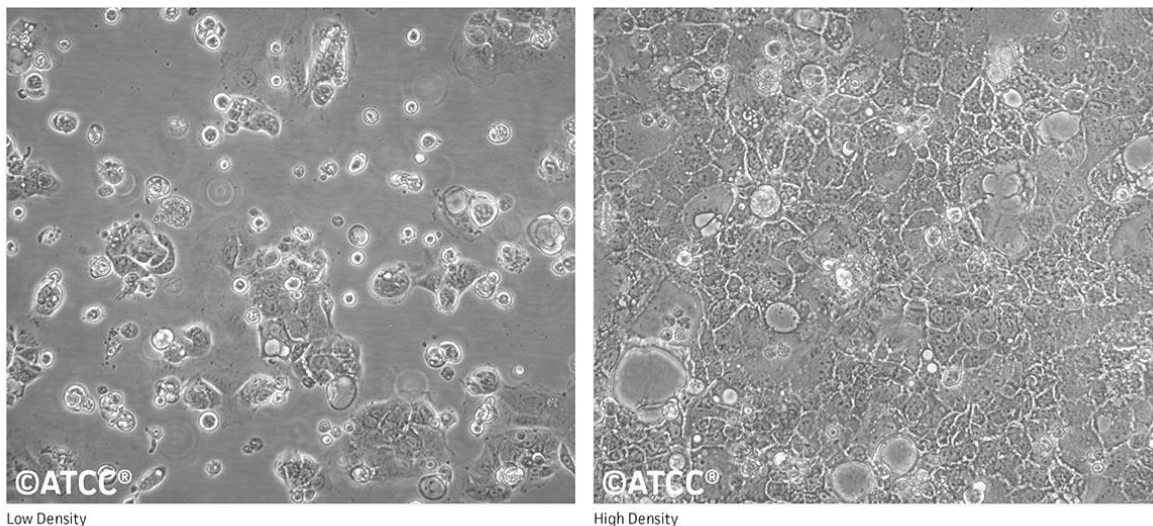


Slika 4. Stanična linija HepG2 (ATCC, 2020a)

Stanična linija Caco-2 (slika 5) izolirana je iz adenokarcinoma debelog crijeva sedamdesetdvogodišnjeg muškarca bijele rase (Sambuy i sur., 2005). Epitelne stanice ove stanične kulture spontano diferenciraju i stvaraju monosloj čime morfološki i funkcionalno pokazuju karakteristike zrelog enterocita. Caco-2 stanični model jedan je od najvažnijih

modela za ispitivanje intestinalne apsorpcije i metabolizma lijekova *in vitro* u farmaceutskoj industriji i znanstvenim istraživanjima (Sun i sur., 2008).

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



Slika 5. Stanična linija Caco-2 (ATCC, 2020b)

Navedene stanične linije kultivirane su u monosloju u plastičnim T-bocama ravnih stijenki u inkubatoru pri 37 °C u vlažnoj atmosferi (relativna vlažnost zraka 95%) uz 5% CO₂. Kao medij za rast korišten je kompletirani medij *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Invitrogen) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) konačne koncentracije od 10%. Prilikom presađivanja stanica za potrebe eksperimenata, stanice su odlijepljene i razdvojene pomoću 0,25%-tne otopine tripsina.

3.1.2. Istraživani spojevi

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su kemoterapeutik irinotekan (LC Laboratories, Woburn, MA, SAD) te tetrahidrokanabinol, THC (THC Pharm GmbH, Njemačka, 99,9%). Za potrebe eksperimenta, otopine irinotekana i THC-a pripremane su neposredno prije primjene. THC je najprije otopljen u polarnom organskom otapalu dimetilsulfoksidu (DMSO), a zatim razrijeđen do odgovarajuće koncentracije u hranjivom mediju. Primijenjene koncentracije irinotekana u ovom istraživanju su 8,5 µg mL⁻¹, 83 µg mL⁻¹ i 100 µg mL⁻¹, a THC-a 0,33 µg mL⁻¹ i 7 µg mL⁻¹. Kombinacije koncentracija u smjesi irinotekana i THC-a korištene za tretiranje HepG2 i Caco-2 stanica bile su: IRI 8,5 µg mL⁻¹ + THC 0,33 µg mL⁻¹, IRI 83 µg mL⁻¹ + THC 0,33 µg mL⁻¹, IRI 100 µg mL⁻¹ + THC 0,33 µg mL⁻¹ te IRI 8,5 µg mL⁻¹ + THC 7

$\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI $83 \mu\text{g mL}^{-1} + \text{THC } 7 \mu\text{g mL}^{-1}$, IRI $100 \mu\text{g mL}^{-1} + \text{THC } 7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tretman stanica uključivao je vrijeme od 2, 4, 24 i 48 sati, bez i s oporavkom.

Raspon koncentracija irinotekana odabran je s obzirom na preporučenu monoterapijsku dozu primijenjenu kod ljudi ($8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), koncentraciju određenu kao LD_{50} kod štakora kojima je irinotekan apliciran intravenozno ($83 \mu\text{g mL}^{-1}$) te maksimalnu dozu tolerancije u štakora ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (de Jong i sur., 2006; Lucić Vrdoljak i sur., 2018).

Koncentracije THC-a u ovom istraživanju odabrane su s obzirom na primijenjenu dozu u medicinske svrhe te dozu ranije ispitivanu u *in vivo* ili *in vitro* sustavima. Zbog velike varijabilnosti farmakokinetičkog profila THC-a s obzirom na način primjene, mnoga se istraživanja bave utvrđivanjem učinkovite doze i sigurne primjene THC-a u medicinske svrhe. Raspon oralnih doza koje se primijenjuju u terapiji kod ljudi kreće se od 2,5 do 20 mg THC-a. Koncentracija od $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ odgovara koncentraciji THC-a u dronabinolu, lijeku koji se daje pacijentima sa svrhom liječenja kemoterapijom inducirane mučnine i povraćanja (Meiri i sur., 2007). Lucić Vrdoljak i suradnici u svom su *in vivo* istraživanju upotrijebili dozu THC-s od $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ za koju se utvrdilo da je sadrže razni ilegalni pripravci bogati THC-om (Lucić Vrdoljak i sur., 2018), a ta ista koncentracija granična je koncentracija za citotoksične učinke THC-a (Stoček, 2019).

3.1.3. Kemikalije

- Agaroz niske točke tališta (LMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Agaroz normalne točke tališta (NMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Bromtimol plavo, *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Coomassieblue, *Bio-Rad, SAD*
- Dinitrofenilhidrazin(DNPH), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Dimetil-sulfoksid (DMSO), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Etidij-bromid ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim*, Njemačka
- Etil-acetat, *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska
- Fetal Bovine Serum (FBS), *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Fosforna kiselina (H_3PO_4), *Kemika, Zagreb*, Hrvatska

- Irinotekan, *LC Laboratories*, Woburn, MA, SAD
- Giemsa boja, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Glicerol, *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Klorovodična kiselina (HCl), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Kristal violet, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Malondialdehid, *Sigma Chemical*, Steinheim, Njemačka
- Na₂EDTA, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Natrijev dihidrogenfosfatdihidrat (NaH₂PO₄ x 2H₂O), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dodecil-sulfat (SDS), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev hidroksid (NaOH), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Carlo ErbaReagents*, Francuska
- Natrijev-laurilsarkozinat, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Neutral-red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid),
Steinheim, Njemačka
- Octena kiselina (CH₃COOH), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Plazmid phiX174 RF1 DNK, *ThermoScientific*, SAD
- Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), *Capricorn Scientific GmbH*,
Njemačka
- Tetrahidrokanabinol (THC), *THC Pharm GmbH*, Njemačka
- Tiobarbiturna kiselina (TBA), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Trikloroetena kiselina (TCA), *Fisher*, Velika Britanija
- Tripsin, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Tris-HCl, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Triton X-100, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Vodikov peroksid (H₂O₂), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

3.1.4. Priprema otopina

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, 1 M:

- | | |
|--|--------|
| • NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O | 7,89 g |
| • Destilirana voda | 50 mL |

Natrijev hidrogenfosfat, 1 M:

- Na_2HPO_4 7,1 g
- Destilirana voda 50 mL

Fosfatni pufer, 0,2 M:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1 M
- Na_2HPO_4 1 M
- Razrijediti do 0,2 M

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

- Neutral red 50 mg
- Etanol 10 mL

Radna otopina Neutral red, 0,1% -tna:

- Ishodišna otopina Neutral red ($\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$) 0,1 mL
- RPMI 1640 medij 10 mL

Otopina za odbojavanje:

- Octena kiselina 1 mL
- Etanol 50 mL
- Destilirana voda 49 mL

Otopina Giemsa i Kristal violet boje:

- Kristal violet 0,125 g
- Giemsa boja 1,25 mL
- Destilirana voda do 100 mL

Bradfordov reagens:

- Coomassieblue 10 mg
- EtOH, 96% 5 mL
- H₃PO₄ 10 mL
- Destilirana voda do 100 mL

Dinitrofenilhidrazin, 10 mM:

- DNPH 0,198 g
- EtOH, 96%-tni 100 mL

Otopina tiobarbiturne kiseline:

- TBA 0,8 g
- TCA 100 mL

Vodikov peroksid, 10 mM:

- H₂O₂, 3%-tni 0,11 mL
- Destilirana voda 10 mL

TAE puffer:

- Tris 48,4 g
- Ledena octena kiselina 11,4 mL
- EDTA 3,7 g
- Destilirana voda do 1000 mL

Agarozni gel, 1,5%-tni:

- Agaroz 1,5 g
- TAE puffer 100 mL

Obojeni pufer za nanošenje (engl. *loading buffer*):

- Bromtimol plavo 0,2 g
- Glicerol, 50%-tni 6 mL
- Destilirana voda 4 mL

Otopina etidij-bromida:

- Etidij-bromid 2 µg
- Destilirana voda 1000 mL

Otopina NMP agaroze, 1,5%-tna:

- NMP agarozna 0,15 g
- PBS 10 mL

Otopina LMP agaroze, 0,5%-tna:

- LMP agarozna 0,05 g
- Destilirana voda 10 mL

Pufer za lizu stanica:

- NaCl (2,5 M) 130 g
- EDTA (100 mM) 29,225 g
- Tris(10 mM) 1,078 g
- Natrij-laurilsarkozinat, 1%-tni 8,9 g
- Triton X-100 1 mL
- DMSO, 10%-tni 10 mL

Pufer za elektroforezu:

- NaOH (10 M) 30 mL
- Na₂EDTA (200 mM) 5 mL
- Destilirana voda 965 mL

Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5):

- Tris 48,5 g
- Destilirana voda 1000 mL
- HCl do pH = 7,5

3.1.5. Laboratorijska oprema

3.1.5.1. Uređaji

- Analitička vaga 1712 Mp8 Silver Edition, *Sartorius*, Velika Britanija
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Digestor
- Epifluorescencijski mikroskop, *Leica Microsystems GmbH*, Wetzlar, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, *Forma Scientific*, SAD
- Invertni mikroskop, *Optika Microscopes*, Ponteranica, Italija
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, *Iskra*, Slovenija
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd*, *Technical Centre Cambrige*, Engleska
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa, *Comet Assay II*, *Perceptive Instruments Ltd*, UK
- Svjetlosni mikroskop mikroskop, *Carl Zeiss Jena*, Njemačka
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies*, New York, SAD
- Vaga, *Sartorius*, Engleska
- Vibromikser EV-102, *Tehtnica Železniki*, Slovenija
- Vodena kupelj, *Tehtnica Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific*, SAD

3.1.5.2. Pribor

- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf kivete
- Erlenmayerove tikvice, 20-100 mL
- Falcon epruvete

- Kivete od optičkog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja
- Laboratorijske žlice
- Menzure, 50-1000 mL
- Mikropipete, 10, 20, 200, 1000 μ L, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Mikrotitarske pločice s 24 i 96 jažica, *Falcon*, SAD
- Pasteurove pipete, 5-25 mL
- Plastične Petrijeve zdjelice, *Aptaca*, Canelli, Italija
- Pokrovna stakalca
- Propipete
- Staklene čaše
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-25 mL
- Stakleni lijevak
- Špatula
- T-boce, *Falcon*, *BD Company*, Franklin Lakes, SAD
- Vata za pravljenje čepova

3.2. METODE

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

Stanične linije s 10% glicerola čuvaju se na temperaturi -80 °C. Prije provođenja tretmana stanice su odmrznute u vodenoj kupelji pri 37 °C. Zatim je slijedio postupak centrifugiranja stanica (100 rpm / 5 min) s ciljem uklanjanja supernatanta u kojem su se nalazili ostaci medija i krioprotektivnog sredstva glicerola. Dodan je 1 mL svježeg medija zagrijanog pri 37 °C, a potom su slijedili resuspendiranje staničnog taloga u svježem mediju i ponovo centrifugiranje (1000 rpm / 1,5 min). Stanični se talog nasadio u Petrijeve zdjelice promjera 5 cm da bi se izvršila propagacija stanica. Nakon 24 sata stanice su nasađene u T-boce većeg volumena i uzgajane u inkubatoru pri 37 °C uz 95% zraka i 5% CO₂ do subkonfluentnog stanja, kad su bile spremne za korištenje u eksperimentalne svrhe. Sav rad sa staničnim kulturama odvijao se u laminaru u aseptičkim i sterilnim uvjetima (Freshney, 2010).

3.2.1.1. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja

Nakon što su stanice postigle subkonfluentno stanje, iz T-boca se uklanio medij te su se stanice ispirale s 1 mL tripsina s ciljem uklanjanja ostataka iskorištenog seruma i medija. Minimalna količina tripsina dodana je na dno T-boce čime se postiglo odvajanje stanica od površine. Tripsinizirane su se stanice najprije inkubirale, a proteolitički je učinak tripsina zaustavljen dodatkom medija sa serumom na stanice. Manja količina stanica je resuspendirana u T-boci u novom mediju za daljnji rast, a ostatak suspenzije se koristio za eksperimentalni rad (Freshney, 2010).

3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću Bürker-Türkove komorice

Kako bi se nasadio točno određeni broj stanica koje će biti izložene djelovanju ispitivanih spojeva, stanice je potrebno izbrojati. Broj stanica određen je pomoću Bürker-Türkove komorice pod svjetlosnim mikroskopom. Uzetih 20 μL uzorka stanične suspenzije se resuspendiralo, a zatim se volumen od 10 μL nanio na Bürker-Türkovu komoricu ispod pokrovnog stakalca. Slika pronalska uključuje četiri velika kvadrata koja se sastoje od 16 malih kvadrata. Prostor između pokrovnog stakalca i predmetnice iznosi 0,1 mm, površina svakog kvadrata je 1 mm^2 , a volumen 1×10^{-4} mL. Iz toga proizlazi jednadžba za izračunavanje ukupnog broja stanica u uzorku [1]:

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

[1]

3.2.3. Određivanje citotoksičnog i proliferacijskog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnim linijama HepG2 i Caco-2

3.2.3.1. Neutral red test

Jednostavna i često korištena metoda za određivanje citotoksičnosti nekog spoja je Neutral red test (engl. *neutral red*, NR). Neutral Red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) je kationska boja koja prolazi kroz staničnu membranu aktivnim transportom te se akumulira unutar stanice u lizosomima. Razni ksenobiotici dovode do oštećenja stanične ili lizosomske membrane čime smanjuju unos i zadržavanje boje. Oštećene ili mrtve stanice ne vežu NR čime se ovom metodom kvantitativno određuje broj živih stanica koji je u direktnoj

ovisnosti o utjecaju ispitivanog ksenobiotika na morfologiju stanice. Boja u stanicama ekstrahira se otopinom za odbojavanje, nakon čega se mjeri apsorbancija. Ishodišna otopina priprema se otapanjem boje u etanolu u koncentraciji 5 mg mL⁻¹, nakon čega se razrjeđuje u mediju za rast stanica kako bi se dobila 10%-tna otopina (Repetto i sur., 2008; Babich i Borenfreund, 1991).

Ispitivanje citotoksičnosti provedeno je na humanim staničnim linijama HepG2 i Caco2. Suspenzije stanica HepG2 i Caco-2 naciepljene suna mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od 10⁵ st mL⁻¹ (100 μL po jažici) te su se inkubirale pri 37 °C. Nakon 24 sata kad je došlo do njihovog vezanja i diobe, uklonjen je medij sa stanica. Slijedio je tretman stanica sa 6 prethodno pripremljenih otopina irinotekana i THC-a različitih kombinacija koncentracija u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati pri 37 °C, bez oporavka i s oporavkom. Kao negativna kontrola korišten je medij za rast stanica. Po završetku tretmana, iz jažica su uklonjene otopine irinotekana i THC-a (tretman bez oporavka), odnosno medij (tretman s oporavkom). Stanice su zatim isprane PBS puferom (100 μL) kako bi se uklonili ostaci otopina irinotekana i THC-a te medija. Na isprane je stanice potom dodana otopina Neutral red boje (100 μL po jažici), nakon čega je slijedila inkubacija u trajanju od 1 sata pri 37 °C. Neutral red boja je nakon inkubacije uklonjena iz jažica, stanice su se ponovno ispirale sa 100 μL PBS pufera te im je dodana otopina za odbojavanje (100 μL) kako bi se boja ekstrahirala iz lizosoma živih stanica (Repetto i sur., 2008). Intenzitet obojenja, proporcionalan broju preživjelih stanica, mjerio se spektrofotometrom pri valnoj duljini od 520 nm. Pritom se kao slijepa proba koristila jažica bez naciepljenih stanica. Postotak preživljenja računao se u odnosu na negativnu kontrolu prema jednadžbi [2]:

$$\begin{aligned} & \textit{Preživljenje stanica (\% u odnosu na kontrolu)} \\ & = \left(\frac{A_{520 \text{ nm otopine irinotekana i THC-a}}}{A_{520 \text{ nm kontrole}}} \right) * 100 \\ & \quad [2] \end{aligned}$$

3.2.3.2. Klonogeni test

Test formiranja kolonija (engl. *colony forming assay*) ili klonogeni test je *in vitro* metoda određivanja preživljenja stanica koja se temelji na mogućnosti pojedinačne stanice da izraste u koloniju koju čini skup od najmanje 50 stanica. Klonogeni test prati svaku stanicu u populaciji i njeno svojstvo neograničenog rasta, što predstavlja jednu od glavnih

karakteristika tumorskih stanica. Pomoću ove metode moguće je mjeriti utjecaj ionizirajućeg zračenja na staničnu proliferaciju i sposobnost formiranja kolonija, kao i odrediti učinkovitost citotoksičnih agenasa, budući da samo mali dio izloženih stanica zadrži sposobnost stvaranja kolonija (Franken i sur., 2006).

Ispitivanje citotoksičnog i proliferacijskog učinka provedeno je na humanim staničnim linijama HepG2 i Caco-2. Suspenzije stanica HepG2 i Caco-2 nacjepljene su u mikrotitarske ploče s 24 jažice. Početna koncentracija stanica iznosila je 20 st mL^{-1} . Stanice je bilo potrebno inkubirati 24 sata, nakon čega su tretirane otopinama irinotekana i THC-a. Nakon tretmana koji je uključivao 2, 4, 24 i 48 sati uklonjene su otopine irinotekana i THC-a, dodano je 5 mL svježeg medija te su stanice inkubirane na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u vremenskom periodu od 7 do 10 dana do porasta vidljivih kolonija. Nakon 7 do 10 dana od tretmana uklonjen je medij, a porasle kolonije obojane su 1,25%-tnom otopinom Giemsa boje te 0,125%-tnom otopinom kristal violeta. Slijedila je inkubacija u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi, a posljednji korak bio je ispiranje boje PBS puferom te brojanje kolonija golim okom.

Postotak preživljenja stanica izračunao se prema formuli [3]:

$$\% \text{ preživljenja} = \left(\frac{\text{broj poraslih kolonija}_{\text{uzorak}}}{\text{broj poraslih kolonija}_{\text{kontrola}}} \right) * 100$$

[3]

3.2.4. Određivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnim linijama HepG2 i Caco-2

Ksenobiotici mogu izazvati oštećenje stanica te tako dovesti do niza složenih događaja. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) u stanici potječu iz različitih izvora, a karakteristično za njih je da su to izrazito reaktivni elektrofilni spojevi koji vrlo lako reagiraju sa staničnim makromolekulama izazivajući oštećenja. Spektar djelovanja reaktivnih kisikovih skupina i slobodnih radikala je oksidacija proteina koja dovodi do izmijenjene funkcije proteina, lipidna peroksidacija koja za posljedicu ima oštećenje stanične membrane, oštećenje nukleinskih kiselina i dr. (Lucić Vrdoljak i sur., 2018).

3.2.4.1. Tretman stanica HepG2 i Caco-2 različitim otopinama irinotekana i THC-a za određivanje stupnja karbolnilacije, lipidne peroksidacije i genotoksičnog učinka

Tretman stanica HepG2 i Caco-2 različitim koncentracijama irinotekana i THC-a uključivao je nacjepljivanje 5 mL prethodno pripremljene stanične suspenzije HepG2 i Caco-2 u

koncentraciji od 10^5 st mL^{-1} u plastične Petrijeve zdjelice promjera 5 cm. Nakon inkubacije na $37\text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 24 h, promijenjen je medij te su stanice tretirane prethodno pripremljenim otopinama irinotekana i THC-a različitih koncentracija: IRI $8,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI $8,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (ove su koncentracije odabrane s obzirom na rezultate preživljenja stanica te su stanice tretirane samo s koncentracijama koje su imale subtoksični ili netoksični učinak) u trajanju inkubacije od 2, 4 i 24 sata pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, bez i s oporavkom. Po završetku tretmana, iz Petrijevih zdjelica uklonjen je medij s otopinama irinotekana i THC-a, stanice su isprane PBS puferom, tripsinizirane i prebačene u Eppendorf epruvete. Slijedilo je centrifugiranje 5 min na 5000 rpm, nakon čega je odbačen supernatant, a suspenzija stanica se koristila u daljnjem provođenju eksperimenta.

3.2.4.2. Određivanje ukupnih proteina metodom po Bradfordu

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu temelji se na izravnom vezanju boje Coomassie Brilliant Blue na proteine u kiselom mediju. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama, boja se stabilizira u anionskom obliku te dolazi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Vezanjem boje dolazi do brzog pomaka apsorpcijskog maksimuma, od 465 nm do 595 nm. Intenzitet razvijene boje u određenom opsegu koncentracija proteina proporcionalan je koncentraciji proteina. Bradford reagens priređuje se otapanjem boje Coomassie Brilliant Blue u otopini etanola, u koju se dodaje fosforna kiselina i destilirana voda, a pripremljena otopina smeđe je boje (Bradford, 1976).

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina pripremljena je otopina proteina albumina iz goveđeg seruma (BSA) miješanjem otopine početne koncentracije od 1 mg mL^{-1} s odgovarajućim volumenom destilirane vode tako da konačne koncentracije proteina u uzorku budu 1, 2, 4, 6, 8 i $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Za svaku koncentraciju proteina proteina pripremljene su dvije paralele, a za cijelu seriju mjerenja jedna slijepa proba. Dodan je 1 mL Bradfordovog reagensa, promiješan te ostavljen 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je izmjerena vrijednost apsorpcije na 595 nm i konstruiran baždarni dijagram ovisnosti A_{595} o koncentraciji proteina u uzorku. Dobivena jednadžba pravca iz baždarnog dijagrama koristila se kasnije u određivanju koncentracije proteina u uzorcima sa stanicama tretiranim različitim otopinama irinotekana i THC-a. Slijedilo je mjerenje apsorpcija uzoraka sa stanicama tretiranim različitim otopinama irinoteka i THC-a, pri čemu se uzimalo $5\text{ }\mu\text{L}$ uzoraka, $95\text{ }\mu\text{L}$

destilirane vode i 1 mL Bradfordovog reagensa. Za svaki je uzorak bilo potrebno pripremiti dvije paralele, kao i slijepu probu.

Koncentracija proteina određena je prema jednadžbi iz baždarnog dijagrama [4]:

$$\gamma(\text{proteina}) \text{ mg mL}^{-1} = \frac{A_{595} - b}{a}$$

[4]

gdje je b – odsječak na osi y baždarnog dijagrama,

a – koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama.

3.2.4.3. Kvantificiranje proteinskih karbonila u HepG2 i Caco-2 stanicama tretiranim različitim otopinama irinotekana i THC-a

Proteinski karbonili produkt su oksidacijskog oštećenja proteina te su jedan od najčešće mjerenih pokazatelja oksidacijskog oštećenja, pri čemu njihova povišena koncentracija ukazuje na oksidacijski stres u organizmu. Metoda određivanja razine oksidacije bazirana je na reakciji karboniliranog proteina s dinitrofenilhidrazinom (DNPH) (Erdogan i sur., 2018).

Postupak određivanja stupnja oksidacije proteina započinjao se onako kako je opisano u podpoglavlju 3.2.4.1. U tako dobivene uzorke dodano je 100 μL 10%-tnog natrijevog dodecil-sulfata (SDS) te resuspendirano. Zatim je dodano 10 mM DNPH u volumenu od 100 μL , vorteksirano te ostavljeno na inkubaciji oko 1 h na tamnom. Nakon inkubacije dodano je 0,5 mL 10%-tne ledene octene kiseline koja je uzrokovala taloženje proteina. Nakon inkubacije od 15 minuta na 4 °C slijedilo je centrifugiranje, odbačen je supernatant, a talog se ispirao smjesom etanol:etil-acetat (1:1) te ponovno centrifugirao. Nakon centrifugiranja dodano je 200 μL 6 M gvanidin-HCl te se mjerila apsorbancija na 370 nm. Koncentracija nastalih karbonila izražena je po miligramu ukupnih staničnih proteina koji su u uzorcima određeni metodom po Bradfordu, koja je opisana u podpoglavlju 3.2.4.2.

Za izračunavanje koncentracije karbonila u uzorku koristila se sljedeća formula [5]:

$$c(\text{PCO}) = \frac{10^6 * \left(\frac{A_{370}}{22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}} \right)}{\gamma(\text{protein}) \text{ mg mL}^{-1}}$$

[5]

gdje je M – ekstincijski koeficijent (ϵ) pri 370 nm (Colombo i sur., 2016).

3.2.4.4. *Određivanje stupnja lipidne peroksidacije u stanicama HepG2 i Caco-2*

Lipidna peroksidacija spontani je proces koji se odvija u membranama stanica. Reakcije između slobodnih radikala i nezasićenih masnih kiselina imaju sposobnost izmijeniti strukturu lipida, a time i njihova kemijska svojstva. Produkti lipidne peroksidacije nisu stabilni te uzrokuju različite biološke učinke. Jedna od posljedica lipidne peroksidacije je stvaranje malondialdehida, a mjerenje krajnjih produkata lipidne peroksidacije jedno je od najprihvaćenijih ispitivanja oksidacijskog oštećenja. Razine malondialdehida moguće je izmjeriti pomoću tiobarbiturne kiseline metodom TBARS, pri čemu malondialdehid reagira s tiobarbiturnom kiselinom u kiselom mediju na 100 °C dajući kompleks ljubičaste boje. Gustoća boje povezana je sa stupnjem peroksidacije lipida (Bujak, 2015).

Postupak određivanja stupnja lipidne peroksidacije započeo je tretmanom stanica, kao što je opisano u podpoglavlju 3.2.4.1. Staničnim talozima dodane su staklene kuglice i 100 μL destilirane vode, nakon čega se vorteksiralo 3 puta po 30 sekundi kako bi došlo do lize stanica. Nakon svakog razbijanja, stanice su se kratko hladile u ohlađenom termobloku kako bi se se izbjegla degradacija proteina i inicijacija kemijskih reakcija uzrokovana povišenjem temperature. Zatim su se iz uzoraka uzimali alikvoti od 2 puta po 5 μL za određivanje ukupnog sadržaja proteina, a u preostali sadržaj uzoraka dodano je 600 μL tiobarbiturne kiseline otopljene u trikloroctenoj kiselini [TBA(TCA)]. U takvim kiselim uvjetima malondialdehid je prešao iz acetatnog u aldehydni oblik, a ujedno je u tim uvjetima trikloroctena kiselina uzrokovala taloženje svih staničnih proteina. Uzorci su se stavili u vodenu kupelj na 95 °C kroz 1 h, nakon čega je slijedilo centrifugiranje te su se dobiveni supernatanti koristili u daljnjem provođenju eksperimenta. Na crne mikrotitarske pločice sa 96 jažica nanosilo se 100 μL uzoraka te se mjerio intenzitet fluorescencije pri $\lambda_{\text{ex/em}} = 560/585$ nm.

Baždarni dijagram za određivanje koncentracija malondialdehida u uzorcima

Ishodišna otopina 0,2 mM malondialdehida razrijeđena je destiliranom vodom kako bi se dobile otopine s konačnom koncentracijom malondialdehida 4, 8, 12, 16 i 20 μM . Otopine malondialdehida reagirale su s tiobarbiturnom kiselinom otopljenom u trikloroctenoj kiselini u vodenoj kupelji pri temperaturi od 95 °C kroz 1 h. Nakon reakcije s tiobarbiturnom kiselinom nastao je kompleks ljubičaste boje, a intenzitet nastalog MDA-TBA kompleksa mjerio se fluorimetrijski pri valnoj duljini emisije od 585 nm i ekscitacije od 560 nm. Vrijednosti

fluorescencije unosile su se na ordinatu, a pripadajuće vrijednosti koncentracija na apscisu baždarnog dijagrama. Iz dobivenog pravca određena je jednadžba pravca koja je služila za određivanje nepoznatih koncentracija malondialdehida u uzorcima kojima je izmjerena fluorescencija te se računalo prema slijedećoj jednadžbi [6]:

$$\gamma(\textit{komples MDA - TCA})\mu\text{M} = \frac{A_{560/585} - b}{a} \mu\text{M}$$

[6]

gdje je b – odsječak na osi y baždarnog dijagrama,

a – koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama.

Koncentracija malondialdehida u uzorcima je izražena po miligramu proteina izmjerenih u uzorcima, a koncentracija proteina određena je metodom prema Bradfordu, opisanoj u podpoglavlju 3.2.4.2. prema jednadžbi iz baždarnog dijagrama [4] dobivenoj određivanjem ukupnih proteina.

Koncentracija malondialdehida (MDA) računala se po formuli [7]:

$$\gamma(\textit{MDA}) = \frac{\gamma(\textit{komples MDA - TCA})\mu\text{g L}^{-1}}{\gamma(\textit{proteina})\text{mg mL}^{-1}} \mu\text{M}$$

[7]

3.2.5. Određivanje genotoksičnog i protektivnog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na modelnoj DNK i staničnom genetičkom materijalu

3.2.5.1. Elektroforeza u agaroznom gelu

Učinak različitih koncentracija irinotekana i THC-a na plazmid phiX174 RF1 DNK koji je podvrgnut UV zračenju u trajanju od 16 minuta te djelovanju vodikovog peroksida pratio se elektroforezom u agaroznom gelu. Agarozni gel koristi se za razdvajanje molekula veličine 100 – 50,000 bp (Makovets, 2013). Elektroforeza u agaroznom gelu označava proces u kojem čestica određenog naboja putuje pod djelovanjem električnog polja po agaroznom gelu. Fosfatna okosnica molekule DNK negativno je nabijena pa će fragmenti DNK u električnom polju putovati prema pozitivnoj elektrodi (anodi). Elektroforeza omogućuje razdvajanje DNK molekule na osnovi njene veličine i konformacije, pri čemu manji fragmenti kroz gel putuju

brže. Prijeđena udaljenost obrnuto je proporcionalna logaritmu molekularne težine DNK. Nakon provedene elektroforeze, u svrhu vizualiziranja molekula DNK u gelu koriste se fluorescentne boje koje se specifično vežu na nukleinske kiseline, a najčešće je to etidij bromid (Lee i sur., 2012).

U provedbi horizontalne elektroforeze u agaroznom gelu korišten je 1,5%-tni agarozni gel dobiven otapanjem 1,5 g agaroze u 100 ml TAE pufera u Erlenmeyerovoj tikvici. Agaroz se u puferu zagrijavala u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje, a potom se ohlađena na 65 °C ulijevala u prethodno očišćenu kadnicu za elektroforezu. U gel se postavio češljic kako bi se stvorile jažice u koje se nanosi uzorak. Oko 30 minuta bilo je potrebno da se agarozna polimerizira, nakon čega se uklonio češljic (Lee i sur., 2012). Uzorci za elektroforezu sadržavali su 3 μL otopine plazmida u TAE puferu, 1 μL 3%-tnog H_2O_2 , različite koncentracije irinotekana i THC-a (u koncentracijama IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te njihovim kombinacijama IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) te odgovarajući volumen TAE pufera do konačnog volumena uzorka 30 μL . Svi uzorci izloženi su djelovanju UV zračenja u trajanju od 15 minuta. Negativna kontrola sadržavala je 3 μL otopine plazmida i 27 μL TAE pufera, druga kontrola sadržavala je 3 μL otopine plazmida, 1 μL H_2O_2 i 26 μL TAE pufera, treća kontrola sadržavala je 3 μL otopine plazmida i 27 μL TAE pufera te je bila podvrgnuta UV zračenju (15 min), a posljednja, pozitivna kontrola, sadržavala je 3 μL otopine plazmida, 1 μL H_2O_2 i 26 μL TAE pufera te je također bila podvrgnuta UV zračenju (15 minuta). U pripremljene uzorke je zatim dodano 3 μL obojenog pufera (engl. *loading buffer*) koji sadrži bromtimol plavo radi praćenje napretka elektroforeze migracijom boje te glicerol koji povećava viskoznost uzorka čime omogućuje da uzorak tone u gel. Pripremljeni uzorci nanosili su se u jažice gela, nakon čega je dodan TAE pufer tako da prekrije površinu gela. Elektroforeza se provodila pri jakosti električne struje od 150 mA kroz 60 minuta. Nakon provedene elektroforeze, slijedilo je bojanje gela otopinom etidij bromida u koncentraciji 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 15-ak minuta. Agarozni je gel osvijetljen UV svjetlom, a za trajni zapis rezultata, osvijetljeni se gel fotografirao te su se rezultati pohranili u obliku trajnog zapisa jpg formata.

3.2.5.2. Određivanje oštećenja DNK komet testom izazvanih različitim koncentracijama irinotekana i THC-a na staničnim linijama HepG2 i Caco-2

Komet test (engl. *single cell gel electrophoresis ili comet assay, SCGE*) jednostavna je, brza i osjetljiva metoda za analizu i mjerenje razine oštećenja i popravka molekule DNK na razini individualne stanice. Metoda je dobila naziv komet jer DNK pod mikroskopom nalikuje na komet – intaktna DNK čini glavu, a fragmenti DNK čine rep kometa. Ova metoda često se koristi u *in vitro* istraživanjima u kojima se želi procijeniti genotoksični potencijal nekog prirodnog spoja (Salopek-Sondi i sur., 2010).

Princip metode je horizontalna elektroforeza individualnih stanica u gelu agaroze. Stanice se prethodno liziraju pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamintetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata kako bi se uklonili stanični proteini (histoni) te se DNK molekuli omogućilo odmatanje i oslobađanje u stanici. Nastali jednolančani i dvolančani lomovi DNA uzrokuju nastajanje malih fragmenata DNK različitih duljina. Kraći fragmenti brže putuju kroz gel te zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. DNK se izlaže djelovanju električnog polja (elektroforezi), a zatim oboji fluorescentnim bojama. DNK i obrasci putovanja njenih fragmenata nakon bojanja pod mikroskopom su vidljivi kao kometi (Collins i sur., 2008).

Tretman staničnih linija HepG2 i Caco-2 različitim otopinama irinotekana i THC-a proveden je prema protokolu opisanom u podpoglavlju 3.2.4.1. Na brušena je predmetna stakalca zatim nanoseno i razmazano 300 μL otopine 1,5%-tne agaroze normalne točke tališta (engl. *normal melting point*, NMP) dobivene kuhanjem u PBS puferu. Na polimerizirani sloj NMP agaroze nanosen je sloj koji sadrži 2 μL resuspendiranih stanica i 100 μL 0,5%-tne agaroze niske točke tališta (engl. *low melting point*, LMP) temperirane na 37 °C. Nakon polimerizacije LMP agaroze sa resuspendiranim stanicama nanosen je još jedan sloj od 100 μL LMP agaroze. Kad je zadnji nanoseni sloj LMP agaroze polimerizirao, provela se liza stanica u ohlađenom puferu za lizu stanica preko noći. Potom su stakalca prenesena u kadicu za elektroforezu koja je napunjena alkalnim puferom za elektroforezu. Elektroforeza se provodila pri naponu od 25 V i jakosti struje od 300 mA u trajanju od 10 minuta. Nakon provedene elektroforeze, stakalca su se u razmaku od 5 minuta 3 puta ispirala Tris-HCl puferom (pH = 7,5) s ciljem neutralizacije. Ovako pripremljeni mikrogelovi prije analize su obojani etidij bromidom (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) u trajanju od 10 minuta, nakon čega su kratko isprani Tris-HCl puferom. Zbog stabilizacije boje prije analize preparati su se držali na hladnom. Mjerenje se izvodilo pomoću

epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom podešenim na 515-560 nm, a za analizu slike koristio se računalni program *Comet Assay II*. Na svakom preparatu izmjereno je po 50 kometa. Za potrebe ovog istraživanja kao pokazatelji razine oštećenja DNK koristili su se parametri dužine i intenziteta repa te repni moment.

3.2.6. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani grafički kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije. Za obradu rezultata korišten je statistički program JASP 0.14.0 i Classical ANOVA statistička analiza sa Scheffé-ovim i Tukey-evim *post hoc* testom usporedbe uz granicu statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Citotoksični, proliferacijski, prooksidacijski, protektivni i genotoksični učinci otopina različitih koncentracija irinotekana i THC-a ispitani su na kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2 i kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2. Citotoksičnost otopina različitih koncentracija irinotekana i THC-a određena je Neutral red i klonogenim testom, prooksidacijski učinak metodom koja se temelji na reakciji oksidiranih proteina s DNPH te TBARS metodom, ispitivanje protektivnog učinka provedeno je tretmanom phiX174 RF1 DNA plazmida, a genotoksični je učinak određen komet testom u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Raspon koncentracija irinotekana odabran je s obzirom na preporučenu monoterapijsku dozu primjenjenu kod ljudi, koncentraciju određenu kao LD₅₀ kod štakora kojima je irinotekan apliciran intravenozno te maksimalnu dozu tolerancije u štakora, dok su koncentracije THC-a korištene u ovom istraživanju odabrane na temelju prethodno provedenog istraživanja kojim su utvrđene netoksične, odnosno subtoksične koncentracije THC-a (Stoček, 2019). Zbog složenog metaboličkog puta irinotekana i THC-a izabran je širi raspon vremena izloženosti stanica u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati, bez i s oporavkom. Naime, poluživoti njihovih metabolita relativno su dugi (Smith-Kielland i sur., 1999; Pommier, 2009), a produljenje tretmana stanica, kao i povećanje koncentracija ispitivanih spojeva, svakako utječe na učinke koje će takvi spojevi ispoljiti.

4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG I PROLIFERACIJSKOG UČINKA IRINOTEKANA I THC-a NA STANIČNIM LINIJAMA HEPG2 i CACO-2

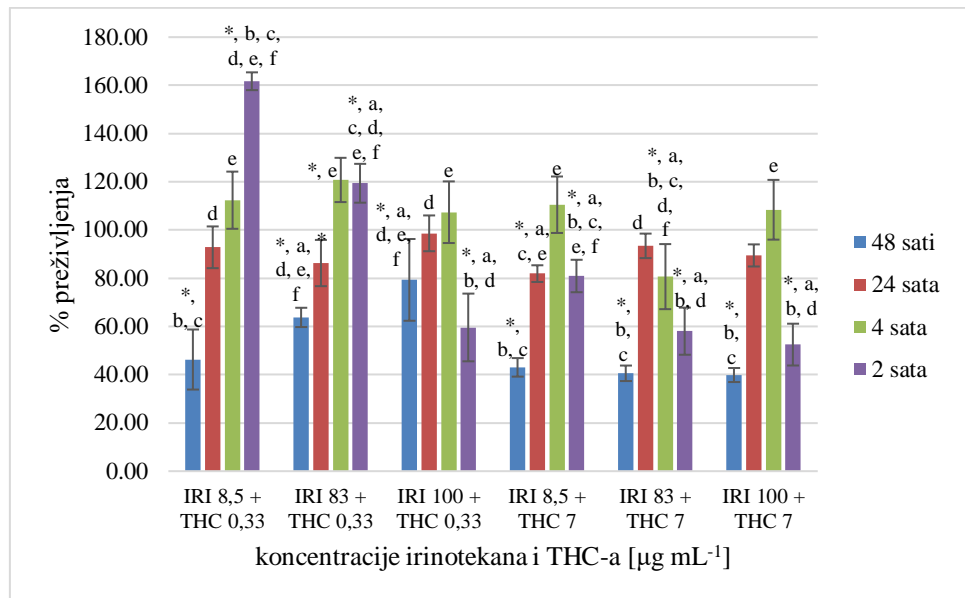
4.1.1. Određivanje citotoksičnog učinka Neutral red testom

Ispitivanje citotoksičnog učinka otopina irinotekana i THC-a u koncentracijskom rasponu irinotekana od 8,5 µg mL⁻¹ do 100 µg mL⁻¹ te THC-a od 0,33 µg mL⁻¹ do 7 µg mL⁻¹ provedeno je Neutral red testom, opisanim u podpoglavlju 3.2.3.1., na staničnim linijama HepG2 i Caco-2. Citotoksični učinak otopina irinotekana i THC-a praćen je u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati, bez i s oporavkom, nakon čega je određeno njihovo preživljenje u odnosu na negativnu kontrolu (medij za uzgoj stanica).

Rezultati su prikazani grafički u obliku ovisnosti preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izračunata iz vrijednosti apsorbancije kao postotak kontrole) o korištenim koncentracijama irinotekana i THC-a.

HepG2

Na slikama 6 i 7 prikazani su rezultati citotoksičnog učinka otopina različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnu liniju HepG2 nakon 2, 4, 24 i 48 sati inkubacije bez i s oporavkom (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama i naznačenim statistički značajnim razlikama).



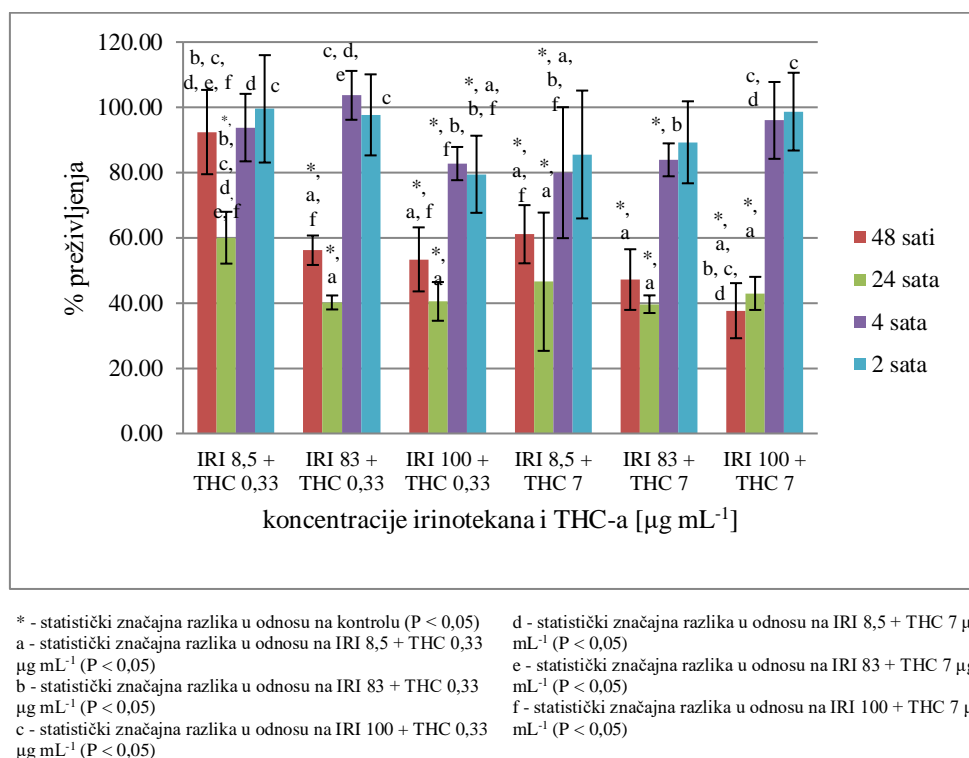
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)
b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)
c - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

d - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)
e - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)
f - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

Slika 6. Preživljenje stanične linije HepG2 nakon 2, 4, 24 i 48 sati bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana i THC-a

Na grafičkom prikazu slike 6 vidljivo je da najveći citotoksičan učinak na staničnu liniju HepG2 pokazuje duljina tretmana u trajanju od 48 sati bez oporavka kod svih ispitivanih koncentracija irinotekana i THC-a. Povećanje koncentracije irinotekana, uz konstantne vrijednosti koncentracije THC-a od 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, kod tretmana u trajanju od 2 sata uzrokuje statistički značajno smanjenje preživljenja, dok je kod tretmana u trajanju od 48 sati, uspoređujući najmanje koncentracije IRI 8,5 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ s koncentracijama IRI 83 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI 100 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, zabilježeno statistički značajno povećanje preživljenja. Iz toga se može zaključiti da THC u koncentraciji od 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kod tretmana u trajanju od 48 sata smanjuje citotoksičan učinak irinotekana u višim koncentracijama (83 i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Koncentracija irinotekana i THC-a koja izaziva značajan pad preživljenja stanične linije HepG2 bez oporavka u odnosu na kontrolu nakon gotovo svih vremena izloženosti stanica irinotekanu i THC-u (osim 4 sata) je IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Kod kratkog vremena izlaganja stanica (2 i/ili 4 sata) vidljiva je proliferacija stanica. THC se nakon unosa počinje vrlo brzo metabolizirati, a maksimalne koncentracije THC-a postižu se unutar desetak minuta nakon primjene inhalacijom. U usporedbi s inhalacijom, apsorpcija THC-a nakon oralne primjene je sporija te rezultira maksimalnom koncentracijom THC-a četiri do šest sati nakon primjene (Huestis, 2007). Stoga ne čudi da dobivene vrijednosti već kod tretmana u trajanja od 2 sata za koncentracije IRI 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuju značajan pad preživljenja u odnosu na kontrolu. No, daljnjim produljenjem tretmana u trajanju od 4 sata stanice se kreću obnavljati i ponovno proliferirati. Taj se proliferacijski učinak za HepG2 staničnu liniju nakon 24 sata tretmana bez oporavka gubi, za razliku od citotoksičnog učinka koji je vidljiv za sve ispitivane koncentracije.



Slika 7. Preživljenje stanične linije HepG2 nakon 2, 4, 24 i 48 sati s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana i THC-a

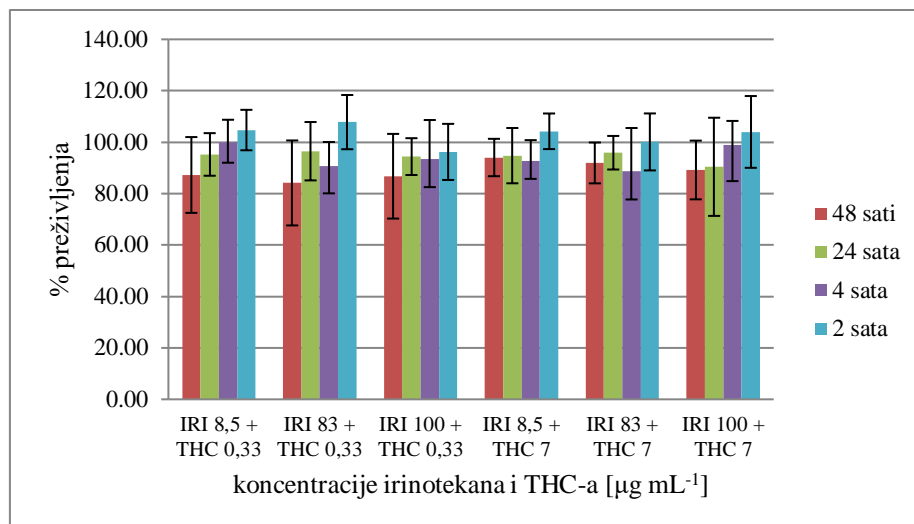
Iz slike 7 vidljivo je da preživljenje stanične linije HepG2 s oporavkom naglo pada kod tretmana u trajanju od 24 sata za sve ispitivane koncentracije. Nakon 24 sata statistički

značajno smanjenje preživljenja bilježe sve ispitivane koncentracije u odnosu na kontrolu. Također, zamijećen je statistički značajan pad preživljenja uspoređujući svaku ispitivanu koncentraciju s najmanjom (IRI 8,5 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$). U preostalim je koncentracijskim rasponima (IRI 83 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 100 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IRI 83 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i IRI 100 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) citotoksični učinak irinotekana i THC-a podjednak. Koncentracija koja već kod najkraćeg vremena izlaganja stanica djeluje citotoksično te za koju se može zaključiti da ima citotoksičan učinak na staničnu liniju HepG2 s oporavkom je IRI 100 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da su stanice jetre u ispitivanim tretmanima pokazale slabiju osjetljivost na toksični učinak irinotekana i THC-a pri kraćim vremenima trajanja od 2 i 4 sata, dok se produljenom izloženošću nakon tretmana u trajanju od 24 sata gubi proliferacijski, a pokazuje citotoksični učinak. Koncentracija irinotekana i THC-a koja izaziva značajan pad preživljenja stanične linije HepG2 bez oporavka i time pokazuje citotoksičan učinak stanica je koncentracija IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Taj podatak zabrinjava s obzirom da je koncentracija irinotekana 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ terapijska doza, a koncentracija THC-a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ je utvrđena kao koncentracija koju sadrže razni ilegalni pripravci bogati THC-om, kojima često pribjegavaju onkološki bolesnici u nadi da će im upravo takvi pripravci pomoći u liječenju (Lucić Vrdoljak i sur., 2018). Mnoga su *in vitro* istraživanja potvrdila da kanabinoidi inhibiraju proliferaciju stanica raka te potiču apoptozu. Cerretani i suradnici u svom su istraživanju dokazali citotoksičan učinak THC-a na staničnu liniju HT-29 kolorektalnog adenokarcinoma nakon tretmana u trajanju od 24 sata pri IC50 vrijednosti od $30.0 \pm 1.01 \mu\text{M}$, za koju se također dokazalo da uzrokuje značajnu inhibiciju proliferacije nakon 24 sata (Cerretani i sur., 2020).

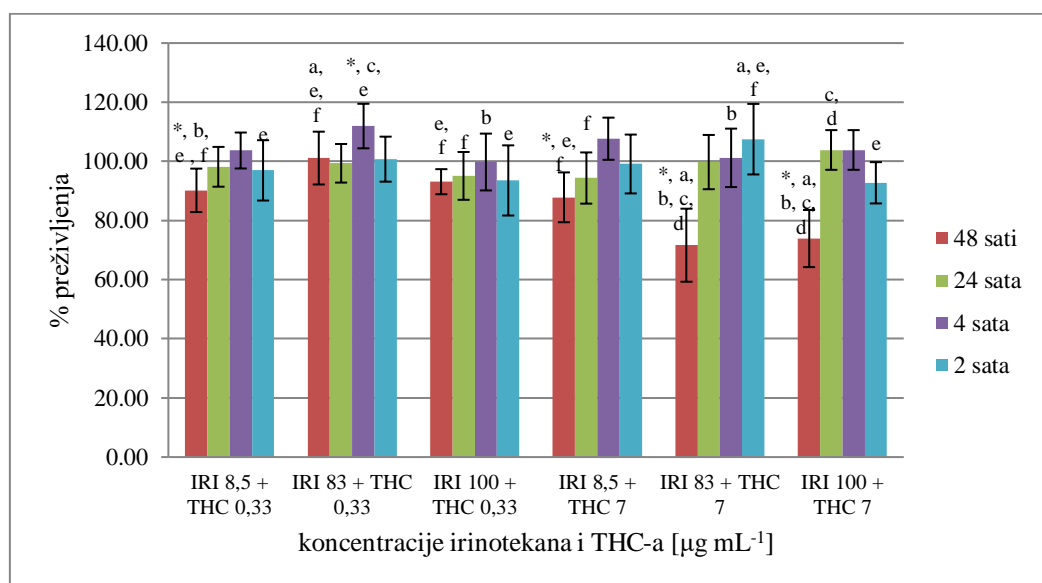
Caco-2

Na slikama 8 i 9 prikazani su rezultati citotoksičnog učinka otopina različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnu liniju Caco-2 nakon 2, 4, 24 i 48 sati inkubacije bez i s oporavkom (srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama).



Slika 8. Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon 2, 4, 24 i 48 sati bez oporavka s različitim koncentracijama irinotekana i THC-a

Iz grafičkog prikaza slike 8 vidljivo je da niti jedna od ispitivanih koncentracija irinotekana i THC-a ne pokazuje citotoksični učinak nakon tretmana bez oporavka u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati. Usporedi li se stanična linija Caco-2 sa staničnom linijom HepG2 stanica, može se zaključiti da su Caco-2 stanice slabije osjetljive na toksičan učinak ovih spojeva.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
 a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 c - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)

d - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 e - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 f - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)

Slika 9. Preživljenje stanične linije Caco-2 nakon 2, 4, 24 i 48 sati s oporavkom s različitim koncentracijama irinotekana i THC-a

Iz grafičkog prikaza slike 9 vidljivo je da je stanična linija Caco-2 u tretmanu s oporavkom i dalje slabo osjetljiva na toksičan učinak irinotekana i THC-a. Statistički značajno citotoksično djelovanje u odnosu na kontrolu zabilježeno je tek u vremenu izloženosti stanica od 48 sati pri koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$, IRI $83 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$, IRI $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Sarafian i suradnici u svom su istraživanju dokazali da THC u koncentraciji manjoj od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ne pokazuje citotoksičan učinak na staničnu liniju A549 adenokarcinoma pluća (Sarafian i sur., 2002). Pojedinačni tretman otopinama THC-a u koncentraciji od $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ također nije pokazao značajan citotoksičan učinak na staničnu liniju Caco-2 (Stoček, 2019), dok su već nakon kraćeg vremena inkubacije niže koncentracije irinotekana ($4,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) pokazale toksično djelovanje na Caco-2 stanice (Joukhadar, 2018). Iz toga se može zaključiti da kodjelovanje THC-a na irinotekan na staničnu liniju Caco-2 smanjuje citotoksični učinak irinotekana. Na leukemijskim staničnim linijama CEM, HEL-92 i HL60 primjena manjih, subtoksičnih doza THC-a nije povećala citotoksične učinke kemoterapeutika cisplatine (Powles i sur., 2005). Prester i suradnici u svom su istraživanju dokazali da se klinički učinci irinotekana mogu modulirati pomoću THC-a kod štakora. Najmanji broj leukocita zabilježen je nakon trećeg dana kombiniranog tretmana s irinotekanom (100 mg kg^{-1} tjelesne mase) i THC-om (7 mg kg^{-1} tjelesne mase), a hepatotoksičnost irinotekana bila je ublažena u prisutnosti THC-a (Prester i sur., 2018). Nasuprot tome, više značajki ide u prilog potencijalno štetnim interakcijama irinotekana i THC-a: metabolizam prvog prolaska kroz jetru, enterohepatična recirkulacija oba spoja koja dovodi do produljenog trajanja njihovih farmakoloških učinaka, glukuronidacija posredovana uridin difosfat glukuronoziltransferazom, inhibicija butirilkolinesteraze od strane THC-a, što može naštetiti pretvorbi irinotekana u aktivni metabolit SN-38, uzajamni učinci na mitohondrijsku disfunkciju i indukciju oksidacijskog stresa, pojačavanje hepatotoksičnosti i genotoksičnosti (Kopjar i sur., 2020). U tumačenju rezultata svakako valja uzeti u obzir razlike između *in vivo* i *in vitro* testova.

Rezultati dobiveni Neutral red testom upućuju na to da je stanična linija Caco-2 otpornija prema toksičnom djelovanju irinotekana i THC-a od stanične linije HepG2, što se može objasniti time što je metabolizam THC-a i irinotekana vezan upravo za jetru. U jetri se aktivni metabolit irinotekana SN-38 inaktivira pretvorbom u SN-38G, čime je također spriječen daljnji citotoksičan učinak na stanice (Takasuna i sur., 1996). Stanična linija HepG2 pokazuje povećanje citotoksičnog učinka irinotekana i THC-a produljenom izloženosti nakon tretmana u trajanju od 24 i 48 sati, bez i s oporavkom. Koncentracija irinotekana i THC-a koja izaziva

značajan pad preživljenja stanične linije HepG2 bez oporavka je IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok ta koncentracija kod tretmana s oporavkom iznosi IRI 100 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

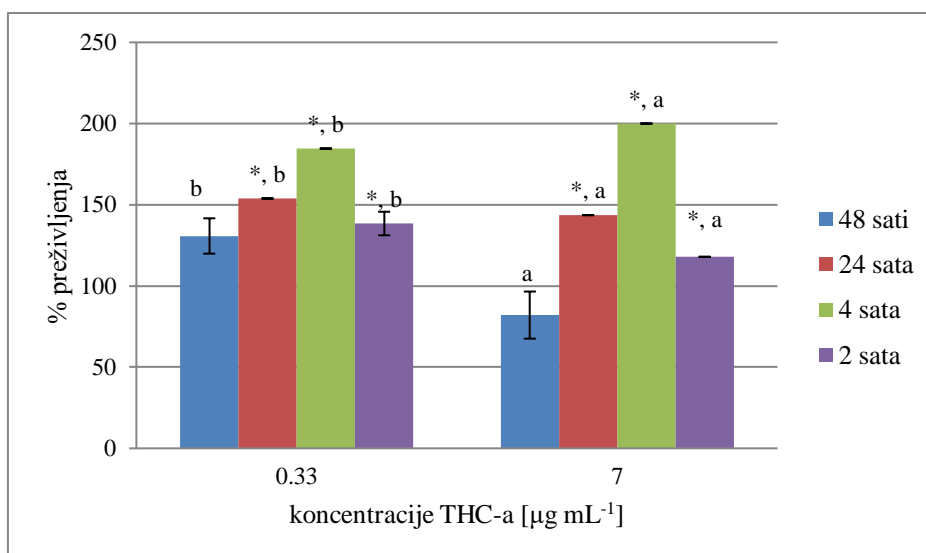
4.1.2. Određivanje citotoksičnog i proliferacijskog učinka klonogenim testom

Ispitivanje citotoksičnog i proliferacijskog učinka otopina irinotekana i THC-a u koncentracijskom rasponu irinotekana od 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te THC-a od 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ provedeno je klonogenim testom, opisanim u podpoglavlju 3.2.3.2., na staničnim linijama HepG2 i Caco-2. Nakon tretmana u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati, preživjele stanice koje su zadržale svojstvo proliferacije počele su stvarati kolonije (skup od najmanje 50 stanica) tijekom 7 dana rasta u mediju. Kao negativna kontrola koristio se medij za uzgoj stanica.

Rezultati su prikazani grafički u obliku ovisnosti preživljenja stanica (srednje vrijednosti broja poraslih kolonija u uzorku u odnosu na kontrolu) o korištenim koncentracijama irinotekana i THC-a.

HepG2

Na slikama 10, 11 i 12 prikazani su rezultati citotoksičnog i proliferacijskog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnu liniju HepG2.

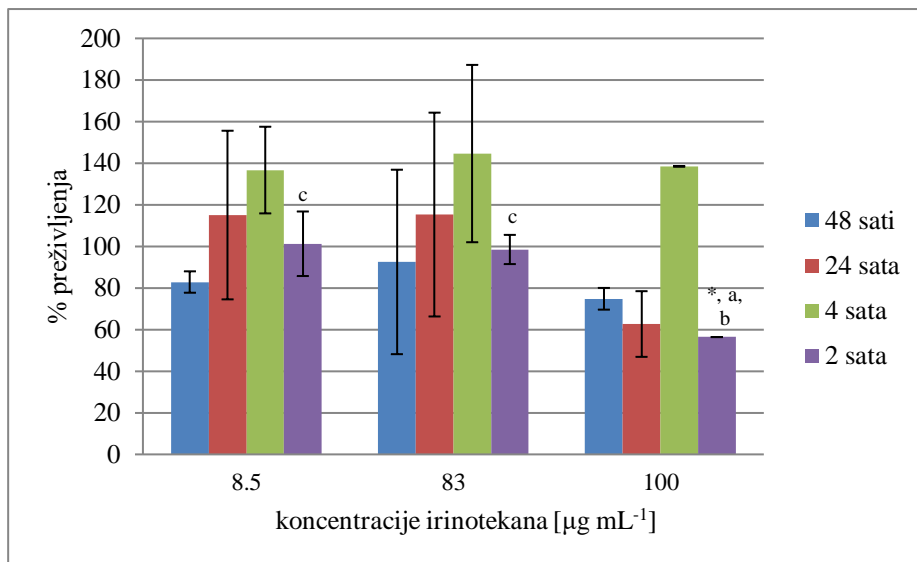


* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)

a - statistički značajna razlika u odnosu na THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

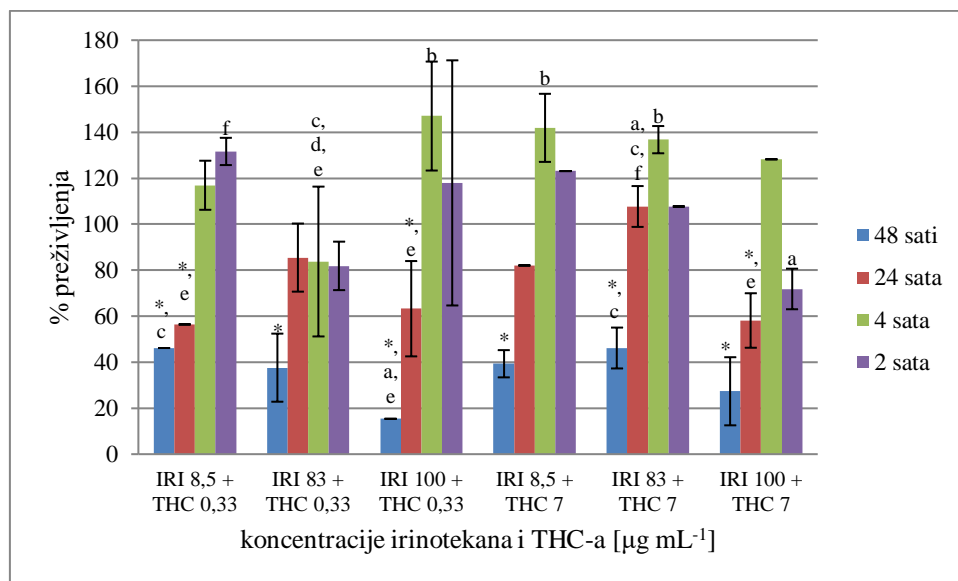
b - statistički značajna razlika u odnosu na THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

Slika 10. Citotoksični i proliferacijski učinak različitih koncentracija THC-a na staničnu liniju HepG2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
 a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 c - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)

Slika 11. Citotoksični i proliferacijski učinak različitih koncentracija irinotekana na staničnu liniju HepG2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
 a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 c - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 d - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 e - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 f - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)

Slika 12. Citotoksični i proliferacijski učinak različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnu liniju HepG2

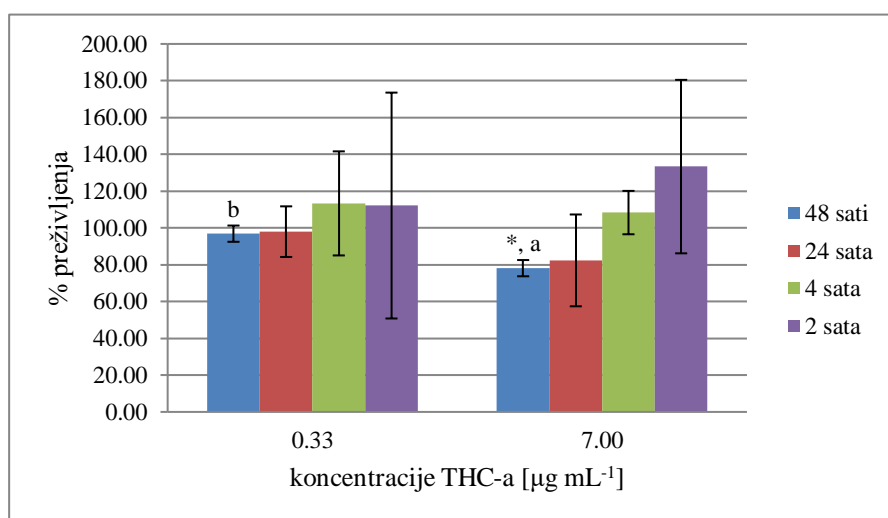
Iz slike 10 vidljivo je da otopina THC-a u koncentracijama od 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ne pokazuje citotoksičan učinak na staničnu liniju HepG2. Štoviše, koncentracija 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuje kod svih duljina tretmana proliferacijski učinak. Slično vrijedi za koncentraciju 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, kod koje se blagi pad preživljenja bilježi tek kod tretmana u trajanju od 48 sati. Značajniji citotoksičan učinak ovih koncentracija THC-a nije dokazan ni Neutral red testom (Stoček, 2019). Na staničnoj liniji A549 adenokarcinoma pluća citotoksično je djelovanje THC-a nakon 24 sata zabilježeno pri koncentracijama većim od 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sarafian i sur., 2003).

Iz slike 11 vidljivo je da samo najviša ispitana koncentracija irinotekana (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) djeluje citotoksično na HepG2 stanice nakon 2 sata tretmana. Uočava se proliferacija stanica nakon 4 sata kod svih ispitivanih koncentracija. Stanice jetre su i u ranije provedenom istraživanju pokazale relativno slabu osjetljivost na toksičan učinak irinotekana (Joukhadar, 2018).

Iz slike 12 vidljiv je proliferacijski učinak irinotekana i THC-a nakon kraćih vremena tretmana (2 i 4 sata) pri svim ispitivanim koncentracijama osim koncentracije IRI 83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon 24 tretmana HepG2 stanica nema indukcije proliferacije. U usporedbi s Neutral red testom kojim se nakon 24 sata dokazalo statistički značajno smanjenje preživljenja za sve ispitivane koncentracije u odnosu na kontrolu, klonogenim je testom citotoksičan učinak vidljiv nakon 24 sata, ali statistički značajan za sve ispitivane koncentracije u odnosu na kontrolu nakon 48 sati.

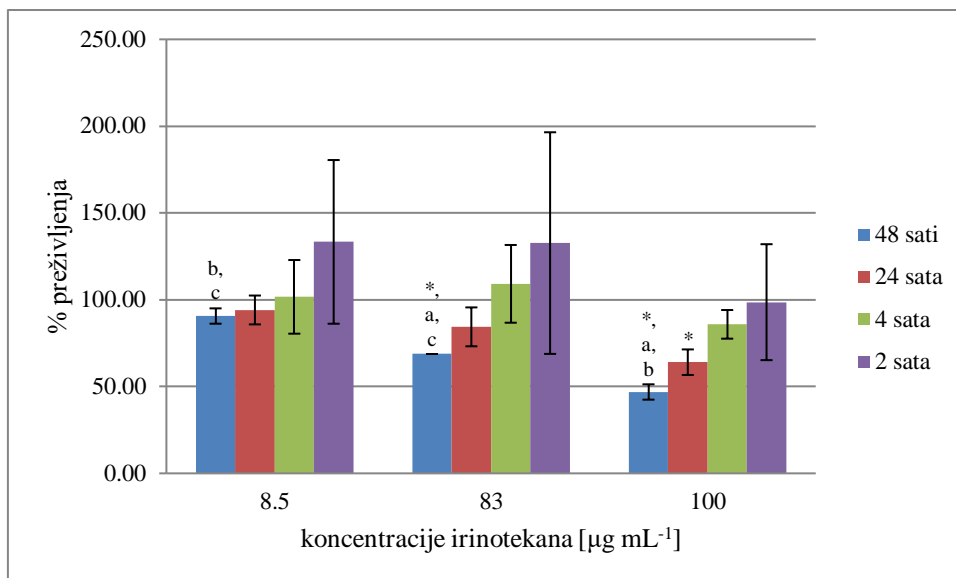
Caco-2

Na slikama 13, 14 i 15 prikazani su rezultati citotoksičnog i proliferacijskog učinka različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnu liniju Caco-2.



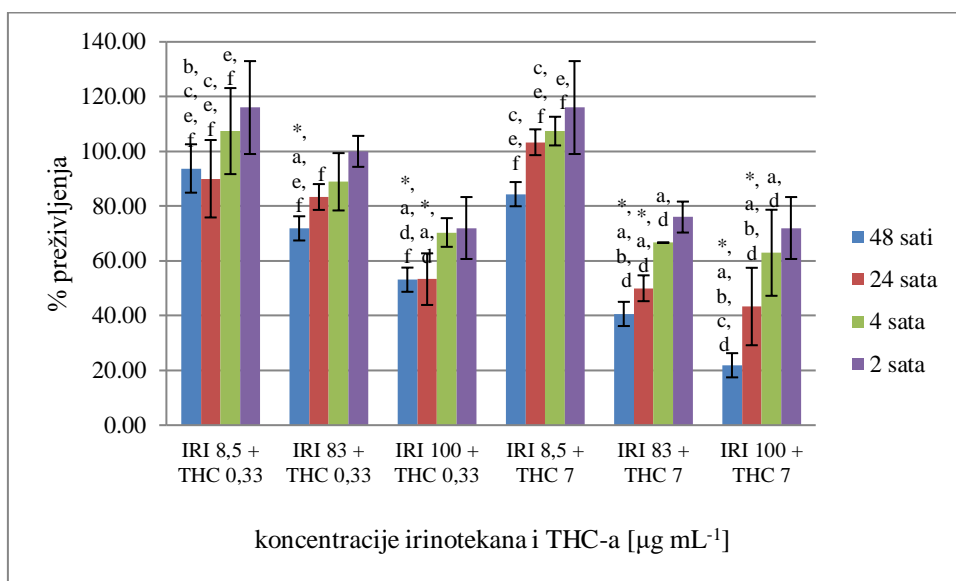
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
a - statistički značajna razlika u odnosu na THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)
b - statistički značajna razlika u odnosu na THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

Slika 13. Citotoksični i proliferacijski učinak različitih koncentracija THC-a na staničnu liniju Caco-2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
 a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 c - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)

Slika 14. Citotoksični i proliferacijski učinak različitih koncentracija irinotekana na staničnu liniju Caco-2



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
 a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 c - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 0,33 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 d - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 e - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 83 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)
 f - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 100 + THC 7 µg mL⁻¹ ($P < 0,05$)

Slika 15. Citotoksični i proliferacijski učinak različitih koncentracija irinotekana i THC-a na staničnu liniju Caco-2

Dobiveni rezultati pokazuju da se produljenjem vremena tretmana smanjuje preživljenje Caco-2 stanične linije kod pojedinačnih tretmana (slike 13 i 14), kao i kod kombiniranog

tretmana s irinotekanom i THC-om (slika 15). Kao što je zaključeno na temelju rezultata dobivenih Neutral red testom, stanična linija Caco-2 i u pojedinačnim tretmanima pokazuje slabu osjetljivost na toksičan učinak irinotekana i THC-a. Statistički značajno citotoksično djelovanje u odnosu na kontrolu zabilježeno je tek u vremenu izloženosti stanica od 48 sati pri koncentraciji THC-a $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ te kod viših koncentracija irinotekana ($83 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Iz slike 15 vidljivo je proliferacijsko djelovanje irinotekana i THC-a pri najnižoj koncentraciji irinotekana $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ s obje ispitane koncentracije THC-a ($0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $7 \mu\text{g mL}^{-1}$) kod kraćih vremena trajanja tretmana (2 i 4 sata), dok se citotoksičan učinak irinotekana i THC-a povećava produljenjem vremena (nakon 24 i 48 sati) i povećanjem koncentracija irinotekana i THC-a.

Iz rezultata dobivenih Neutral red i klonogenim testom može se zaključiti da stanična linija HepG2 pokazuje slabiju osjetljivost na toksičan učinak irinotekana i THC-a pri kraćim vremenima trajanja od 2 i 4 sata, dok se produljenom izloženosti nakon tretmana u trajanju od 24 sata gubi proliferacijski, a pokazuje citotoksični učinak. Stanična se linija Caco-2 pokazala otpornijom prema toksičnom djelovanju irinotekana i THC-a. Statistički značajno citotoksično djelovanje u odnosu na kontrolu zabilježeno je tek u vremenu izloženosti stanica od 48 sati Neutral red testom, dok je klonogenim testom pri povišenim koncentracijama citotoksičan učinak irinotekana i THC-a na Caco-2 staničnu liniju zabilježen nakon 24 sata. Za najmanju se ispitivanu koncentraciju nije dokazao citotoksičan učinak, dok se povećanjem koncentracija i produljenjem vremena tretmana uočava smanjenje preživljenja kod obje stanične linije. Veća otpornost Caco-2 stanica na toksično djelovanje irinotekana i THC-a može se objasniti time što je glavni metabolički put oba spoja vezan za jetru, kao i sposobnošću stanica da zadrži brojne enzimske sustave potrebne za biotransformaciju ksenobiotika.

4.2. ODREĐIVANJE PROOKSIDACIJSKOG I PROTEKTIVNOG UČINKA IRINOTEKANA I THC-a NA STANIČNIM LINIJAMA HEPG2 i CACO-2

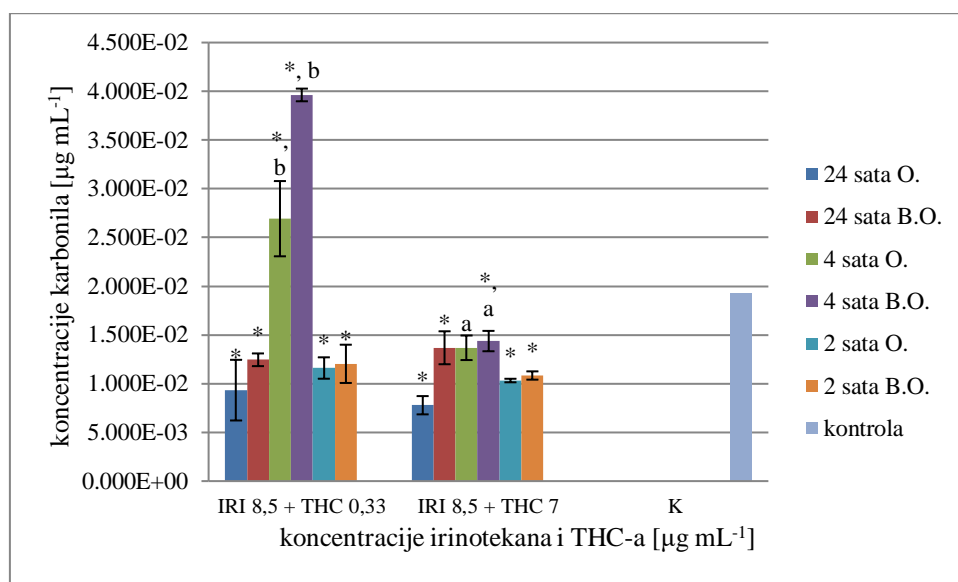
4.2.1. Određivanje stupnja oksidacije proteina na staničnim linijama HepG2 i Caco-2

Ispitivanje prooksidacijskog i protektivnog učinka irinotekana i THC-a različitih koncentracija (IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$) provedeno je na

staničnim linijama HepG2 i Caco-2 metodom koja se temelji na reakciji oksidiranih proteina s DNPH, opisanom u podpoglavlju 3.2.4.3. S obzirom na rezultate preživljenja stanica, za nastavak ispitivanja uzete su koncentracije koje su imale subtoksični ili netoksični učinak. Prooksidacijski je učinak otopina irinotekana i THC-a ispitivan u vremenu izloženosti stanica od 2, 4 i 24 sata, bez i s oporavkom, nakon čega je određena koncentracija nastalog karbonila. Kao negativna kontrola korišten je medij za uzgoj stanica.

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost koncentracije nastalog karbonila o koncentracijama irinotekana i THC-a.

Stanična proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS-a) i smanjeno antioksidacijsko djelovanje smatraju su biološkim markerima oksidacijskog stresa koji mogu dovesti do ozljeda stanica, oštećenja DNK i zloćudnih transformacija (Sarafian i sur., 1999).



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

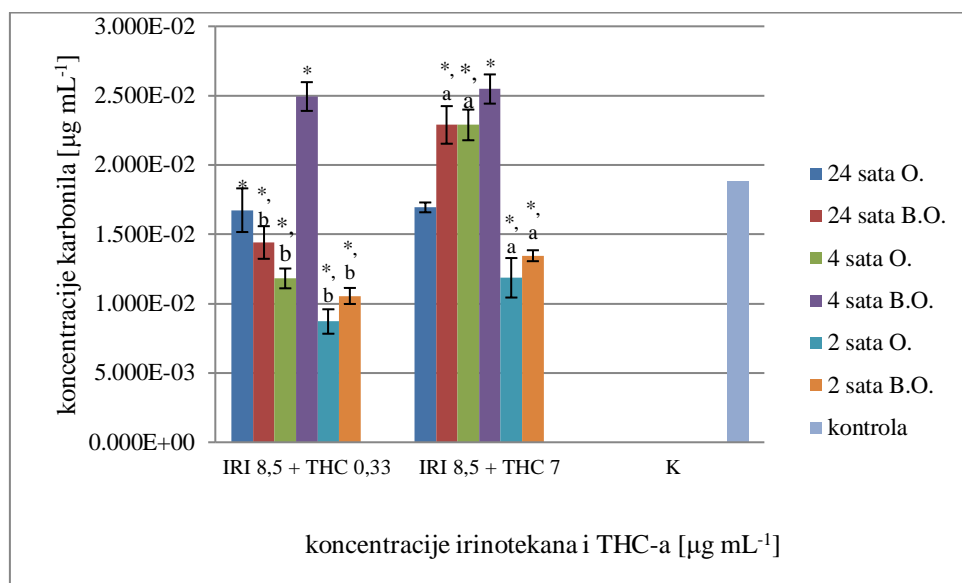
a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

Slika 16. Karbonilacija proteina uzrokovana različitim koncentracijama irinotekana i THC-a na staničnu liniju HepG2

Na slici 16 vidljivo je da statistički značajnu promjenu u oksidaciji proteina u odnosu na kontrolu pokazuju otopine irinotekana i THC-a u obje ispitivane koncentracije nakon svih vremena izloženosti stanica u trajanju od 2, 4 i 24 sata. Najveći stupanj karbonilacije proteina izmjeren je nakon 4 sata bez oporavka u stanicama tretiranim otopinom irinotekana i THC-a u koncentraciji IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Otopine irinotekana i THC-a pri toj koncentraciji pokazuju značajno antioksidativno djelovanje u odnosu na kontrolu nakon 2 i 24

sata, bez i s oporavkom, dok je nakon tretmana u trajanju od 4 sata (s i bez oporavka) zamijećeno prooksidacijsko djelovanje u odnosu na kontrolu i drugu ispitivanu koncentraciju. Otopine irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuju statistički značajno nisku koncentraciju nastalog karbonila u odnosu na kontrolu nakon svih vremena izloženosti (bez i s oporavkom), iz čega se može zaključiti da ta koncentracija ima antioksidacijsko djelovanje na staničnu liniju HepG2.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)
b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

Slika 17. Karbonilacija proteina uzrokovana različitim koncentracijama irinotekana i THC-a na staničnu liniju Caco-2

Iz slike 17 vidljivo je da otopine irinotekana i THC-a u koncentracijama 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuju dozni odgovor. Povećanjem koncentracije raste i koncentracija nastalog karbonila. Pritom, značajno prooksidacijsko djelovanje irinotekana i THC-a pokazuju obje koncentracije nakon tretmana u trajanju od 4 sata, bez oporavka. Pri koncentraciji 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ taj se učinak nastavlja i nakon tretmana u trajanju od 4 sata s oporavkom te nakon tretmana od 24 sata bez oporavka. Najmanji postotak oksidacije postignut je tretmanom s otopinom irinotekana i THC-a u koncentraciji IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nakon 2 sata s oporavkom, a iznosi 46,27%.

Lucić Vrdoljak i suradnici u svom su istraživanju na štakorima statistički značajan porast ukupne količine proteina u odnosu na kontrolu zabilježili nakon 7-dnevnog tretmana irinotekanom (100 mg/kg tjelesne mase), dok kombinirani tretman (irinotekan 100

mg/kg tjelesne mase s THC-om 7 mg/kg tjelesne mase) nije doveo do značajnih promjena (Lucić Vrdoljak i sur., 2018). Ti se rezultati mogu objasniti time što se najveći dio ukupnih proteina odnosi na koncentracije albumina i imunoglobulina, a poznato je da se SN-38 uglavnom veže za albumin (Mathijssen i sur., 2001), dok se THC uglavnom veže za lipoproteine, a manje za albumin (Grotenhermen, 2003). *In vitro* istraživanjima dokazano je da izlaganje dimu marihuane rezultira značajnim oksidacijskim stresom te dovodi do apoptoze stanica. Na humanim endotelnim stanicama ECV 304 procijenjen je oksidacijski stres nakon izlaganja dimu iz cigarete koja je sadržavala 0, 1,77 te 3,95% THC-a. Kratka izloženost dimu cigareta s 3,95% potaknula je stvaranje ROS-a za 80% u odnosu na kontrolne razine te snizila razinu unutarstaničnog glutaciona za 81%. Suprotno tome, izlaganje ECV 304 stanica sintetički pročišćenom THC-u (0,5 mg mL⁻¹) nije rezultiralo značajnijom oksidacijom. S obzirom da pročišćeni THC dodan stanicama nije uspio proizvesti značajne promjene ROS-a, vjerojatnije je da su drugi produkti pirolize proizvedeni u prisutnosti kanabinoida, a ne sam THC, odgovorni za uočena oksidacijska oštećenja (Sarafian i sur., 1999).

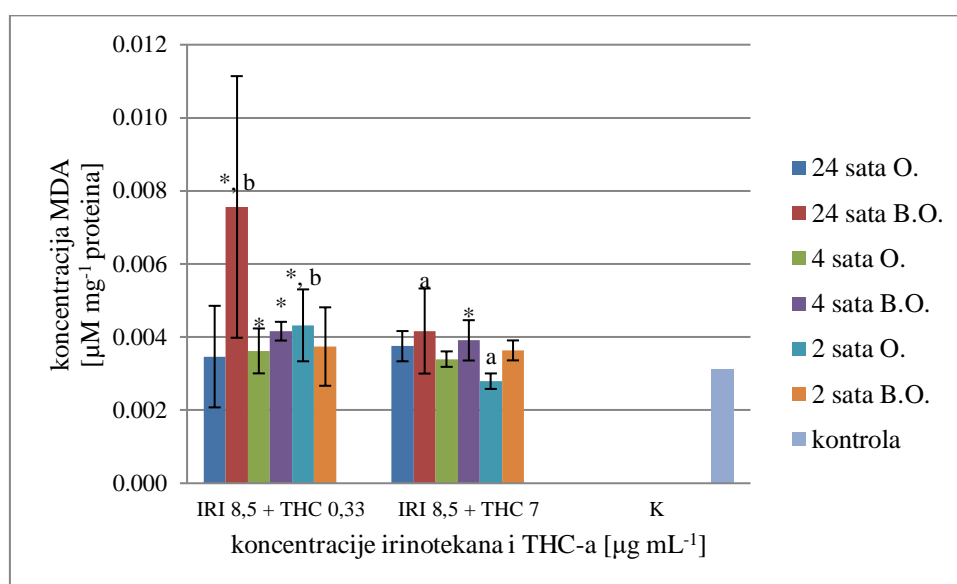
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je na obje stanične linije najveći prooksidacijski učinak irinotekana i THC-a zabilježen nakon tretmana u trajanju od 4 sata. To se može dovesti u vezu s maksimalnom koncentracijom Δ^9 -THC koja se bilježi četiri do šest sati nakon primjene (Huestis, 2007). Netoksične, odnosno subtoksične koncentracije IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0, 33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ne izazivaju prooksidacijski učinak na stanične linije HepG2 i Caco-2 u prva dva sata inkubacije, već suprotno tome bilježe antioksidacijsko djelovanje. Iako se na temelju rezultata o istom zaključku može govoriti nakon tretmana u trajanju od 24 sata na staničnoj liniji HepG2, rezultati citotoksičnosti nakon tretmana od 24 sati pokazali su statistički značajan pad preživljenja ove stanične linije. Stoga se zbog gubitka staničnog integriteta uslijed citotoksičnog djelovanja irinotekana i THC-a u ovom slučaju ne može utvrditi antioksidacijsko djelovanje. Zbog složenog metabolizma irinotekana i THC-a, stanična linija Caco-2 nakon tretmana od 24 sata bez oporavka s ispitivanom većom koncentracijom bilježi i dalje značajno povećanu razinu nastalih karbonila. Rezultati istraživanja indukcije slobodnih radikala na staničnoj liniji Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuju prooksidacijsko djelovanje tek nakon 24 sata (Stoček, 2019), dok je terapijska koncentracija irinotekana (8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pokazala proliferacijsko djelovanje na stanice Caco-2 nakon 4 sata bez i s oporavkom (Joukhadar, 2018).

4.2.2. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije metodom TBARS

Najčešće korištena metoda za mjerenje stupnja lipidne peroksidacije u biološkim uzorcima je metoda određivanja koncentracije malondialdehida (MDA) testom tiobarbiturne kiseline (TBARS). Organski spoj malondialdehid pokazatelj je peroksidacije, a njegova koncentracija govori o oksidacijskom stresu u organizmu (Bujak, 2015).

Određivanje stupnja lipidne peroksidacije provedeno je metodom TBARS, opisanom u podpoglavlju 3.2.4.4. Stanične linije HepG2 i Caco-2 tretirane su otopinama irinotekana i THC-a različitih koncentracija (IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) u vremenu izloženosti stanica od 2, 4 i 24 sata, bez i s oporavkom. Kao negativna kontrola korišten je medij za uzgoj stanica.

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost koncentracije malondialdehida o koncentracijama irinotekana i THC-a.



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

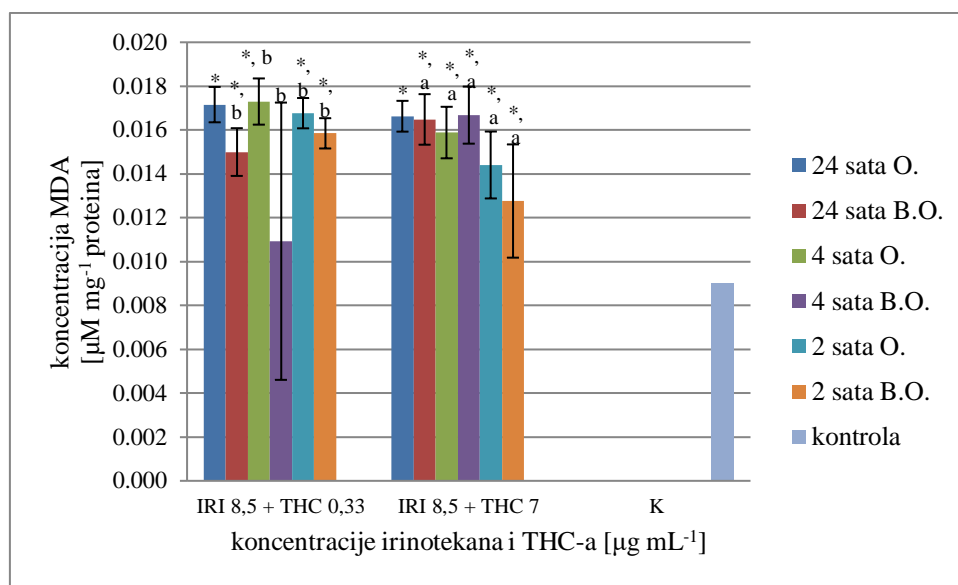
a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

Slika 18. Učinak različitih koncentracija irinotekana i THC-a na lipidnu peroksidaciju u HepG2 stanicama

Iz slike 18 vidljivo je da statistički značajnu promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu pokazuje koncentracija IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nakon tretmana u trajanju od 2 sata s oporavkom, 4 sata bez i s oporavkom te 24 sata bez oporavka. Druga ispitivana koncentracija IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ statistički značajnu

promjenu u indukciji lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu pokazuje samo nakon tretmana u trajanja od 4 sata s oporavkom. Vrijednosti koncentracije malondialdehida nakon tih su tretmana značajno veće od vrijednosti kontrole pa se može zaključiti da otopine irinotekana i THC-a induciraju lipidnu peroksidaciju. Najveća koncentracija malondialdehida izmjerena je nakon tretmana HepG2 stanica otopinom irinotekana i THC-a u koncentraciji IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nakon tretmana u trajanju od 24 sata bez oporavka. Kod niti jednog tretmana nije vidljivo smanjenje stupnja peroksidacije lipida ispitivanim koncentracijama.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
a - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)
b - statistički značajna razlika u odnosu na IRI 8,5 + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0,05$)

Slika 19. Učinak različitih koncentracija irinotekana i THC-a na lipidnu peroksidaciju u Caco-2 stanicama

Iz slike 19 je vidljivo da da obje ispitivane koncentracije (IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) u odnosu na kontrolu pokazuju statistički značajne promjene u indukciji lipidne peroksidacije nakon svih provedenih tretmana, osim koncentracije IRI 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + THC 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nakon tretmana u trajanju od 4 sata bez oporavka. Iz dobivenih povećanih koncentracija nastalog malondialdehida iznad razine kontrole, može se zaključiti da ispitivane otopine irinotekana i THC-a induciraju lipidnu peroksidaciju u stanicama Caco-2.

Rezultati dobiveni istraživanjem Lucić Vrdoljak i suradnika u *in vivo* sustavu na štakorima soja Wistar pokazuju da je nakon trodnevnog kombiniranog tretmana irinotekanom (100 mg/kg tjelesne mase) i THC-om (7 mg/kg tjelesne mase) statistički značajno viša

koncentracija nastalog malondialdehida u usporedbi s vremenski istim tretmanom koji je uključivao samo irinotekan. Uspoređujući s kontrolom, nije zabilježena statistički značajna razlika u indukciji lipidne peroksidacije (Lucić Vrdoljak i sur., 2018). U *in vitro* istraživanju na stanicama HT-29 kolorektalnog adenokarcinoma nakon tretmana u trajanju od 24 sata zabilježeno je da pri IC₅₀ vrijednosti od $30.0 \pm 1.01 \mu\text{M}$ THC ne dovodi do značajne promjene u nastanku malondialdehida, dok je drugi ispitivani fitokanabinoid CBD uzrokovao značajan porast sadržaja malondialdehida u odnosu na netretirane stanice, čime je dokazana prisutnost oksidacijskog oštećenja (Cerretani i sur., 2020). Usporedbom nastalih karboniliranih proteina i indukcije lipidne peroksidacije u staničnoj liniji HepG2, statistički značajno oksidacijsko oštećenja podudara se nakon tretmana u trajanju od 4 sata, bez i s oporavkom, s nižom ispitivanom koncentracijom. Kod stanične linije Caco-2 zamijećena je statistički značajna indukcija lipidne peroksidacije nakon gotovo svih provedenih tretmana, a s obzirom da je značajan porast karboliniranih proteina dokazan nakon tretmana u trajanju od 4 sata bez i s oporavkom te 24 sata bez oporavka, može se utvrditi da se Caco-2 stanična linija pokazala manje otpornom na oksidacijska oštećenja izazvana različitim otopinama irinotekana i THC-a. Tome u prilog ide i veći postatak preživljenja Caco-2 stanične linije dokazan testovima citotoksičnosti, čime je očuvan stanični integritet, za razliku od HepG2 stanične linije kod koje se zbog veće osjetljivosti na citotoksičan učinak irinotekana i THC-a ne može sa sigurnošću utvrditi prooksidacijski i protektivni učinak istraživanih spojeva.

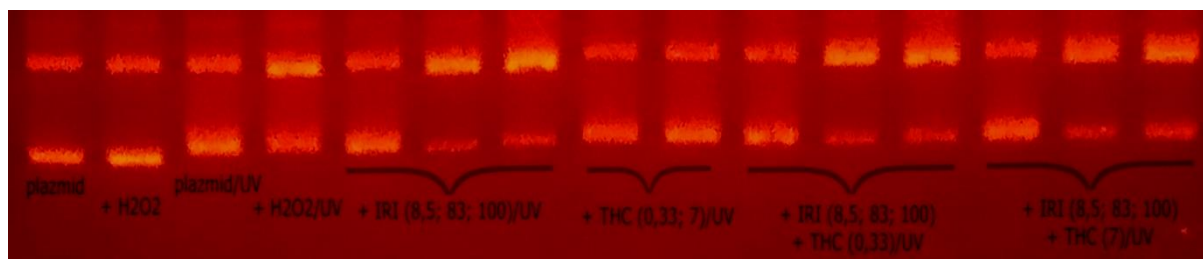
4.3. ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOG I PROTEKTIVNOG UČINKA IRINOTEKANA I THC-a NA MODELNOJ DNK I STANIČNOM GENETIČKOM MATERIJALU

4.3.1. Određivanje oštećenja na plazmidu phiX174 RF1 DNK elektroforezom u agaroznom gelu

U stanjima oksidacijskog stresa dolazi do porasta ROS-a u organizmu koji induciraju oštećenja DNK, proteina i lipida stanične membrane. Oštećenje DNK uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, dok lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji (Erdogan i sur., 2018).

Ispitivanje potencijalno protektivnog učinka različitih otopina irinotekana i THC-a u koncentracijskom rasponu irinotekana od $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ te THC-a od $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ provedeno je na plazmidu phiX174 RF1 DNK. Taj je genetički materijal

bio podvrgnut UV zračenju te djelovanju vodikovog peroksida, a nakon tretmana provedena je elektroforeza u agaroznom gelu. Plazmidna DNK ima tri konformacije: superzavijenu, kružnu te linearnu. Ukoliko dođe do oštećenja DNK, superzavijena se konformacija razmata te putujući gelom ostavlja slabiji signal.



Slika 20. Protektivni učinak različitih otopina irinotekana i THC-a na plazmid phiX174 RF1 DNK

Iz slike 20 je vidljivo da kod prva tri stupca negativnih kontrola (od kojih je prva sadržavala otopinu plazmida i TAE pufera, druga plazmid, TAE pufer i vodikov peroksid, a treća je bila podvrgnuta UV zračenju) jači signalni put daje zavijeni plazmid u odnosu na razmotani. Iz toga se može zaključiti da vodikov peroksid, kao ni samo UV zračenje, ne uzrokuje statistički značajno oštećenje DNK. Do promjene i statistički značajnog oštećenja dolazi kod pozitivne kontrole (stupac 4) koja je sadržavala plazmid, TAE pufer, vodikov peroksid te istodobno bila podvrgnuta UV zračenju. Jači signal razmotanog plazmida, koji putuje sporije, uočljiv je kod pozitivne kontrole u odnosu na signal zavijenog plazmida. Kod uzoraka koji su sadržavali otopine irinotekana različitih koncentracija primijećeno je statistički značajno oštećenje DNK pri višim koncentracijama irinotekana ($83 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), od kojih najviša koncentracija pokazuje i najjači signal razmotanog plazmida u odnosu na pozitivnu kontrolu. To dovodi do zaključka da upravo ta koncentracija pod utjecajem UV zračenja uzrokuje najveće oštećenje DNK. Kod uzoraka s otopinama THC-a prisutan je relativno slab signal razmotanog plazmida u odnosu na zavijeni, iz čega se može zaključiti da sam THC ne uzrokuje značajno oštećenje DNK. Kod uzoraka koji su sadržavali i irinotekan i THC, jači signal razmotanog plazmida u odnosu na zavijeni vidljiv je kod koncentracija IRI $83 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$, IRI $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI $83 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ i IRI $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Iz toga se može zaključiti da otopine irinotekana i THC-a pri navedenim koncentracijama dovode do statistički značajnog oštećenja DNK, s time da se povećanjem koncentracije THC-a smanjuju oštećenja plazmida uzrokovana irinotekanom.

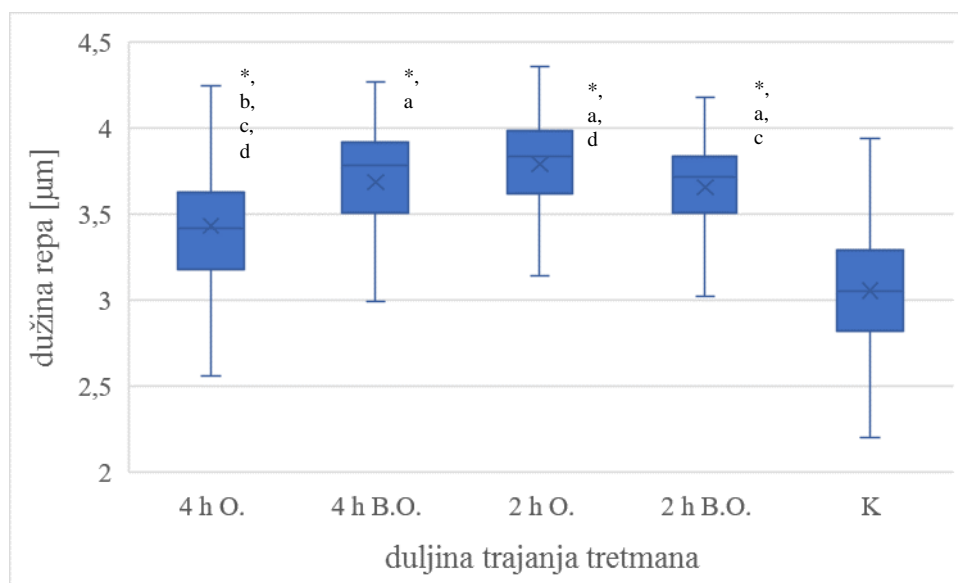
Irinotekan je inhibitor DNK topoizomeraze I koji vrši citotoksični učinak uzrokujući oštećenje DNK. Njegov aktivni oblik SN-38 inducira jednolančane prijelome DNK koji pak posljedično dovode do dvolančanih prijeloma koji se uglavnom ne mogu popraviti te u konačnici pokreću apoptozu stanice (Takeba i sur., 2007). Genotoksičan učinak irinotekana utvrđen je raznim *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima (Wood i sur., 2015), za razliku od THC-a čiji se učinak tek mora ispitati i opravdati. Lucić Vrdoljak i suradnici u svom su istraživanju na štakorima statistički značajno oštećenje DNK zabilježili nakon jednodnevnog, trodnevnog i sedmodnevnog tretmana irinotekanom (100 mg/kg tjelesne mase) u odnosu na kombinirani tretman (irinotekan 100 mg/kg tjelesne mase s THC-om 7 mg/kg tjelesne mase) i pojedinačni tretman THC-om. IRI je inducirao značajno povećane srednje vrijednosti duljine i intenziteta repa u hepatocitima štakora u usporedbi s kontrolnom i THC skupinom. Štakori kojima je primijenjeno kombinirano liječenje imali su značajno niže razine primarnog oštećenja DNA u hepatocitima u usporedbi s onima kojima je dan IRI, međutim, izmjerene vrijednosti i dalje su bile značajno veće nego u kontrolnoj ili THC skupini (Lucić Vrdoljak i sur., 2018). Budući da je genotoksičnost THC-a, kao pojedinačnog spoja, slabo istražena korištenjem klasičnih testova mutagenosti, ne može se sa sigurnošću utvrditi da istodobna primjena THC-a ublažava genotoksičnost irinotekana, na što ukazuju rezultati dobiveni na modelnoj DNK.

4.3.2. Određivanje oštećenja DNK na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 komet testom

Ispitivanje genotoksičnog učinka različitih otopina irinotekana i THC-a pri koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ te IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ provedeno je na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 komet testom opisanim u podpoglavlju 3.2.5.2. u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Iako su ove koncentracije odabrane s obzirom na rezultate preživljenja stanica te su stanice tretirane samo s koncentracijama koje su imale subtoksični ili netoksični učinak u trajanju inkubacije od 2, 4 i 24 sata, bez i s oporavkom, na kraju ispitivanja pokazatelji razine oštećenja DNK bili su vidljivi samo za koncentraciju IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon 2 i 4 sata, bez i s oporavkom. Kriterij pozitivnog odgovora na komet test koristi graničnu vrijednost od 75% preživljenja tretiranih stanica ispitivanim spojevima (Henderson i sur., 1998). S obzirom na dobivene rezultate testova u kojima se ispitivala citotoksičnost irinotekana i THC-a, stanična linija HepG2 bilježi preživljenje manje od 75% nakon vremena u trajanju od 24 sata s oporavkom pri obje ispitivane koncentracije (slika 7). Također, za istu je staničnu liniju utvrđeno da se nakon 24 sata tretmana gubi proliferacijski učinak, a pojačava citotoksičan učinak. Iako se

Caco-2 stanična linija pokazala otpornijom prema toksičnom djelovanju irinotekana i THC-a od stanične linije HepG2, pokazatelji razine oštećenja DNK također nisu vidljivi za veću koncentraciju i vrijeme inkubacije od 24 sata. S obzirom na navedeno, rezultati su prikazani grafički (slika 21 - slika 26) kao ovisnost dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta o duljini trajanja tretmana (2 i 4 sata, bez i s oporavkom) nakon izloženosti stanica koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$. Također, zbog razlika u izgledu i osobitosti pojedinog kometa, čime je došlo do rasipanja dobivenih rezultata, rezultati su radi lakše statističke obrade najprije logaritmirani.

Otkrivanje i kvantificiranje primarnog oštećenja DNK brzo se postiže provedbom komet testa. Promatrani parametri kao što su dužina repa (izražena u μm), intenzitet repa (postotak DNK) te repni moment (umnožak dužine repa i postotka DNK) ukazuju na određena oštećenja genetičkog materijala stanica. Što je duži rep kometa te veći njegov intenzitet, smatra se da je došlo do većih oštećenja DNK. Kao prihvatljiva razina oštećenja smatraju se vrijednosti do 10% DNK u repu kometa (Collins i sur., 2008).



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

a - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata s oporavkom ($P < 0,05$)

b - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

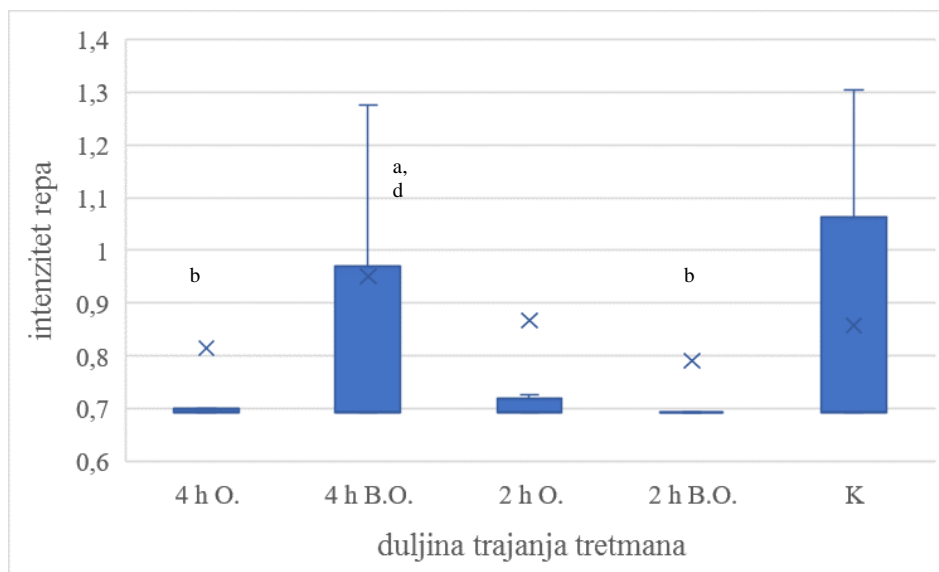
c - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata s oporavkom ($P < 0,05$)

d - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

Slika 21. Dužina repa kometa stanične linije HepG2 nakon 2 i 4 sata tretmana otopinama irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$

Iz slike 21 vidljivo je da otopine irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon svih vremena tretmana izazivaju statistički značajno povećanje

dužine repa kometa u odnosu na kontrolu. Također, uočavaju se značajne razlike između prikazanih vremena tretmana. Tretman od 2 sata s oporavkom bilježi statistički značajno povećanje dužine repa kometa u odnosu na tretman nakon 2 sata bez oporavka, dok sva prikazana vremena statistički značajno povećanje dužine repa kometa pokazuju u odnosu na tretman od 4 sata s oporavkom. Time se može zaključiti da je produljenjem vremena došlo do aktivacije određenih staničnih obrambenih mehanizama koji sudjeluju u popravljanju oštećenja DNK.



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

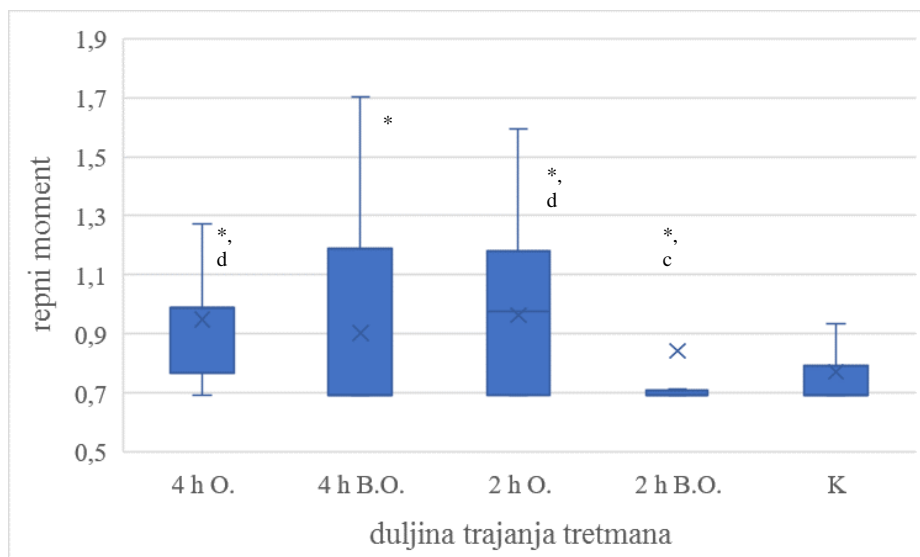
a - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata s oporavkom ($P < 0,05$)

b - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

d - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

Slika 22. Intenzitet repa kometa stanične linije HepG2 nakon 2 i 4 sata tretmana otopinama irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$

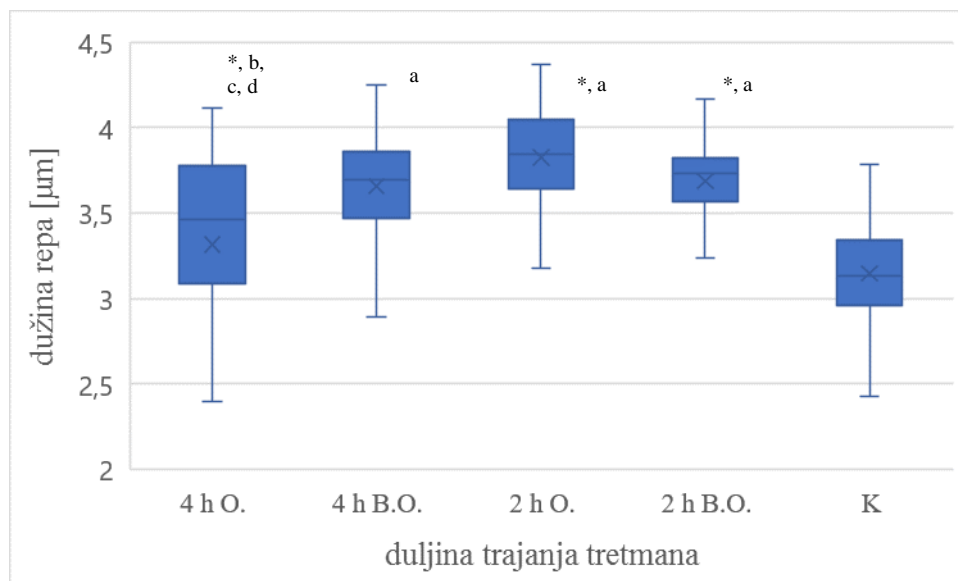
Iz slike 22 vidljivo je da otopine irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon svih vremena tretmana ne pokazuju značajno povećanje intenziteta repa kometa u odnosu na kontrolu. Štoviše, vrijednosti intenziteta repa nakon 2 i 4 sata manje su od vrijednosti intenziteta repa u kontroli. Iz grafičkog je prikaza vidljivo da se tijekom 2 i 4 sata tretmana HepG2 stanica postotak DNK statistički ne mijenja.



- * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)
a - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata s oporavkom ($P < 0,05$)
b - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata bez oporavka ($P < 0,05$)
c - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata s oporavkom ($P < 0,05$)
d - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

Slika 23. Repni moment kometa stanične linije HepG2 nakon 2 i 4 sata tretmana otopinama irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$

Iz slike 23 vidljivo je da su vrijednosti repnog momenta nakon svih vremena tretmana statistički značajne u odnosu na kontrolu. Statistički veće vrijednosti u odnosu na kontrolu zabilježene su nakon tretmana u trajanju od 2 sata s oporavkom te 4 sata bez i s oporavkom, dok je kod tretmana u trajanju od 2 sata bez oporavka zabilježeno statistički značajno smanjenje vrijednosti u odnosu na kontrolu. No, uzimajući u obzir dužinu repa i postotak DNK ne može se sa sigurnošću utvrditi da koncentracije IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon 2 i 4 sata dovode do oštećenja genetičkog materijala.



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

a - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata s oporavkom ($P < 0,05$)

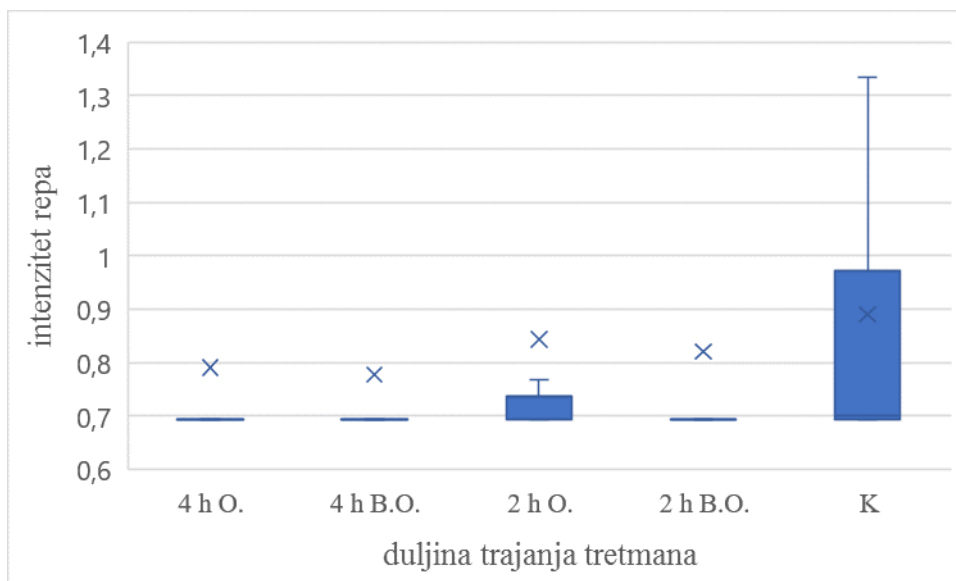
b - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 4 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

c - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata s oporavkom ($P < 0,05$)

d - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

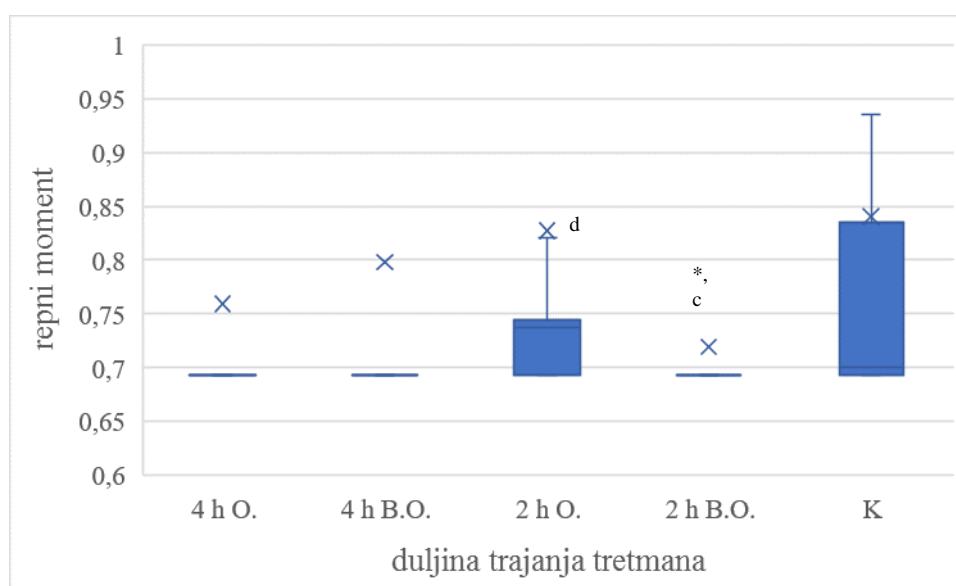
Slika 24. Dužina repa kometa stanične linije Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana otopinama irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$

Iz slike 24 vidljivo je da otopine irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon gotovo svih vremena tretmana osim 4 sata bez oporavka izazivaju statistički značajno povećanje dužine repa kometa u odnosu na kontrolu. Također, uočavaju se značajne razlike između prikazanih vremena tretmana. Tretman od 4 sata s oporavkom rezultirao je statistički značajnim smanjenjem dužine repa kometa u odnosu na ostala prikazana vremena. Takav se učinak pojavio i u staničnoj liniji HepG2, čime se može zaključiti da je produljenjem vremena došlo do aktivacije određenih staničnih obrambenih mehanizama kod obje stanične linije te su oni doprinijeli popravljanju oštećenja DNK.



Slika 25. Intenzitet repa kometa stanične linije Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana otopinama irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$

Iz slike 25 vidljivo je da otopine irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ nakon svih vremena tretmana ne pokazuju značajne promjene intenziteta repa kometa u odnosu na kontrolu. Štoviše, vrijednosti intenziteta repa nakon 2 i 4 sata manje su od vrijednosti intenziteta repa u kontroli, kao što je slučaj bio i u HepG2 staničnoj liniji. Vrijednosti postotka DNK tijekom ispitivanih vremena međusobno su podjednake, s vrlo malom promjenom intenziteta repa nakon 2 sata s oporavkom. Iz grafičkog je prikaza vidljivo da se tijekom 2 i 4 sata tretmana Caco-2 stanica postotak DNK statistički ne mijenja.



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

c - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata s oporavkom ($P < 0,05$)

d - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana u trajanju od 2 sata bez oporavka ($P < 0,05$)

Slika 26. Repni moment kometa stanične linije Caco-2 nakon 2 i 4 sata tretmana otopinama irinotekana i THC-a u koncentracijama IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$

Uzimajući u obzir dužinu repa i postotak DNK, iz grafičkog je prikaza slike 26 vidljivo da koncentracije IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ tijekom 2 i 4 sata ne izazivaju oštećenje genetičkog materijala Caco-2 stanica.

Iz priloženih se rezultata može zaključiti da je tretman staničnih linija HepG2 i Caco-2 različitim otopinama irinotekana i THC-a očito doveo do značajnih morfoloških promjena, zbog čega nije bilo moguće izbrojati komete pri višoj ispitivanoj koncentraciji (IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$), a pri nižoj se koncentraciji ne može sa sigurnošću utvrditi značajno djelovanje na genetički materijal. S obzirom da je na modelnoj DNK koncentracija IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ + THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazala jači signalni put zavijenog plazmida u odnosu na razmotani, iz čega se moglo zaključiti da ne uzrokuje statistički značajno oštećenje DNK, pretpostavka je da ta koncentracija ne pokazuje genotoksičan učinak ni na stanične linije HepG2 i Caco-2. Usporedbom ove dvije stanične linije, ipak se može doći do zaključka da su veća oštećenja DNK izazvana u HepG2 staničnoj liniji u odnosu na Caco-2 staničnu liniju u vezi s time što se hidroliza irinotekana, glukuronidacija SN-38, kao i metabolizam THC-a odvijaju prvenstveno u jetri.

Rezultati komet testa pojedinačnim tretmanom irinotekana također pokazuju da tijekom 2 i 4 sata izlaganja stanica nije došlo do oštećenja genetičkog materijala u HepG2 i Caco-2 staničnim linijama (Joukhadar, 2018). Na dvije stanične linije kolorektalnog karcinoma (HCT-116 i HT-29) provedeno je ispitivanje genotoksičnosti irinotekana pri koncentracijskim dozama od 0, 1, 5, 10, 15 i $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ u vremenskom periodu od 3, 8, 24, 48 i 72 h. Tretman stanica u trajanju od 24 sata s $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ irinotekanom prouzrokovao je najviše oštećenja DNK u obje stanične linije. Nakon tretmana u trajanju od 48 i 72 sata s istom dozom irinotekana, postotak DNK (intenzitet repa) bio je manji nego nakon 24 sata za obje stanične linije, što sugerira na stanične obrambene mehanizme kojima je započeo popravak oštećenja DNK izazvanih irinotekanom (Wood i sur., 2015). Genotoksičan je učinak THC-a dokazan kod koncentracije od $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ na HepG2 staničnoj liniji (Stoček, 2019). Sličan je rezultat dobiven *in vivo* istraživanjem na bijelim krvnim stanicama i stanicama mozga kod štakora, koji su oralnom primjenom unijeli THC u dozi od 7mg kg^{-1} tijekom 7 dana. Uočeno je vremenski ovisno povećanje intenziteta repa komete. Uz to, opseg oštećenja DNK u moždanim stanicama štakora tretiranih THC-om nakon 1 i 3 dana, percipiran u smislu dužine repa i ukupnih parametara površine komete, značajno je povećan u usporedbi s kontrolama (Kopjar i sur., 2019).

Rezultati dobiveni provedenim istraživanjem upućuju na to da su stanice jetre u ispitivanim tretmanima pokazale slabiju osjetljivost na toksični učinak irinotekana i THC-a pri kraćim vremenima trajanja od 2 i 4 sata, dok se produljenom izloženošću nakon tretmana u trajanju od 24 sata gubi proliferativni, a ispoljava citotoksični učinak. U prilog tome pripisuje se metabolizam prvog prolaska kroz jetru, enterohepatična recirkulacija oba spoja koja dovodi do produljenog trajanja njihovih farmakoloških učinaka, uzajamni učinci na mitohondrijsku disfunkciju i indukciju oksidativnog stresa. Za terapijske se koncentracije irinotekana i THC-a nije dokazao citotoksičan učinak, dok se povećanjem koncentracija i produljenjem vremena tretmana uočava smanjenje preživljenja kod obje stanične linije. S obzirom na to, u daljnjim su se testovima ispitivale koncentracije koje su imale subtoksični ili netoksični učinak.

Najveći prooksidacijski učinak irinotekana i THC-a zabilježen je nakon tretmana u trajanju od 4 sata. Relativno dugo poluvrijeme života ova dva spoja te njihovih metabolita omogućuje im da se akumuliraju u organizmu čime se postiže njihovo produljeno djelovanje. Caco-2 stanična linija pokazala se manje otpornom na oksidacijska oštećenja izazvana različitim otopinama irinotekana i THC-a u usporedbi s HepG2 staničnom linijom. To se može objasniti time što je Caco-2 stanična linija pokazala manji pad preživljenja u usporedbi s HepG2 staničnom linijom, a u vezi s time su i vidljivija nastala oksidacijska oštećenja.

Zbog nastalih morfoloških promjena pri ispitivanoj većoj koncentraciji IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ i THC $7 \mu\text{g mL}^{-1}$, prikazani rezultati komet testa uključivali su samo nižu koncentraciju IRI $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ i THC $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ za koju nije dokazan genotoksičan učinak na staničnu liniju HepG2 i Caco-2. Taj se rezultat može usporediti s dobivenim rezultatima na modelnoj DNK, kod koje je jasno vidljivo da oštećenja plazmida ponajviše uzrokuju više koncentracije irinotekana.

5. ZAKLJUČCI

1. Citotoksičan učinak irinotekana i THC-a raste s povećanjem koncentracija te s produljenjem vremena izloženosti stanica otopinama irinotekana i THC-a. Terapijska doza irinotekana i THC-a nakon kraćih vremena izlaganja pokazuje proliferacijski učinak, dok s produljenjem vremena dolazi do citotoksičnog učinka.

2. Netoksične i subtoksične koncentracije irinotekana i THC-a ne izazivaju prooksidacijski učinak na stanične linije HepG2 i Caco-2 nakon tretmana u trajanju od 2 sata. Najveći prooksidacijski učinak irinotekana i THC-a na obje stanične linije zabilježen je nakon tretmana u trajanju od 4 sata.

3. Genotoksičan se učinak mogao određivati samo za terapijske doze irinotekana i THC-a u trajanju izloženosti stanica od 2 i 4 sata. S obzirom na dokazanu citotoksičnost irinotekana i THC-a, pokazatelji razine oštećenja DNK nisu bili vidljivi za veću koncentraciju i duže vrijeme izlaganja stanica. Irinotekan u doznom odgovoru uzrokuje oštećenja plazmida, dok sam THC ne pokazuje isto. Povećanje koncentracije THC-a smanjuje oštećenja DNK izazvana irinotekanom.

6. LITERATURA

Adams, I. B., Martin, B. R. (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. **91**, 1585-614.

Alcindor, T., Beauger, N. (2011) Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*. **18**, 18–25.

ATCC (2020) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: HepG2 [HEPG2], <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=hr#characteristics>. Pristupljeno 15. studenoga 2020.

ATCC (2020) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: Caco-2 [Caco2], <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/htb-37.aspx?geo_country=hr#characteristics>. Pristupljeno 15. studenoga 2020.

Azmi, A. S. (2017) Conquering RAS: from biology to cancer therapy, 1. izd., Elsevier Academic Press, London, str. 3.

Baba, A. I., Cătoi, C. (2007) Carcinogenesis. U: Comparative Oncology, The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest, Romania, str. 45-94.

Baba, A. I., Cătoi, C. (2007) Tumor Cell Morphology. U: Comparative Oncology, The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest, Romania, str. 95-159.

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

Babson, K. A., Sottile, J., Morabito, D. (2017) Cannabis, cannabinoids, and sleep: a review of the literature. *Curr. Psychiatry Rep.* **19**, 23.

Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Gasperi, V., Maccarrone, M. (2006) New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem.* **6**, 257-268.

Batra, P., Sharma A.K. (2013) Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech.* **3**, 439-459.

Baxter, N. N., Virnig, D. J., Rothenberger, D. A., Morris, A. M., Jessurun, J., Virnig, B. A. (2005) Lymph node evaluation in colorectal cancer patients: a population-based study. *J Natl Cancer Inst.* **97**, 219-225.

Benson, A. B., Abrams, T. A., Ben-Josef, E., Bloomston, P. M., Botha, J. F., Clary, B. M., Covey, A., Curley, S. A., D'Angelica, M. I., Davila, R., Ensminger, W. D., Gibbs, J. F., Laheru, D., Malafa, M. P., Marrero, J., Meranze, S. G., Mulvihill, S. J., Park, J. O., Posey, J. A., Sachdev, J., Salem, R., Sigurdson, E. R., Sofocleous, C., Vauthey, J. N., Venook, A. P., Goff, L. W., Yen, Y., Zhu, A. X. (2009) NCCN clinical practice guidelines in oncology: hepatobiliary cancers. *J Natl Compr Canc Netw.* **7**, 350–391.

Betteridge, D. J. (2000) What is oxidative stress? *Metabolis.* **49**, 3-8.

Bloom, J. W., Kaltenborn, W. T., Paoletti, P., Camilli, A., Lebowitz, M. D. (1987) Respiratory effects of non-tobacco cigarettes. *Br Med J.* **295**, 1516-1518.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Bujak, I. T. (2015) Radikalima potaknute peroksidacije i izomerizacije nezasićenih masnih kiselina. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu: Prirodoslovno matematički fakultet.

Caffarel, M. M., Sarrió, D., Palacios, J., Guzmán, M., Sánchez, C. (2006) Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res.* **66**, 6615-21.

Castaneto, M. S., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Pirard, S., Huestis, M. A. (2014) Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug Alcohol Depend.* **144**, 12-41.

Cerretani, D., Collodel, G., Brizzi, A., Fiaschi, A. I., Menchiari, A., Moretti, E., Moltoni, L., Micheli, L. (2020) Cytotoxic effects of cannabinoids on human HT-29 colorectal adenocarcinoma cells: different mechanisms of THC, CBD, and CB83. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5533.

Chu, K. M. (2011) Epidemiology and Risk Factors of Colorectal Cancer. U: Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Colorectal Cancer, (Gearhart, S. L., Ahuja, N., ured.), Elsevier Inc., str. 1-11.

Collins, A. R., Osoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Štětina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* **23**, 143-151.

Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I. (2016) A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J. Chromatogr. B.* **1019**, 178–190.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer, PRODIGE Intergroup. (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1817-1825.

Dodds, H. M., Haaz, M. C., Riou, J. F., Robert, J., Rivory, L. P. (1998) Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 578-583.

de Jong, F., Mathijssen, R. H., Xie, R., Verweij, J., Sparreboom, A. (2006) Flat-fixed dosing of irinotecan: influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability. U: A Roadmap to Individualized Irinotecan Dosing, Floris Aart de Jong, Rotterdam, str. 7-10.

de Man, F. M., Goey, A., van Schaik, R., Mathijssen, R., Bins, S. (2018) Individualization of irinotecan treatment: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics. *Clin. pharmacokinet.* **57**, 1229–1254.

ECIS (2020) Estimates of cancer incidence and mortality in 2020, for all cancer sites. ECIS – European Cancer Information System, <[https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-HR%2-All%4-1,2%3-All%6-0.85%5-2008,2008%7-7%CEstByCancer%\\$X0 8 3%CEstRelativeCanc%\\$X1 8-3%\\$X1 9-AE27](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-HR%2-All%4-1,2%3-All%6-0.85%5-2008,2008%7-7%CEstByCancer%$X0 8 3%CEstRelativeCanc%$X1 8-3%$X1 9-AE27)>. Pristupljeno 20. listopada 2020.

ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A. (2017) Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **103**, 1-36.

Engels, F. K., de Jong, F. A., Sparreboom, A., Mathot, R. A., Loos, W. J., Kitzen, J. J., de Bruijn, P., Verweij, J., Mathijssen, R. H. (2007) Medicinal cannabis does not influence the clinical pharmacokinetics of irinotecan and docetaxel. *Oncologist.* **12**, 291-300.

Erdogan, H. K., Bulur, I., Kocaturk, E., Saracoglu, Z. N., Alatas, O., Bilgin, M. (2018) Advanced oxidation protein products and serum total oxidant/antioxidant status levels in rosacea. *Postepy Dermatol. Alergol.* **35**, 304-308.

- Fent K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. In Vitro.* **15**, 477-488.
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006) Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.***1**, 2315–2319.
- Freshney, R.I. (2000) *Animal Cell Culture*, 2. izd., Oxford University Press, New York.
- Freshney, R.I. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Fulmer, M. L., Thewke, D. P. (2018) The endocannabinoid system and heart disease: the role of cannabinoid receptor type 2. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* **18**, 34-51.
- Gage, S. H., Hickman, M., Zammit, S. (2016) Association between cannabis and psychosis: epidemiologic evidence. *Biol. Psychiatry.* **79**, 549-556.
- Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., Chollet, P., Llory, J. F., Letourneau, Y., Coudert, B., Bertheaut-Cvitkovic, F., Larregain-Fournier, D., Le Rol, A., Walter, S., Adam, R., Misset, J. L., Lévi, F. (2000) Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **18**, 136-147.
- Grotenhermen F. (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin. Pharm.* **42**, 327–359.
- Gupta, E., Lestingi, T. M., Mick, R., Ramirez, J., Vokes, E. E., Ratain, M. J. (1994) Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res.* **54**, 3723-3725.
- Guzmán, M. (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev.Cancer.* **3**, 745-755.
- Hazekamp, A. (2007) *Cannabis; extracting the medicine*. Doktorski rad. Leiden: Leiden University.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis.* **13**, 89-94.

Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., Holden, K. G., Jakas, D. R., Gallagher, G., Mattern, M. R., Mong, S. M., Bartus, J. O., Johnson, R. K., Kingsbury, W. D. (1989) Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J. Med. Chem.* **32**, 715-720.

Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R., Herkenham, M. (1990) The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends Neurosci.* **13**, 420-423.

Hsiao, P., Clavijo, R. I. (2018) Adverse effects of cannabis on male reproduction. *Eur. Urol. Focus.* **4**, 324-328.

Huestis M. A. (2007) Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem.Biodivers.* **4**, 1770–1804.

Huffman, J. W., Duncan, S. G., Wiley, J., Martin, B. R. (1997) Synthesis and pharmacology of the 1'2'-dimethylheptyl-Delta(8)-THC isomers: Exceptionally potent cannabinoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2799-2804.

Humerickhouse, R., Lohrbach, K., Li, L., Bosron, W. F., Dolan, M. E. (2000) Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res.* **60**, 1189-1192.

Ikegami, T., Ha, L., Arimori, K., Latham, P., Kobayashi, K., Ceryak, S., Matsuzaki, Y., Bouscarel, B. (2002) Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. *Cancer Res.* **62**, 179-187.

Innocenti, F., Kroetz, D. L., Schuetz, E., Dolan, M. E., Ramírez, J., Relling, M., Chen, P., Das, S., Rosner, G. L., Ratain, M. J. (2009) Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2604-2614.

Jessup, J. M., McGinnis, L. S., Steele Jr, G. D., Menck, H. R., Winchester, D. P. (1996) The National Cancer Data Base. Report on colon cancer. *Cancer.* **78**, 918-926.

Jiang, H. E., Li, X., Zhao, Y. X., Ferguson, D. K., Hueber, F., Bera, S., Wang, Y. F., Zhao, L. C., Liu, C. J., Li, C. S. (2006) A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *J. Ethnopharmacol.* **108**, 414-422.

Johansson, E., Agurell, S., Hollister, L. E., Halldin, M. M. (1988) Prolonged apparent half-life of delta 1-tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 374-375.

Joukhadar, L. (2018) Genotoksični učinak irinotekana na ljudske tumorske stanice jetre i crijeva. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

Karthaus, M., Ballo, H., Abenhardt, W., Steinmetz, T., Geer, T., Schimke, J., Braumann, D., Behrens, R., Behringer, D., Kindler, M., Messmann, H., Boeck, H. P., Greinwald, R., Kleeberg, U. (2005) Prospective, double-blind, placebo-controlled, multicenter, randomized phase III study with orally administered budesonide for prevention of irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea in patients with advanced colorectal cancer. *Oncology.* **68**, 326-332.

Kehrer, D. F., Sparreboom, A., Verweij, J., de Bruijn, P., Nierop, C. A., van de Schraaf, J., Ruijgrok, E. J., de Jonge, M. J. (2001) Modulation of irinotecan-induced diarrhea by cotreatment with neomycin in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1136-1141.

Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., Solovyeva, V. V. (2020) Cell culture based *in vitro* test systems for anticancer drug screening. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 322.

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

Kobayashi, K., Bouscarel, B., Matsuzaki, Y., Ceryak, S., Kudoh, S., Fromm H. (1999) pH-dependent uptake of irinotecan and its active metabolite, SN-38, by intestinal cells. *Int. J. Cancer.* **83**, 491-496.

Kopjar, N., Fuchs, N., Brčić Karačonji, I. (2020) High doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol might impair irinotecan chemotherapy: areview of potentially harmful interactions. *Clin. Drug Investig.* **40**, 775–787.

Kopjar, N., Fuchs, N., Žunec, S., Mikolić, A., Micek, V., Kozina, G., Lucić Vrdoljak, A., Brčić Karačonji, I. (2019) DNA damaging effects, oxidative stress responses and cholinesterase activity in blood and brain of Wistar rats exposed to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Molecules.* **24**, 1560.

Laezza, C., Pagano, C., Navarra, G., Pastorino, O., Proto, M. C., Fiore, D., Piscopo, C., Gazzerro, P., Bifulco, M. (2020) The endocannabinoid system: a target for cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 747.

Lawrence, D. K., Gill, E. W. (1975) The effects of delta¹-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol. Pharmacol.* **5**, 595-602.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* **62**, 3923-3927.

Liu, L. F., Desai, S. D., Li, T. K., Mao, Y., Sun, M., Sim, S. P. (2000) Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **922**, 1-10.

López-Lázaro, M. (2010) A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol. Med.* **16**, 144-153.

López-Lázaro M. (2008) The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med. Chem.* **8**, 305-312.

Lucić Vrdoljak, A., Fuchs, N., Mikolić, A., Žunec, S., Brčić Karačonji, I., Jurič, A., Prester, L.J., Micek, V., Neuberger, M., Čanović, S., Mršić, G., Kopjar, N. (2018) Irinotecan and Δ^9 -tetrahydrocannabinol interactions in rat liver: a preliminary evaluation using biochemical and genotoxicity markers. *Molecules.* **23**, 2-25.

Mackie, K., Devane, W. A., Hille, B. (1993) Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* **44**, 498-503.

Makovets, S. (2013) DNA electrophoresis: methods and protocols, 1. izd., Humana press, New Jersey.

Markus Klarić, M., Klarić, D., Brborović, O., Capak, K. (2020) Marihuana – zlouporaba i medicinska uporaba. *J. Appl. Health Sci.* **6**, 137-151.

Mathijssen, R. H. J., Van Alphen, R. J., Verweij, J., Loos, W. J., Nooter, K., Stoter, G., Sparreboom, A. (2001) Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.* **7**, 2182–2194.

Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F., Hwang, P. M. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* **312**, 1650-1653.

McAllister, S. D., Griffin, G., Satin, L. S., Abood, M. E. (1999) Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 618-626.

Meiri, E., Jhangiani, H., Vredenburg, J. J., Barbato, L. M. (2007) Efficacy of dronabinol alone and in combination with ondansetron versus ondansetron alone for delayed chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Curr. Med. Res. Opin.* **3**, 533-543.

Merlin, M. D. (2003) Archaeological evidence for the tradition of psychoactive plant use in the old world. *Econ. Bot.* **57**, 295–323.

Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology.* **198**, 329-340.

Morales, P., Hurst, D. P., Reggio, P. H. (2017) Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **103**, 103–131.

Morris, E. J., Geller, H. M. (1996) Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J. Cell Biol.* **134**, 757-770.

Morton, C. L., Wadkins, R. M., Danks, M. K., Potter, P. M. (1999) The anticancer prodrug CPT-11 is a potent inhibitor of acetylcholinesterase but is rapidly catalyzed to SN-38 by butyrylcholinesterase. *Cancer Res.* **59**, 1458-1463.

Mouslech, Z., Valla, V. (2009) Endocannabinoid system: an overview of its potential in current medical practice. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **30**, 153-179.

National Center for Biotechnology Information (2020) PubChem Compound Summary for CID 104842, 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin>>.

Pristupljeno 13. studenoga 2020.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 2978, delta9-Tetrahydrocannabinol. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/delta9-Tetrahydrocannabinol>>. Pristupljeno

13. studenoga 2020.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005) Glycolysis, Gluconeogenesis and the Pentose Phosphate Pathway. U: *Lehninger Principles of Biochemistry*, WH Freeman and Company, New York, str. 522-560.

NCI (2020) Types of Cancer Treatment. NCI – National Cancer Institute, <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>>. Pristupljeno 25. listopada 2020.

Pacher, P., Mechoulam, R. (2011) Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system?. *Prog. Lipid Res.* **50**, 193–211.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 74-108.

Perez-Reyes, M., Wall, M. E. (1982) Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk. *N. Engl. J. Med.* **307**, 819-820.

Pericleous, M., Mandair, D., Caplin, M. E. (2013) Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **4**, 409–423.

Piomelli, D. (2013) Endocannabinoids. U: *Encyclopedia of Biological Chemistry*, (Lennarz, W. J., Lane, M. D., ured.), 2. izd., Elsevier Inc., str. 194-196.

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

Powles, T., te Poele, R., Shamash, J., Chaplin, T., Propper, D., Joel, S., Oliver, T., Liu, W. M. (2005) Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood.* **105**, 1214-1221.

Preet, A., Ganju, R., Groopman, J. (2008) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration *in vitro* as well as its growth and metastasis *in vivo*. *Oncogene.* **27**, 339–346.

Prester, L., Mikolić, A., Jurič, A., Fuchs, N., Neuberg, M., Lucić Vrdoljak, A., Brčić Karačonji, I. (2018) Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on irinotecan- induced clinical effects in rats. *Chem. Biol. Interact.* **294**, 128-134.

Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A. (2000) Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* **2**, 291-299.

Scoumanne, A., Harms, K. L., Chen, X. (2005) Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 1178-1185.

Pyszniak, M., Tabarkiewicz, J., Łuszczki, J. J. (2016) Endocannabinoid system as a regulator of tumor cell malignancy – biological pathways and clinical significance. *Onco. Targets Ther.* **9**, 4323–4336.

Rashid, A., Zahurak, M., Goodman, S. N., Hamilton, S. R. (1999) Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut.* **44**, 826-833.

Rudakova, E. V., Boltneva, N. P., Makhaeva, G. F. (2011) Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood. *Bull. Exp. Biol. Med.* **152**, 73-75.

Salopek-Sondi, B., Piljac-Žegarac, J., Magnus, V., Kopjar, N. (2010) Free radical-scavenging activity and DNA damaging potential of auxins IAA and 2-methyl-IAA evaluated in human neutrophils by the alkaline comet assay. *J. Biochem. Mol. Toxic.* **24**, 165-173.

- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* **21**, 1-26.
- Sarafian, T. A., Kouyoumjian, S., Khoshaghdeh, F., Tashkin, D. P., Roth, M. D. (2003) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetics. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **284**, L298–L306.
- Sarafian, T. A., Kouyoumjian, S., Tashkin, D., Roth, M. D. (2002) Synergistic cytotoxicity of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and butylated hydroxyanisole. *Toxicol. Lett.* **133**, 171-179.
- Sarafian, T. A., Magallanes, J. A., Shau, H., Tashkin, D., Roth, M. D. (1999) Oxidative stress produced by marijuana smoke. An adverse effect enhanced by cannabinoids. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 1286-1293.
- Smith-Kielland, A., Skuterud, B., Mørland, J. (1999) Urinary excretion of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinoids in frequent and infrequent drug users. *J. Anal. Toxicol.* **23**, 323-332.
- Stoček, S. (2019) Genotoksični učinak Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC) na ljudske tumorske stanice jezika, jetre i crijeva. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Storz, P. (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* **10**, 1881-1896.
- Sun, H., Chow, E., Liu, S., Du, Y., Pang, S. (2008) The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 395-411.
- Tait, S. W., Ichim, G., Green, D. R. (2014) Die another way–non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* **127**, 2135-2144.
- Takasuna, K., Hagiwara, T., Hirohashi, M., Kato, M., Nomura, M., Nagai, E., Yokoi, T., Kamataki, T. (1996) Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Res.* **56**, 3752-3757.
- Takeba, Y., Kumai, T., Matsumoto, N., Nakaya, S., Tsuzuki, Y., Yanagida, Y., Kobayashi, S. (2007) Irinotecan activates p53 with its active metabolite, resulting in human hepatocellular carcinoma apoptosis. *J. Pharm. Sci.* **104**, 232–242.

Thirion, P., Michiels, S., Pignon, J. P., Buyse, M., Braud, A. C., Carlson, R. W., O'Connell, M., Sargent, P., Piedbois, P. Meta-Analysis Group in Cancer (2004) Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3766-3775.

Trichopoulos, D., Bamia, C., Lagiou, P., Fedirko, V., Trepo, E., Jenab, M., Pischon, T., Nöthlings, U., Overvad, K., Tjønneland, A., Outzen, M., Clavel-Chapelon, F., Kaaks, R., Lukanova, A., Boeing, H., Aleksandrova, K., Benetou, V., Zylis, D., Palli, D., Pala, V., Panico, S., Tumino, R., Sacerdote, C., Bueno-De-Mesquita, H. B., Van Kranen, H. J., Peeters, P. H., Lund, E., Quirós, J. R., González, C. A., Sanchez Perez, M. J., Navarro, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Lindkvist, B., Regnér, S., Werner, M., Hallmans, G., Khaw, K. T., Wareham, N., Key, T., Romieu, I., Chuang, S. C., Murphy, N., Boffetta, P., Trichopoulou, A., Riboli, E. (2011) Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 1686-1695.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125-1131.

Rothenberg, M. L. (2001) Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions—colorectal cancer and beyond. *Oncologist.* **6**, 66-80.

Schultes, R., Klein, W., Plowman, T., Lockwood, T. (1974) Cannabis: an example of taxonomic neglect. *Bot. Mus. Leaf. Harv. Univ.* **23**, 337-367.

Sharma, P., Murthy, P., Bharath, M. M. (2012) Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran. J. Psychiatry.* **7**, 149–156.

Small, E., Cronquist, A. (1976) A practical and natural taxonomy for cannabis. *Taxon.* **25**, 405-435.

Strasser, F., Luftner, D., Possinger, K., Ernst, G., Ruhstaller, T., Meissner, W., Ko, Y. D., Schnelle, M., Reif, M., Cerny, T. (2006) Comparison of orally administered cannabis extract and delta-9-tetrahydrocannabinol in treating patients with cancer-related anorexia-cachexia syndrome: a multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial from the Cannabis-In-Cachexia-Study-Group. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3394-3400.

Ujváry, I., Hanuš, L. (2016) Human metabolites of cannabidiol: a review on their formation, biological activity, and relevance in therapy. *Cannabis Cannabinoid Res.* **1**, 90–101.

- Valentí Moreno, V., Brunet Vidal, J., Manzano Alemany, H., Salud Salvia, A., Llobera Serentill, M., Cabezas Montero, I., Servitja Tormo, S., Sopena Bert, E., Gumà Padró, J. (2006) Prevention of irinotecan associated diarrhea by intestinal alkalization. A pilot study in gastrointestinal cancer patients. *Clin. Transl. Oncol.* **8**, 208-212.
- Vredenburg, J. J., Desjardins, A., Reardon, D. A., Friedman, H. S. (2009) Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma. *Neuro Oncol.* **11**, 80-91.
- Wall, M. E., Sadler, B. M., Brine, D., Taylor, H., Perez-Reyes, M. (1983) Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther.* **34**, 352-63.
- Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., Keurentjes, J. C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidtkofer, S., Westwood, M., Kleijnen, J. (2015) Cannabinoids for medical use: asystematic review and meta-analysis. *JAMA.* **313**, 2456-2473.
- Witold, K., Anna, K., Maciej, T., Jakub, J. (2018) Adenomas – Genetic factors in colorectal cancer prevention. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **23**, 75–83.
- Wood, J. P., Smith, A. J., Bowman, K. J., Thomas, A. L., Jones, G. D. (2015) Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer. Med.* **4**, 1309-1321.
- Xie, R., Mathijssen, R. H., Sparreboom, A., Verweij, J., Karlsson, M. O. (2002) Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites: a population analysis. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3293-3301.
- Yamaori, S., Kushihara, M., Yamamoto, I., Watanabe, K. (2010) Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 1691-1698.
- Zuardi, A. W. (2006) History of cannabis as a medicine: a review. *Braz. J. Psychiatry.* **28**, 153-157.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ana-Marija Genc

