

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko PEZDIRC

**MEHANIZMI TOKSIČNEGA IN GENOTOKSIČNEGA
DELOVANJA HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV IN
EKSTRAKTOV PEČENEGA MESA V CELICAH ČLOVEŠKEGA
HEPATOMA (HepG2)**

Doktorska disertacija

**MECHANISMS OF THE TOXIC AND GENOTOXIC MODE OF
ACTION OF HETEROCYCLIC AROMATIC AMINES AND
GRILLED MEAT EXTRACTS IN HUMAN HEPATOMA
CELL LINE (HepG2)**

Doctoral Dissertation

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 23. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani dne 7. 12. 2012 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Metka Filipič.

Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na Oddeleku za genotoksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Metka FILIPIČ

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka

Članica: prof. dr. Lea DEMŠAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Marija SOLLNER DOLENC

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora: 9. 12. 2013

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marko Pezdirc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK 61:547.233:637.5(043.3)=163.6
KG heterociklični aromatski amini/ekstrakti pečenega mesa/
genotoksičnost/ekspreacija genov/celični cikel/celice HepG2
AV PEZDIRC, Marko, univ. dipl. biolog
SA FILIPIČ, Metka (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biologije
LI 2013
IN MEHANIZMI TOKSIČNEGA IN GENOTOKSIČNEGA DELOVANJA
HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV IN EKSTRAKTOV PEČENEGA
MESA V CELICAH ČLOVEŠKEGA HEPATOMA (HepG2)
TD Doktorska disertacija
OP XII, 142 str., 13 pregl., 32 sl., 4 pril., 309 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Prehrana ključno vpliva na nastanek rakavih obolenj pri ljudeh. Heterociklični aromatski amini (HAA) so karcinogeni, ki se tvorijo pri pečenju mesa. Najpogosteji so 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridin (PhIP), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-*f*]kinoksalin (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-*f*]kinoksalin (4,8-DiMeIQx) in 2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-*f*]kinolin (IQ). Čeprav *in vitro* in *in vivo* eksperimentalni podatki potrjujejo genotoksično in rakotvorno delovanje HAA, pa natančna ocena tveganja, pri izpostavljenosti nizkim dozam v zmesih, ni mogoča brez poznавanja njihovega načina delovanja. Raziskali smo odziv celic humanega hepatoma (HepG2) po 24 h izpostavljenosti HAA, njihovim kombinacijam in ekstraktom pečenega mesa (EPM) iz govejega, prašičjega in piščančjega mesa. Sestavo in količino HAA v EPM smo določili s tekočinsko kromatografijo (HPLC-MS/MS). Največ HAA je vseboval EPM piščanca, najmanj pa EPM govedine. Mutagenost HAA in EPM smo določali z Ames testom s sevom *S. typhimurium* TA98 v prisotnosti eksogene metabolne aktivacije. Največji mutageni potencial je imel 4,8-DiMeIQx, nato IQ, MeIQx in PhIP. V primerjavi s posameznimi HAA je bil mutageni potencial EPM manjši. S testom komet smo ugotovili, da PhIP, MeIQx in IQ povzročajo prelome DNA, medtem ko jih 4,8-DiMeIQx in EPM ne. Analiza fosforiliracije histona H2AX s pretočno citometrijo je pokazala, da PhIP povzroča dvoverižne prelome DNA, v manjši meri tudi IQ in 4,8-DiMeIQx. Povečanje števila mikrojeder smo opazili le v celicah izpostavljenim EPM piščanca. Vsi proučevani HAA, njihove kombinacije in EPM so povečali izražanje genov, ki kodirajo metabolne encime CYP1A1, CYP1A2 in UGT1A1. Le-ti so odgovorni za bioaktivacijo in detoksifikacijo HAA. Izražanje *P53* in genov, ki se odzovejo na genotoksični stres (*CDKN1A*, *GADD45α*) je bilo prav tako povečano. Analiza celičnega cikla je pokazala, da PhIP, IQ in EPM piščanca ustavlja celični cikel v S fazici, 4,8-DiMeIQx in MeIQx pa v G1 fazici. Rezultati kažejo, da se po izpostavitvi HAA celice odzovejo z zaustavitvijo celičnega cikla, kar omogoča popravo poškodb DNA ali pa se sprožijo procesi, ki vodijo celice v apoptozo. HAA in EPM so v celicah povzročili povečano izražanje anti-apoptotskega gena *BCL-2* in zmanjšano izražanje pro-apoptotskega gena *BAX*. Zaznali nismo nobenih sprememb v izražanju in aktivnost efektorskih kaspaz 3 in 7 kakor tudi ne sprememb v deležu apoptotskih celic, določenih s pretočno citometrijo. Rezultati nakazujejo, da HAA lahko zavirajo apoptozo, kar pomeni večjo verjetnost preživetja celic s poškodovano DNA oz. mutacijami. Kvantitativna analiza izražanja metabolnih genov in *CDKN1A* je pokazala izrazito sinergistično delovanje kombinacij HAA in EPM. To pomeni, da ni mogoče predvideti genotoksičnega potenciala zmesi na osnovi delovanja posameznih HAA. Sinergistični učinek zmesi HAA je potrebno upoštevati pri oceni tveganja za ljudi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 61:547.233:637.5(043.3)=163.6
CX heterocyclic aromatic amines/grilled meat extracts/genotoxicity/gene expression/cell-cycle/HepG2 cells
AU PEZDIRC, Marko
AA FILIPIČ, Metka (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biology
PY 2013
TI MECHANISMS OF THE TOXIC AND GENOTOXIC MODE OF ACTION OF HETEROCYCLIC AROMATIC AMINES AND GRILLED MEAT EXTRACTS IN HUMAN HEPATOMA CELL LINE (HepG2)
DT Doctoral Dissertation
NO XII, 142 p., 13 tab., 32 fig., 4 ann., 309 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Dietary factors play a crucial role in the aetiology of cancer in humans. Heterocyclic aromatic amines (HAA) are potent human carcinogens formed in well-done meat. The most abundant are 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-Amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) and 2-Amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). HAA exert genotoxic activity after metabolic transformation by CYP1A enzymes that is well characterized, however the genomic and intervening responses are not well explored. We have examined cellular and genomic responses of human hepatoma HepG2 cells after 24 h exposure to HAA, their mixtures and grilled meat extracts (GME) from beef, pork and chicken. The composition and amount of HAA in GME was determined using HPLC-MS/MS. The highest amount of HAA was found in chicken GME and the lowest in beef GME. Firstly, we determined mutagenic potential with *S. typhimurium* TA98 in the presence of rat liver S9. 4,8-DiMeIQx exerted the highest mutagenicity followed by IQ, MeIQx and PhIP. The mutagenic potential of GME was much lower compared to single HAA. Comet assay revealed increase in formation of DNA strand breaks by PhIP, MeIQx and IQ but not 4,8-DiMeIQx and GME. H2AX foci analysis by flow cytometry showed formation of DNA double strand breaks induced by PhIP and to a lesser extent also IQ and 4,8-DiMeIQx. Increased formation of micronuclei was observed only in cells exposed to chicken GME. The four HAA, their mixtures and GME up-regulated expression of genes encoding metabolic enzymes CYP1A1, CYP1A2 and UGT1A1 which are responsible for bioactivation or detoxification of HAA. The expression of P53 and its downstream regulated genes CDKN1A, GADD45α, BCL-2 was also up-regulated confirming the genotoxic activity of HAA. Consistent with the up-regulation of CDKN1A and GADD45α the cell-cycle analysis showed arrest in S-phase induced by PhIP, IQ and chicken GME, and in G1-phase induced by 8,4-DiMeIQx and MeIQx. The results indicate that upon exposure to HAA the cells respond with the cell-cycle arrest, which enables cells to repair the DNA damage or eliminate them by apoptosis. However, the elevated expression of BCL-2, down-regulation of BAX, no effect of HAA and GME on gene expression and activity of the effector caspases 3 and 7 and also no increase in the number of apoptotic cells determined by flow cytometry may indicate that HAA could suppress apoptosis meaning increased probability of damaged cells to survive and mutate. Quantitative analysis by qRT-PCR of the differential expression of metabolic genes and CDKN1A showed clear synergistic activity of HAA in mixtures and GME. This means that it is not possible to predict genotoxic potential of HAA in mixtures on the basis of the activity of single HAA. Synergistic effect should be taken into account while assessing the human risk.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RAK IN PREHRANA	3
2.2 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI	4
2.2.1 Struktura in nastanek HAA.....	4
2.2.2 Vsebnost HAA v mesu	7
2.2.3 Izpostavljenost ljudi HAA	9
2.3 MEHANIZNI DELOVANJA HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV	10
2.3.1 Metabolizem HAA	10
2.3.2 Poškodbe DNA	14
2.3.3 Mutagenost in genotoksičnost HAA.....	16
2.3.4 Odziv celic na poškodbe DNA	19
2.3.4.1 Vpliv HAA na signalne poti, ki se odzovejo na poškodbe DNA	19
2.3.4.2 HAA in apoptoza.....	21
2.4 RAKOTVORNOST HAA	24
3 MATERIAL IN METODE	26
3.1 MATERIAL.....	26
3.1.1 Kemikalije	26
3.1.2 Bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>	26
3.1.2.1 Gojenje bakterij	27
3.1.3 Celična linija HepG2	27
3.1.3.1 Gojenje celic HepG2	28
3.2 METODE.....	29
3.2.1 Priprava ekstrakta pečenega mesa in določanje vsebnosti HAA	29

3.2.1.1	Priprava ekstraktov pečenega mesa	29
3.2.1.2	Določanje vsebnosti HAA v ekstraktih pečenega mesa	30
3.2.2	Določanje vpliva HAA in EPM na preživetje in celični cikel celic HepG2	31
3.2.2.1	Testa MTS in MTT za določanje citotoksičnosti	31
3.2.2.2	Določanje vpliva HAA in EPM na celični cikel celic HepG2 s pretočno citometrijo	32
3.2.3	Določanje mutagenosti in genotoksičnosti HAA in EPM	34
3.2.3.1	Test povratnih mutacij (Amesov test).....	34
3.2.3.2	Test komet na celicah HepG2	36
3.2.3.3	Določanje dvoverižnih prelomov DNA s pretočno citometrijo.....	38
3.2.3.4	Test mikrojeder na celicah HepG2	40
3.2.4	Analiza sprememb v izražanju genov v celicah HepG2 pod vplivom HAA in EPM	42
3.2.4.1	Izpostavitev celic in izolacija celotne RNA.....	42
3.2.4.2	Določanje koncentracije in čistosti DNA	43
3.2.4.3	Prepis RNA v enoverižno komplementarno cDNA (reverzna transkripcija – RT-PCR).....	44
3.2.4.4	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času – qRT-PCR.....	44
3.2.5	Analiza izražanja proteinov v celicah HepG2 pod vplivom HAA	46
3.2.5.1	Priprava proteinskih vzorcev	46
3.2.5.2	Prenos Western	47
3.2.6	Določanje vpliva HAA in EPM na apoptozo celic HepG2	48
3.2.6.1	Izpostavitev celic HepG2 s HAA in EPM piščanca	48
3.2.6.2	Določanje spremembe mitohondrijskega membranskega potencial (MMP) v celicah HepG2	49
3.2.6.3	Določanje vpliva HAA in EPM piščanca na izgubo asimetrije celične membrane celic HepG2 s pretočno citometrijo	50
3.2.6.4	Merjenje aktivnosti efektorskih kaspaz 3 in 7	52
4	REZULTATI.....	53
4.1	VSEBNOST HAA V EKSTRAKTIH PEČENEGA MESA	53
4.2	VPLIV HAA IN EPM NA PREŽIVETJE IN CELIČNI CIKEL CELIC HepG2	55
4.2.1	Vpliv na preživetje.....	55

4.2.2	Vpliv na celični cikel	56
4.3	VPLIV HAA IN EPM NA IZRAŽANJE GENOV, KI KODIRajo METABOLNE ENCIME CELIC HepG2	61
4.4	GENOTOKSIČNO DELOVANJE HAA IN EPM.....	68
4.4.1	Vpliv HAA in EPM na nastanek povratnih mutacij v <i>S. typhimurium</i>	68
4.4.2	Vpliv HAA in EPM na nastanek prelomov DNA v celicah HepG2.....	71
4.4.3	Vpliv HAA na nastanek dvooverižnih prelomov DNA v celicah HepG2.....	74
4.4.4	Vpliv HAA in EPM na nastanek poškodb kromosomov v celicah HepG2	76
4.4.5	Vpliv HAA in EPM na izražanje genov, ki se odzovejo na poškodbe DNA v celicah HepG2.....	79
4.5	VPLIV HAA IN EPM NA PROCESE APOPTOZE V CELICAH HepG2	84
4.5.1	Prepustnost zunanje mitohondrijske membrane	84
4.5.2	Delež apoptotskih celic po izpostavitvi HAA in EPM	87
4.5.3	Izražanje genov, ki so vpleteni v apoptozo celic HepG2.....	89
4.5.4	Aktivnost kaspaz 3 in 7	95
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	98
5.1	RAZPRAVA.....	98
5.1.1	Toksično in genotoksično delovanje HAA in EPM	98
5.1.1.1	Vpliv HAA in EPM na nastanek povratnih mutacij v <i>S. typhimurium</i>	98
5.1.1.2	Genotoksično delovanje HAA in EPM v celicah HepG2.....	101
5.1.2	Vpliv HAA na izražanje genov,ki kodirajo metabolne encime celic HepG2.....	104
5.1.3	Vpliv HAA in EPM na celični cikel in njegovo regulacijo	112
5.1.4	Vpliv HAA in EPM na programirano celično smrt	116
5.2	SKLEPI.....	119
6	POVZETEK (SUMMARY)	124
6.1	POVZETEK.....	124
6.2	SUMMARY.....	127
7	VIRI	131

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Sestava in vsebnost HAA v ekstraktih iz skorje pečenega govejega, prašičjega in piščančjega mesa ter v 100-krat razredčenih ekstraktih (1 vol. %).....	54
Preglednica 2:	Vpliv HAA na spremembe izražanja genov, ki kodirajo metabolne encime celic HepG2	62
Preglednica 3:	Vpliv ekstraktov pečenega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja genov, ki kodirajo metabolne encime celic HepG2	64
Preglednica 4:	Vpliv HAA na nastanek povratnih mutacij v bakterijskem sevu <i>S. typhimurium</i> TA98.....	68
Preglednica 5:	Vpliv ekstraktov pečenega mesa na nastanek povratnih mutacij v bakterijskem sevu <i>S. typhimurium</i> TA98	70
Preglednica 6:	Nastanek mikrojeder (MN), nukleoplazemskih mostičkov (NPBs) in jedrnih brstov (NB) ter spremembe v delitvenem indeksu celic HepG2 pod vplivom HAA	77
Preglednica 7:	Nastanek mikrojeder (MN), nukleoplazemskih mostičkov (NPBs) in jedrnih brstov (NB) ter spremembe v delitvenem indeksu celic HepG2 pod vplivom EPM	78
Preglednica 8:	Vpliv HAA na spremembe izražanja genov, ki sodelujejo v signalnem odgovoru na poškodbe DNA v celicah HepG2	80
Preglednica 9:	Vpliv ekstraktov pečenega govejega in prašičjega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja genov, ki sodelujejo v signalnem odgovoru na poškodbe DNA v celicah HepG2	82
Preglednica 10:	Vpliv ekstrakta pečenega piščančjega mesa in kombinacij HAA na spremembe izražanja genov, ki sodelujejo v signalnem odgovoru na poškodbe DNA v celicah HepG2	83
Preglednica 11:	Vpliv HAA na spremembe izražanja genov vpletenih v apoptozo celic HepG2	91
Preglednica 12:	Vpliv ekstraktov pečenega govejega in prašičjega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja BAX in BCL-2 v celicah HepG2	93
Preglednica 13:	Vpliv ekstrakta pečenega piščančjega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja genov vpletenih v apoptozo celic HepG2.....	94

KAZALO SLIK

Slika 1:	Strukturne formule glavnih aminokarbolinov in aminoimidazoazarenov.....	5
Slika 2:	Nastanek imidazokinolinov in imidazokinoksalinov	6
Slika 3:	Glavne metabolne PhIP v poskusnih živalih in pri ljudeh	12
Slika 4:	Mehanizem bioaktivacije N-NO-MeIQx	13
Slika 5:	Metabolna aktivacija HAA in nastanek arilnitrenijevega iona na primeru IQ....	14
Slika 6:	Kemijske strukture nekaterih HAA-DNA aduktov	16
Slika 7:	Signalni poti odgovora na poškodbe DNA	20
Slika 8:	Poenostavljena shema regulacije P53 in njegovih transkripcijskih tarč.....	21
Slika 9:	Shema apoptotskih poti	23
Slika 10:	Strukturne formule in molska masa (MW) HAA uporabljenih v poskusih	26
Slika 11:	Celice HepG2 pod faznim kontrastom	28
Slika 12:	Tipičen histogram, ki ga dobimo pri analizi vzorca celic, barvanih s propidijevim jodidom, s pretočno citometrijo	33
Slika 13:	Jedro celice z nepoškodovano (A) in s poškodovano DNA po testu komet pri 400-kratni povečavi.....	37
Slika 14:	Dvojedrna celica (A) z mikrojedrom – MN in jedrnim brstom ter dvojedrna celica z nukleoplazemskim mostičkom (NBP)	40
	nukleoplazemskim mostičkom (NPB).....	40
Slika 15:	Primer določitve števila apoptotskih celic barvanih s FITC-Aneksinom V in PI na pretočnem citometru.	51
Slika 16:	Vpliv HAA na preživetje celic HepG2	55
Slika 17:	Vpliv ekstraktov pečenega mesa na preživetje celic HepG2	56
Slika 18:	Vpliv PhIP in 4,8-DiMeIQx na spremembo celičnega cikla celic HepG2.....	57
Slika 19:	Vpliv MeIQx in IQ na spremembo celičnega cikla celic HepG2.....	58
Slika 20:	Vpliv EPM piščanca in kombinacij HAA na spremembo celičnega cikla celic HepG2	60
Slika 21:	Vpliv kombinacij HAA na spremembe izražanja genov CYP1A1 in CYP1A2 v celicah HepG2	67
Slika 22:	Nastanek prelomov DNA v celicah HepG2 pod vplivom HAA.	72
Slika 23:	Nastanek prelomov DNA v celicah HepG2 pod vplivom EPM iz govejega (A), prašičjega (B) in piščančjega (C) mesa	73

Slika 24: Nastanek dvoverižnih prelomov DNA v celicah HepG2 pod vplivom HAA	75
Slika 25: Izražanje proteinov P53 in CDKN1A v celicah HepG2 po izpostavitvi HAA določena s prenosom Western.....	81
Slika 26: Vpliv HAA na spremembo mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP) v celicah HepG2	85
Slika 27: Sprememba mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP) v celicah HepG2 po izpostavitvi ekstraktu pečenega piščančjega mesa in kombinacijam HAA	86
Slika 28: Relativna sprememba deleža živih celic HepG2 po izpostavitvi HAA	88
Slika 29: Relativna sprememba deleža živih celic HepG2 po izpostavitvi ekstraktu pečenega piščančjega mesa in kombinacijam HAA	89
Slika 30: Izražanje proteinov BAX in BCL-2 v celicah HepG2 po izpostavitvi HAA določena s prenosom Western.....	92
Slika 31: Aktivnost kspaz 3/7 v celicah HepG2 izpostavljenim HAA	96
Slika 32: Aktivnost kspaz 3/7 v celicah HepG2 izpostavljenim ekstraktu pečenega piščančjega mesa	97

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]kinoksalin
8-CH ₂ OH-Iqx	2-amino-(8-hidroksimetil)-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
AIA	aminoimidazoazareni
AhR	receptor aromatskih ogljikovodikov (iz ang. arylhydrocarbon receptor)
AMS	pospeševalna masna spektrometrija (iz ang. accelerator mass spectrometry)
Apaf-1	aktivacijski faktor 1 apoptozne proteaze (iz ang. apoptosis protease activating factor-1)
ATR	vrsta kinaz, ki se vežejo na mesto poškodb DNA (iz ang. ATM-Rad3-related)
BAK	iz ang. Bcl-2 homologous antagonist/killer
BaP	benzo(a)piren
BAX	iz ang. Bcl-2-associated X protein
BCL-2	iz ang. B-cell lymphoma-2
BER	popravljanje z izrezom baze (iz ang. base excision repair)
BID	iz ang. BH3-interacting domain death agonist
CASP	kaspaza
CDKN1A	inhibitor od ciklina odvisnih kinaz (iz. ang Cyclin-dependent kinase-inhibitor 1)
cDNA	mRNA komplementarna deoksiribonukleinska kislina (iz. ang complementary deoxyribonucleic acid)
CHK	kinaze kontrolnih točk celičnega cikla (iz ang. cell cycle checkpoint kinases)
CYP	citokrom P450
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNA-PK	od DNA odvsina proteinska kinaza (iz ang. DNA-dependent protein kinase)
DSB	dvoverižni prelomi DNA (iz ang. double strand breaks)
GME	ekstrakt pečenega mesa (iz ang. grilled meat extract)
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina

EPM	ekstrakt pečenega mesa
FBS	serum govejega zarodka (iz ang. fetal bovine serum)
GADD45 α	iz ang. growth arrest and DNA-damage-inducible protein
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (iz ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GST	glutation S-transferaza
IQ	2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-f]kinolin
IQx-8-COOH	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin-8-karboksilna kislina
JC-1	5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-karbocianin iodid
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
MMP	mitohondrijski membranski potencial
MRN	kompleks proteinov, ki zazna poškodbe DNA (iz ang. Mre11-Rad50-Nbs1)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (iz. ang messenger ribonucleic acid)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolim
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NAT	<i>N</i> -acetil transferaza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NER	popravljanje z izrezom nukleotida (iz ang. nucleotide excision repair)
PBS	fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (iz ang. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (iz ang. polymerase chain reaction)
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP)
qRT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času po reverzni transkripciji
SULT	sulfotransferaza
TNF- α	tumorje-nekrotizirajoči faktor α (iz ang. tumour necrosis factor- α)
UGT	UDP-glukuronoziltransferaza

1 UVOD

V svetovnem merilu je rak med glavnimi vzroki smrti. V letu 2008 je za posledicami rakavih obolenj umrlo 7,6 milijona ljudi (13% vseh smrti). Število umrlih za posledicami raka pa naj bi se do leta 2030 povečalo na 13,1 milijona (Globocan, 2008). Ocenjujejo, da je prehrana v 30–60% vzrok rakavih obolenj. Poleg prekomerne teže in neuravnoteženega prehranjevanja, vpliva na nastanek raka tudi uživanje karcinogenov v hrani oz. premajhno uživanje antikarcinogenov, ki delujejo preventivno – npr. antioksidanti (Doll, 1992; Dreosti, 1998).

Epidemiološke študije kažejo na povezavo med uživanjem pečenega mesa in nastankom raka debelega črevesa, trebušne slinavke, pljuč in želodca ter pri moških raka prostate, pri ženskah pa raka dojk (Alaejos in sod., 2008; Zheng in Lee, 2009). Med poznanimi karcinogeni v pečenem mesu so tudi heterociklični aromatski amini (HAA). Prvič so jih odkrili konec sedemdesetih let prejšnjega stoletja, do danes pa jih je poznanih že več kot 25 (Sugimura in sod., 1977). Najpogosteje pri pečenju mesa nastajata 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin (MeIQx), manj pogosteje pa 2-amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]kinoksalin (4,8-DiMeIQx) in 2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-f]kinolin (IQ). Na osnovi eksperimentalnih in epidemioloških študij je Mednarodna agencija za raziskave raka (International Agency for Research on Cancer - IARC) osem HAA, med njimi tudi PhIP in MeIQx, uvrstila v Skupino 2B (možno rakotvorni za ljudi), 2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]kinolin (IQ) pa v Skupino 2A (verjetno rakotvorni za ljudi) (IARC, 1993a, 1993b, 1993c).

Mutagenost oz. genotoksičnost najpogostejših HAA, predvsem PhIP in IQ, je bila doslej potrjena tako v *in vitro* bakterijskih in celičnih modelih kot tudi v *in vivo* raziskavah na živalih. Malo pa je znanega o njihovih mehanizmih delovanja in učinkih na druge celične procese (npr. zaviranje apoptoze), ki vodijo v nastanek in napredovanje raka. Pri proučevanju mutagenega oz. genotoksičnega potenciala posameznih HAA se uporabljam koncentracije, ki močno presegajo dnevni vnos pri ljudeh. Zato natančna ocena tveganja pri kronični izpostavljenosti majhnim koncentracijam HAA v zmesih

značilnih za pečeno meso ni mogoča brez poznavanja mehanizmov delovanja tako posameznih HAA, kakor tudi njihovih zmesi.

Namen doktorskega dela je razjasniti nekatere mehanizme toksičnega in genotoksičnega ter potencialno rakotvornega delovanja HAA ter ekstraktov pečenega mesa (EPM) z analitsko določeno vsebnostjo posameznih HAA. Kot modelne HAA smo izbrali PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ. EPM smo pripravili iz govejega, prašičjega in piščančjega mesa. Za raziskavo učinkov HAA in EPM na celične procese in poti povezane z nastankom in razvojem raka smo uporabili model celic človeškega hepatoma HepG2.

Postavljeni hipoteze so:

- Mutagenična aktivnost EPM v primerjavi s posameznimi HAA je v bakterijskem testnem sistemu s *Salmonella typhimurium* različna.
- HAA in EPM v izpostavljenih celicah HepG2 povzročijo prelome DNA in tvorbo mikrojeder.
- HAA in EPM v celicah HepG2 povzročijo spremembe izražanja genov, ki so vpleteni v metabolizem HAA, v odgovor celice na poškodbe DNA in v procese apoptoze.
- HAA in EPM v izpostavljenih celicah HepG2 povzročajo apoptozo.
- HAA in EPM vplivajo na celični cikel celic HepG2.
- Izpostavljenost celic HepG2 EPM povzroči drugačen celični odziv kot izpostavljenost posameznim HAA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK IN PREHRANA

Rak je skupina različnih obolenj za katere je značilna nekontrolirana rast celic, ki lahko s časom pridobije sposobnost invazije v sosednja tkiva ter razširjanja (metastaziranja) v druge dele telesa. Proces nastanka raka (karcinogeneza) ima tri stopnje: iniciacijo, rast in širjenje. Iniciacija se začne z mutacijo, ki celici omogoči prednost v razmnoževanju in posledično nastanek tumorja. Največkrat je to mutacija v onkogenih, tumor supresorskih genih in genih, ki skrbijo za popravljanje poškodb DNA. Z nadaljnjiimi mutacijami se tumor veča, posamezne tumorske celice pa se začnejo širiti po telesu (maligni tumor) (Salmon in sod., 1997; King in Robins, 2006). Karcinogeneza je počasen proces, zato je rak najpogostješi v starejši populaciji. Incidenca raka se v populaciji 70- in večletnikov poveča za 30% (Dreosti, 1998). Kljub temu, da poznamo več kot 200 tipov raka, je potrebnih šest bistvenih sprememb v delovanju celice za nastanek malignega tumorja (Hanahan in Weinberg, 2011): samozadostnost rastnih signalov, neobčutljivost za protirastne signale, izognitev programirani celični smrti ali apoptozi, sposobnost neomejenega razmnoževanja, tvorba novih žil ali angiogeneza in invazija tumorskih celic – nastanek metastaz.

Poleg genetske predispozicije (podedovane mutacije, hormonsko neravnovesje) ima velik vpliv na nastanek in razvoj rakavih obolenj tudi okolje in način življenja posameznika (King in Robins, 2006; Anand in sod., 2008). Ljudje smo dnevno izpostavljeni škodljivim snovem med katerimi so številne rakotvorne. Do danes so odkrili okoli 450 različnih kemijskih spojin, ki so potrjeno ali pričakovano rakotvorne za ljudi (Agents classified ..., 2013). Epidemiološke študije kažejo, da je nezdrav način življenja, kot so kajenje, uživanje alkohola, prekomerna telesna teža in prehrana, glavni vzrok za nastanek raka. Rakotvorne snovi v hrani so lahko naravnega izvora (npr. alfatoksini iz gliv *Aspergillus parasiticus* in *A. flavescens*) ali pa so posledica kontaminacije, pridelave in predelave hrane, npr. pesticidi, dioksini, ... (Sutandyo, 2010). Tudi pri pripravi hrane lahko nastanejo različne zdravju škodljive snovi. Pri cvrtju ali pečenju hrane bogate z ogljikovimi hidrati nastaja akrilamid, pri pečenju

beljakovinsko bogate hrane (meso) pa policiklični aromatski ogljikovodiki – PAH, nitrozoamini in heterociklični aromatski amini (Jägerstad in Skog, 2005). Naštete rakotvorne snovi spadajo v skupino t.i. genotoksičnih karcinogenov ali tumorskih iniciatorjev, ki poškodujejo DNA. Druga skupina so negenotoksični karcinogeni ali tumorski promotorji, ki vplivajo na različne celične procese ter tako spodbujajo nastanek raka. Nasičene maščobne kisline lahko vplivajo na imunski sistem organizma tako, da le-ta ne prepozna več okvarjenih celic (King in Robins, 2006; Anand in sod., 2008; Sutandyo, 2010).

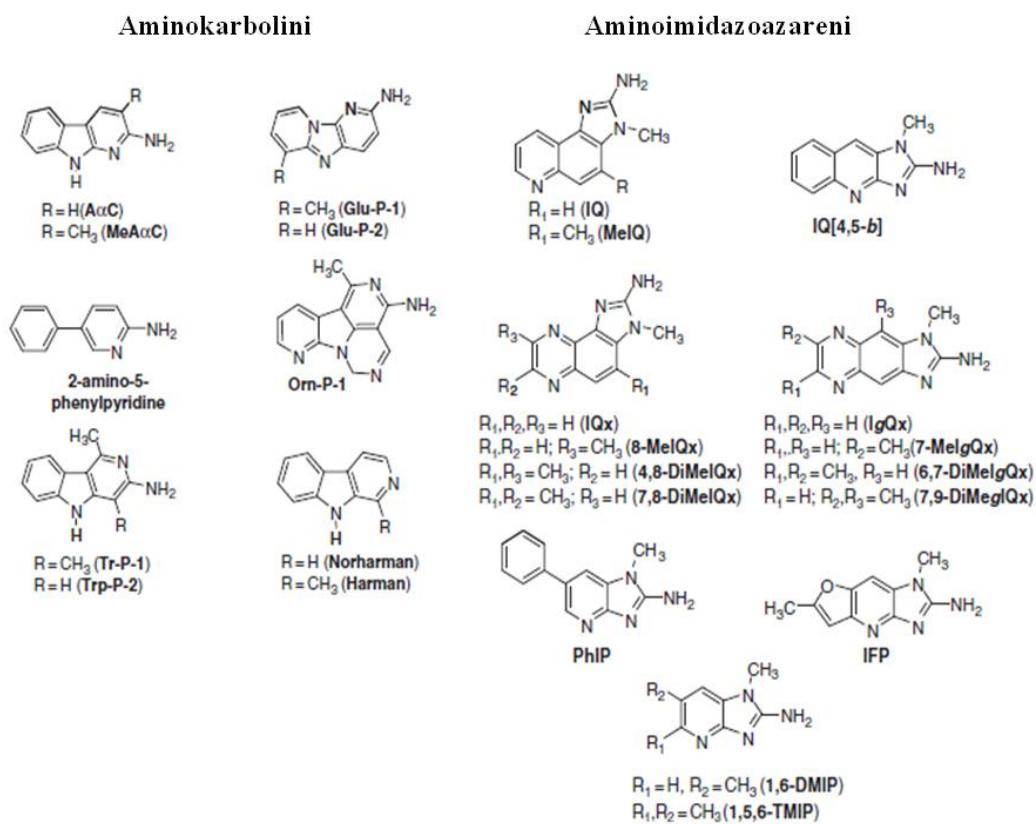
2.2 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI

Termična obdelava mesa ima veliko pozitivnih učinkov. Meso se pri tem zmehča, poveča se mu kalorična vsebnost in uniči se večino patogenih mikroorganizmov (Wrangham in Conklin-Brittain, 2003). Vendar pa pri visokih temperaturah pečenja lahko nastajajo snovi, ki so potencialno rakotvorne. Skupina takih mutagenov so heterociklični aromatski amini (HAA), ki so jih prvič odkrili leta 1977 Sugimiura in sod. (1977) v na žaru pečeni govedini in ribah. S testom povratnih mutacij (Ames test) so dokazali njihovo visoko mutagenost (Nagao in sod., 1977; Sugimura in sod., 1977). Do danes poznamo že več kot 25 različnih HAA. Poleg pečenega mesa, mnoge HAA najdemo tudi v cigaretinem dimu, izpušnih plinih, pivu in vinu (Manabe in sod., 1993b; Turesky, 2005). V termično neobdelani hrani jih skoraj ni, zelo malo jih najdemo v drugih živilih, ki so vir beljakovin – jajca, mleko, notranji organi (npr. jetra, ...) (Sutandyo, 2010).

2.2.1 Struktura in nastanek HAA

Strukturno so si HAA podobni, sestavljeni so iz dveh ali treh heterocikličnih obročev. Večina jih ima na enega od obročev vezano amino skupino, izjema so β -karbolini (harman in norharman) (Slika 1) (Jägerstad in sod., 1998). HAA delimo v dve skupini, glede na temperaturo pri kateri nastanejo. Pri temperaturah višjih od 300 °C nastajajo

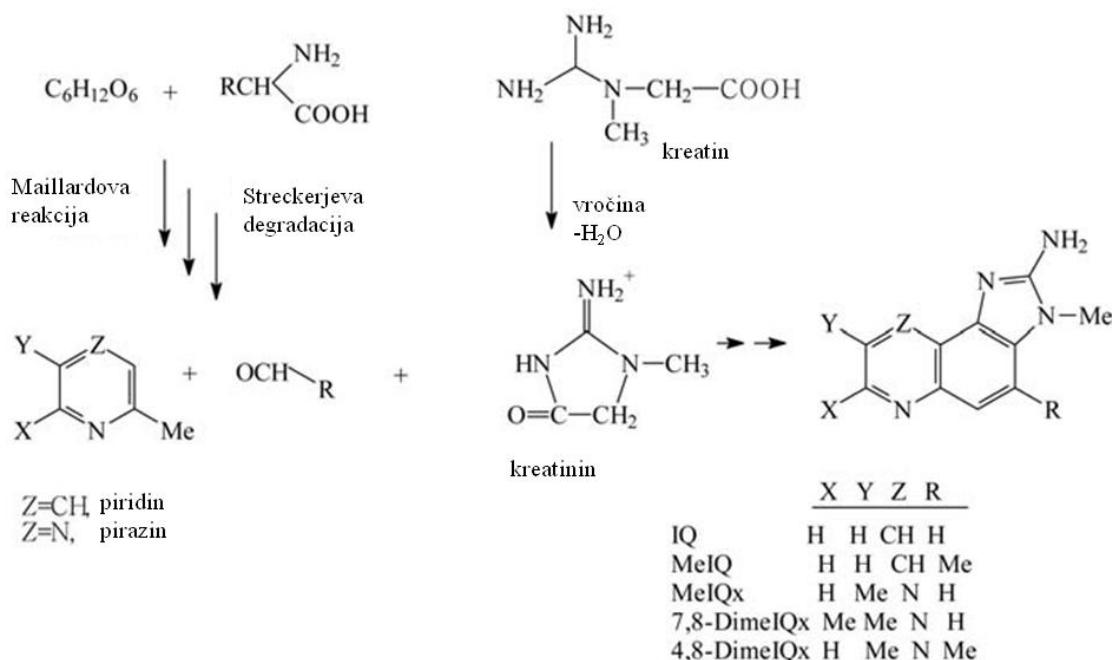
aminokarbolini ali pirolizni HAA (Sugimura, 1986; Wakabayashi in sod., 1997), pri nižjih temperaturah pa aminoimidazoazareni (AIA) (Furihata in Matsushima, 1986).



Slika 1: Strukturne formule glavnih aminokarbolinov in aminoimidazoazarenov
 (prirejeno po Turesky, 2010).

Aminokarbolini nastajajo s pirolizo posameznih aminokislin iz beljakovin živalskega ali rastlinskega izvora, kot so albumin, kazein in sojin globulin (Sugimura in sod., 1977). Pri visokih temperaturah aminokisline razpadejo na številne reaktivne fragmente, ki nato kondezirajo in tvorijo aminokarboline. Njihova sinteza ni odvisna od prekurzorjev kreatina oz. kreatinina, zato jih lahko najdemo tudi v hrani rastlinskega izvora (Wakabayashi in sod., 1992; Johansson in sod., 1995a; Sugimura, 1997). Aminokarbolini se pri običajnem pečenju mesa pojavljajo v zelo majhnih koncentracijah (Cheng in sod., 2006).

Aminoimidazoazareni (AIA) nastajajo pri temperaturah običajnih pri pripravi mesa (100–300 °C) (Hatch in sod., 1988). Vsi vsebujejo imidazolski obroč z vezano amino skupino in na dušikov atom imidazolskega obroča vezano metilno skupino. Delimo jih na tri podskupine: imidazokinolini (npr. IQ in MeIQ (2-amino-3,4-dimetil-3H-imidazo[4,5-f]kinolin)), imidazokinoksalini (npr. MeIQx in 4,8-DiMeIQx) ter imidazopiridini (npr. PhIP). AIA nastanejo iz produktov Maillardove reakcije in Streckerjeve degradacije iz aminokislin in ogljikovih hidratov (heksoz). Nastanejo piridinski in pirazinski obroči ter t.i. Stecknerjevi aldehydi, ki povežejo obroče skupaj s kreatininom (aldolska kondenzacija) (Slika 2). Amino-imidazolski del molekule (kreatinin) nastane s ciklizacijo in odcepitvijo vode od kreatina (Skog, 1993; Lee in sod., 1994). Pearson in sod. (1992) so predlagali drugo pot nastanka imidazokinolinov in imidazoksalinov preko prostih alkilpiridinskih oz. diakilpirazinskih radikalov, ki se povežejo s kreatininom.



Slika 2: Nastanek imidazokinolinov in imidazokinoksalinov (prirejeno po Cheng in sod., 2006)

2.2.2 Vsebnost HAA v mesu

Heterociklični aromatski amini nastajajo pri pečenju vseh vrst mesa (skeletnih mišic). V splošnem najmanj HAA nastane pri pečenju rib. Slednje naj bi bilo posledica večje vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin v ribjem mesu, ki naj bi zmanševale število prostih radikalov – intermediatov pomembnih pri nastajanju HAA (Pais in sod., 1999). HAA najdemo tudi v dimljenih mesnih izdelkih (Kato in sod., 1986; Kikugawa in sod., 1986; Jägerstad in sod., 1998). Večina HAA je v skorji pečenega mesa, medtem ko jih v sredici ni ali pa so prisotni le v sledovih. Najbolj pogost je PhIP (0–500 ng/g mesa, v povprečju nekaj 10 ng/g mesa), sledi mu MeIQx v enakih ali pol manjših koncentracijah. Ostali HAA, kot npr. IQ, IQx, 4,8-DiMeIQx in MeIQ (2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin), so pod mejo zaznavnosti oz. se v mesu pojavljajo v manjših koncentracijah (do 10 ng/g mesa) (Jägerstad in sod., 1998). Vsebnost in delež posameznih HAA naj bi bil odvisen od vrste mesa. Tako so odkrili zelo majhne koncentracije PhIP pri pečenju rdečega mesa (govejega in prašičjega mesa), v katerem naj bi bil najpogostejši MeIQx (Sinha in sod., 1998a, 1998b; Pais in sod., 1999). V ribjem mesu naj bi nastajalo največ IQ in MeIQ (Cheng in sod., 2006). Nasprotno pa naj bi piščanče meso vsebovalo večje koncentracije PhIP od imidazokinoksalinov (MeIQx in 4,8-DiMeIQx) (Knize in sod., 1997a, 1997b). Vendar pa bolj kot vrsta mesa vplivajo na vsebnost HAA temperatura in čas pečenja, vsebnost vode v mesu ter način priprave mesa (dodatki v mesu in mesnih izdelkih, mariniranje, ...). Zato se lahko koncentracija posameznih HAA pri pripravi istih jedi razlikuje tudi do 100-krat (Jägerstad in sod., 1998).

Temperatura naj bi imela večji vpliv na količino nastalih HAA kakor pa čas pečenja. Vsebnost HAA se povečuje z višanjem temperature, nastane tudi več različnih HAA (Johansson, 1995; Skog in sod., 1997; Abdulkarim in Smith, 1998). Največ HAA nastane pri kratki izpostavitvi mesa vročini (npr. cvrtju ali žaru). Skog in sod. (1998) navajajo, da se v primerjavi z direktnim pečenjem na plošči, pri pečenju v pečici vsebnost HAA v mesu zmanjša zaradi slabšega prenosa toplote v zraku. S podaljševanjem časa pečenja ne nastaja vedno več HAA (Arvidsson in sod., 1997), pri temperaturah višjih od 225 °C lahko pride celo do razpada HAA.

(aminoimidazoazarenov). Tako sta Jackson in Hargraves (1995) v modelnem sistemu opazila zmanjšanje koncentracije MeIQx in 4,8-DiMeIQx že po 15 min segrevanja pri 225 °C in 250 °C. HAA nastajajo tudi pri nižjih temperaturah, če je čas trajanja obdelave mesa podaljšan. Dokazali so jih v ribjem mesu dimljenem pri 80–85 °C (Kato in sod., 1986; Kikugawa in sod., 1986; Johansson in Jägerstad, 1994) ter pri nižji temperaturi v modelnih sistemih (Manabe in sod., 1992; Manabe in sod., 1993a).

V mesu je delež vode od 70 do 75 %. Pri pečenju mesa se, odvisno od načina segrevanja in temperature v sredici, vsebnost vode zmanjšuje zaradi evaporacije in izcejanja (Palka, 2004). Voda ni potrebna za nastanek HAA, se pa med pečenjem v vodi topni prekurzorji, pomembni za njihov nastanek, pomikajo proti površini mesa, kjer nastajajo HAA (Kikugawa, 2004). S preprečevanjem izgube vode lahko zmanjšamo vsebnost HAA. Mutagenost pečenega mesa se je zmanjšala, če so mu dodali sojine proteine ali škrob, saj so le-ti nase vezali vodo (Wang in sod., 1982; Skog in sod., 1992). Felton in sod. (1994) so dokazali, da segrevanje mesa v mikrovalovni pečici pred peko zmanjša vsebnost HAA, saj se zmanjša količina prekurzorjev, ki se izcedijo z mesnim sokom.

Vpliv maščob na nastanek HAA je nejasen. Dodatek maščob naj bi povečal nastanek HAA, ker maščobe dobro prevajajo toploto (Springarn in sod., 1981; Holtz in sod., 1985). Oksidacija maščob povzroči nastanek prostih radikalov, aldehidov ter piridinskih in pirazinskih obročev, ki so lahko prekurzorji v reakcijah nastanka HAA (Arnoldi in sod., 1990). Obstajajo raziskave, ki kažejo, da maščobne kisline ne vplivajo na nastanek HAA oz. ga celo zavirajo (Knize in sod., 1985; Johansson in sod., 1993; Johansson in sod., 1995b).

Na vsebnost HAA pri pečenju mesa vplivajo tudi različni načini priprave mesa pred peko. V mletem mesu naj bi med pečenjem nastajalo manj HAA, saj se mesni sok, v katerem so prekurzorji za nastanek HAA, hitreje izcea iz mesa (Skog in sod., 1998). Mariniranje mesa lahko zmanjša količino nastalih HAA (Tikkanen in sod., 1996). Rastlinski flavonoidi, karotenoidi in klorofil zmanjšujejo nastanek HAA tako v mesu kot v modelnih sistemih (Edenharder in sod., 1999; Kikugawa, 1999). Začimbe, ki se pogosto uporabljajo pri pripravi mesa (timijan, rožmarin, majaron, česen) tudi zavirajo

nastanek HAA v mesu (Murkovic in sod., 1998; Vitaglione in Fogliano, 2004). Zmanjšanje količine HAA v mariniranem mesu je posledica antioksidantov v marinadah. Podobno delujejo prehranski dodatki, kot npr. askorbinska kislina, bisulfiti, nitriti, citrati in vitamin E (Chen in sod., 1992).

2.2.3 Izpostavljenost ljudi HAA

Izpostavljenost posameznika oz. skupin ljudi HAA je odvisna od njihovih prehranskih navad. Povprečen vnos HAA so določili na podlagi vprašalnikov o prehrani in količini zaužitega pečenega mesa ter vsebnosti HAA v njem. V Nemčiji je ocena dnevnega vnosa HAA med 0,8 µg do 8,4 µg na osebo. V podobnih raziskavah drugih držav je dnevni vnos od nekaj ng do 2 µg (Skog in sod., 1998). Vnosi so bistveno manjši, kot pa je akutna toksičnost HAA. LD₅₀ 4,8-DiMeIQx in 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indola (Trp-P-1) v miših je 75 mg/kg oz. 200 mg/kg (Tucker in sod., 1989; Shibamoto in Bjeldanes, 2009).

Koliko zaužitih HAA dejansko pride v telo posameznika in tam ostane ni povsem znano. Absorpcijo v telo ocenjujejo na podlagi razlike med zaužitimi HAA in koncentracijo HAA in njihovih metabolitov v urinu. Tako so prostovoljci, po zaužitju 70 do 84 µg PhIP, le-tega izločili v obliki metabolitov v obsegu 50 do 90% začetne doze že v prvih 24 urah (Malfatti in sod., 1999). Podobno so dokazali pri podganah in miših po zaužitju PhIP in IQ (Turteltaub in sod., 1989; Watkins in sod., 1991). Koncentracija HAA v telesu se razlikuje med posamezniki zaradi njihove različne prebave oz. metabolizma ter sposobnosti izločanja nevarnih snovi.

In vivo raziskave na ljudeh in živalih kažejo, da se HAA skoraj popolnoma absorbirajo v prebavnem traktu. Vendar pa je pomembno poudariti, da te raziskave temeljijo na zaužitju kapsul s HAA. Dejanska absorpcija HAA v telo po zaužitju pečenega mesa je manjša, kot je količina nastalih HAA v mesu. Pri prostovoljcih, ki so zaužili 200 g pečenega mesa, je bilo po 24 urah izloženega med 4 in 53% PhIP (Kulp in sod., 2000). Z *in vitro* modelom, ki so ga razvili Kulp in sod. (2003) in ponazarja prebavni trakt

človeka so opazovali sproščanje HAA (MeIQx, 4,8-DiMeIQx in PhIP) iz pečenega mesa. Ugotovili so, da se zaradi delovanja prebavnih encimov iz pečenega mesa sprosti med 40 in 60% HAA. Velikost delcev mesa, torej mehanska prebava, ne vpliva na sproščanje in dostopnost HAA v prebavnem traktu. Le sproščanje PhIP je bilo večje pri manjših delcih, kar razlagajo z njegovo manjšo polarnostjo v primerjavi z ostalimi HAA v raziskavi. Zanimivo je, da se z zapečenostjo mesa sproščanje HAA zmanjša, zaradi večje koagulacije mesnih proteinov, ki preprečijo raztapljanje oz. sproščanje HAA. Sjödin in sod. (1985) so dokazali, da vlaknine v hrani lahko vežejo HAA. Dokazali so tudi vezavo HAA na celične stene črevesnih bakterij, kar zmanjša absorpcijo HAA v celice črevesne stene in posledično v krvni obtok (Bolognani in sod., 1997; Turbic in sod., 2002).

Absorpcija HAA iz prebavnega trakta in prenos v druge organe je zelo hitra. Že po uri in pol po hranjenju miši so radioaktivno označen PhIP odkrili v črevesju, želodcu, adipoznem tkivu, jetrih, ledvicah, trebušni slinavki, pljučih in vranici (Turteltaub in sod., 1992). Koncentracije HAA v posameznih organih se s časoma hitro spreminja. Najdlje se HAA zadržijo v jetrih in ledvicah (Bergman, 1985; Watkins in sod., 1991; Tjøtta in sod., 1992; Dragsted in sod., 1995). HAA lahko prehajajo krvno-placentalno bariero in vplivajo na zarodek (Brittebo in sod., 1994; Hasegawa in sod., 1995).

2.3 MEHANIZNI DELOVANJA HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV

2.3.1 Metabolizem HAA

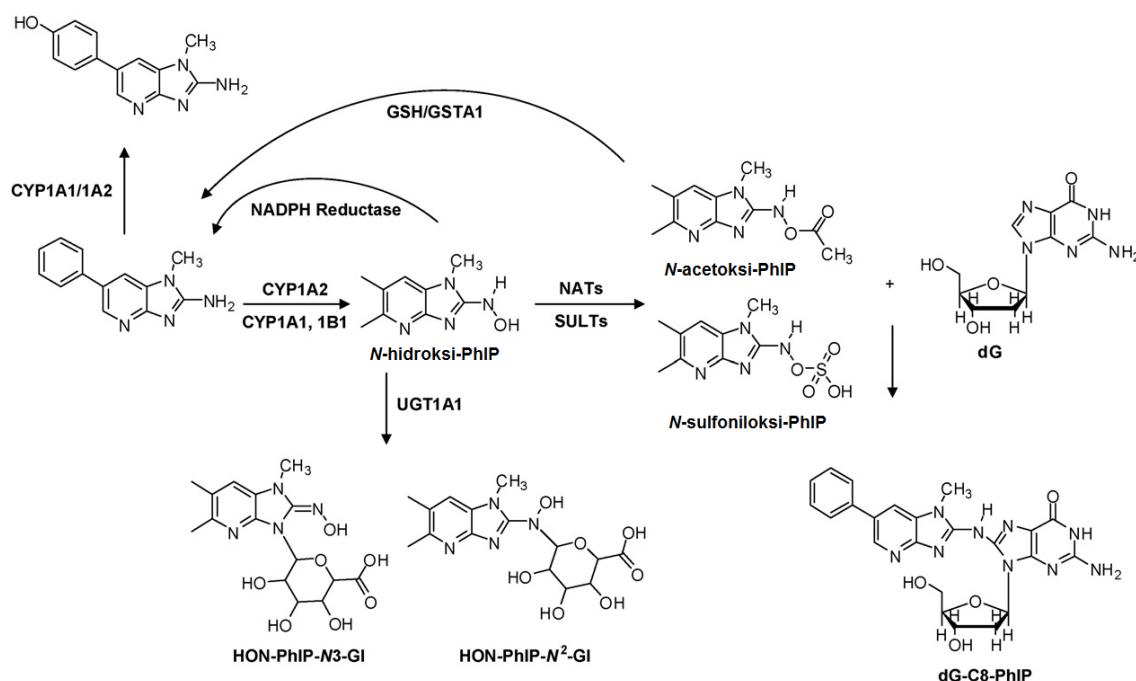
Glavni presnovni organ HAA, tako kot za večino drugih ksenobiotikov, so jetra. HAA so indirektni mutageni. Biološko aktivni postanejo po metabolni aktivaciji. Bioaktivacija HAA poteče v dveh stopnjah. V I. stopnji metabolizma pride do oksidacije HAA s citokromi P450. Nastanejo reaktivni metaboliti, ki se lahko vežejo na DNA ali pa poteče II. stopnja metabolizma: acetilacija in sulfonacija ali sulfatacija ter

nastanek nukleofilnih metabolitov, ki se vežejo na DNA oz. glukuronidacija, ki je pot detoksifikacije HAA (Turesky, 2007).

Prva stopnja metabolizma HAA poteče s hidroksilacijo amino skupine katero katalizirajo encimi citokromi P450 1A1 (CYP1A1), 1A2 (CYP1A2) in 1B1 (CYP1B1). Nastanejo reaktivni *N*-hidroksi-HAA metaboliti. V jetrih oksidacijo HAA katalizira predvsem CYP1A2 in CYP1A1 (Nebert in sod., 2004). Boobis in sod. (1994) so odkrili, da je CYP1A2 metaboliziral 91% MeIQx in 70% PhIP zaužitih s pečenim mesom. CYP1A2 predstavlja 15% vseh citokromov P450 v jetrih (Guengerich in Turvy, 1991). CYP1A2 v človeških jetrih je regioselektiven in katalizira predvsem *N*-oksidacijo HAA (IQ, MeIQx in PhIP). V jetrih glodavcev je glavna pot metabolizma in detoksifikacije IQ, MeIQx in PhIP s CYP1A2 katalizirana oksidacija obročev – detoksifikacija (Sjödin in sod., 1989). Pri poskusnih živalih so odkrili tudi oksidacijo N-metilne skupine IQ in MeIQx (Snyderwine in sod., 1997; Stillwell in sod., 1997), ki pa je pri ljudeh ne najdemo. CYP1A2 pri ljudeh oksidira C8-metilno skupino MeIQx v alkohol, 2-amino-(8-hidroksimetil)-3-metilimidazo[4,5-*f*]kinoksalin (8-CH₂OH-Iqx), ter ga nato spremni v 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]kinoksalin-8-karboksilno kislino (IQx-8-COOH) (Langouët in sod., 2001). Nastanek karboksilne kisline naj bi bila glavna pot detoksifikacije MeIQx pri ljudeh (Gu in sod., 2010). CYP1A2 in CYP1A1 glodavcev poleg hidroksilacije amino skupine PhIP, oksidirata tudi C4 atom aromatskega obroča (C4-hidroksilacija) (Turesky in sod., 1998a). Lanfouët in sod. (2002) so odkrili C4-hidroksilacijo PhIP tudi v humanih hepatocitih, vendar pa le-ta naj ne bi bila katalizirana s citokromi P450. HAA lahko aktivira tudi citokrom P450 3A4, vendar v precej manjši meri kot CYP1A1, CYP1A2 in CYP1B1 (Shimada in Guengerich, 1991; Yamazaki in sod., 1995).

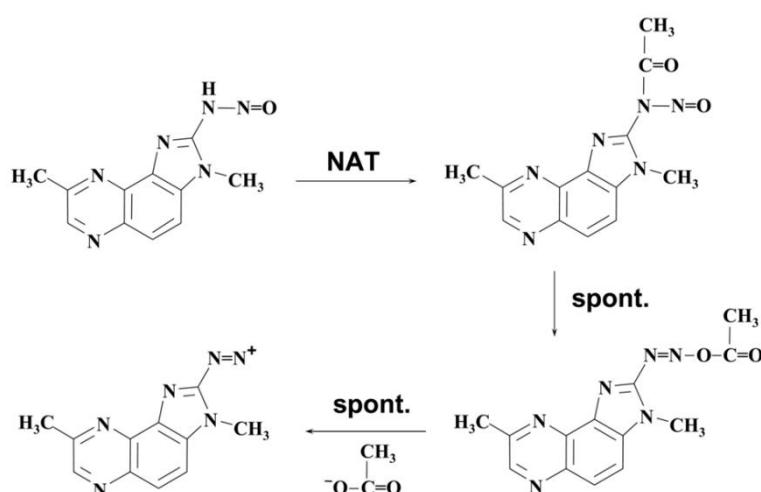
Encimi II. stopnje metabolizma HAA so ključni encimi, ki privedejo do genotoksičnega delovanja HAA. *N*-acetiltransferaze (NATs) katalizirajo *O*-acetilacijo *N*-hidroksi-HAA metabolitov I. stopnje metabolizma. Nastanejo *N*-acetoksi-HAA produkti, ki so nestabilni, tvori se arilnitrenijev ion, ki se kovalentno veže na DNA. V jetrih je aktivna predvsem NAT2, v drugih tkivih pa NAT1. Za oba encima so odkrili več kot 25 genskih polimorfizmov, kar ima za posledico različno katalitsko aktivnost NATs (Hein in sod.,

2000; Hein, 2002). Sulfotransferaze (SULTs) katalizirajo nastanek sulfatnih in sulfoniloksi estrov iz *N*-hidroksi-HAA. Nastali estri so zelo reaktivni, pride do nastanka arilnitrenijevih ionov, ki se vežejo na DNA (Turesky in sod., 1991; Schut in Snyderwine, 1999). Ozawa in sod. (1995) so dokazali detoksifikacijo IQ in MeIQx preko nastanka sulfamatov, ki jo katalizira SULT1A1. Vendar pa pri ljudeh nastanek sulfamatov predstavlja zanemarljiv delež metabolizma HAA.



Slika 3: Glavne metabolne PhIP v poskusnih živalih in pri ljudeh (prirejeno po Turesky, 2007).

V izvenhepatičnih tkivih lahko pride do oksidacije HAA, ki jo katalizirajo peroksidaze. Dušikov oksid (NO), ki se pojavlja v tkivih pri vnetjih, lahko reagira s kisikom oz. superoksidnim anionom ter tvori reaktivne dušikove zvrsti (iz ang. reactive nitrogen oxide species – RNOS,), kot so peroksinitrini anion (ONOO^-), dušikov dioksid (NO_2) in didušikov trioksid (N_2O_3). RNOS lahko reargrirajo s HAA. Dokazali so nastanek *N*-nitrozo-IQ (2-nitro-3-metilimidazo[4,5-*f*]kinolin; *N*-NO-IQ) in *N*-nitrozo-MeIQx (2-nitro-3-metilimidazo[4,5-*f*]kinolin; *N*-NO-MeIQx). V metabolizem *N*-nitrozo-HAA so vpletene tudi NATs (Slika 4) (Lakshmi in sod., 2002; Zenser in sod., 2009).



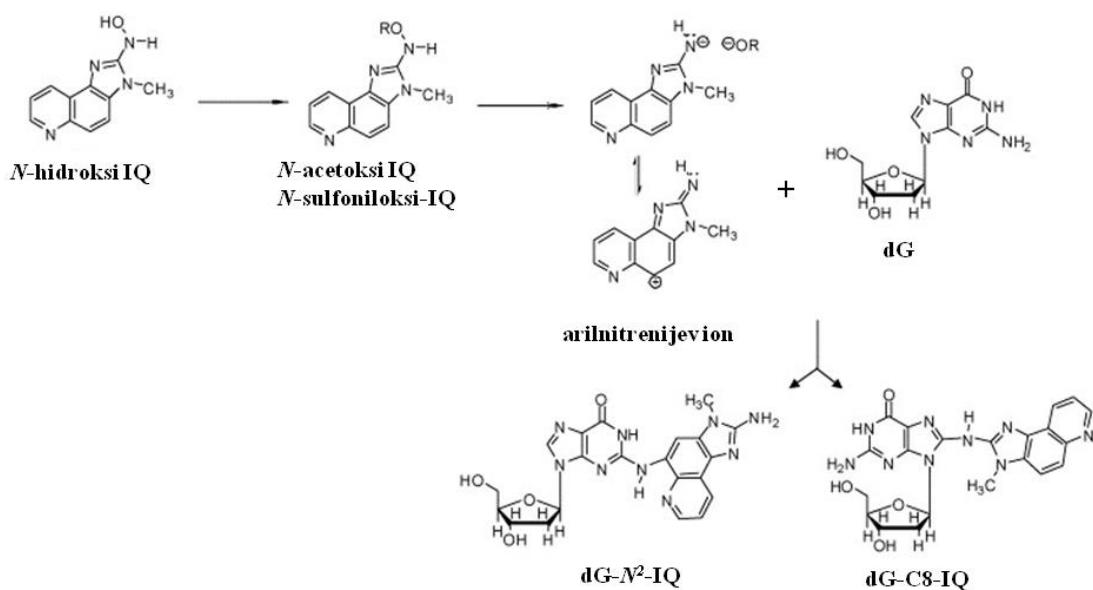
Slika 4: Mehanizem bioaktivacije N-NO-MeIQx (prirejeno po Zenser in sod., 2009)

Glukuronidacija je glavna pot detoksifikacije HAA. Katalizira jo družina UDP-glukuronoziltransferaz 1A (UGT1A) tako, da vežejo glukuronsko kislino bodisi na amino skupino HAA bodisi na dušikov atom imidazolskega obroča *N*-hidroksi-HAA (Alexander in sod., 1991; Styczynski in sod., 1993; Kaderlik in sod., 1994b; Green in Tephly, 1998). Pri glodavcih in primatih so opazili tudi *O*-glukuronid metabolite, ki nastanejo iz na obroču oksidiranih HAA (Snyderwine in sod., 1997). Produkti glukuronidacije se izločajo skozi urin ali žolč (Alexander in sod., 1991; Snyderwine in sod., 1997; Gu in sod., 2010).

Druga pot detoksifikacije HAA je konjugacija reaktivnih metabolitov z glutationom bodisi spontano bodisi reakcijo katalizirajo glutation S-transferaze (GSTs) (Coles in sod., 1990). Kaderlik in sod. (1994a) so odkrili povečano nastajanje PhIP-DNA aduktov v primarnih humanih hepatocitih pri zmanjšanem nivoju glutationa. Podobno sta Loretz in Pariza (1984) odkrila povečano nastajanje IQ-DNA aduktov v podganjih hepatocitih. MeIQx in IQ oz. njuni reaktivni metaboliti naj ne bi bili substrati za glutation S-transferaze (Coles in sod., 1990; Lin in sod., 1994; Nelson in sod., 2001), medtem ko sta hidroksi- in acetoksi-PhIP substrata predvsem za GSTA1-1, GSTA1-2 in GSTP1-1 (Lin in sod., 1994; Coles in sod., 2001).

2.3.2 Poškodbe DNA

HAA so indirektni mutageni. Po aktivaciji z encimi I. stopnje metabolizma nastanejo *N*-hidroksi-HAA metaboliti, ki se lahko vežejo na DNA. Večina pa se pretvori naprej z encimi II. stopnje metabolizma v *N*-acetoksi oz. *N*-sulfoniloksi estre, pa tudi v *N*-proliloksi in *N*-fosfatil estre, ki so razmeroma nestabilni. Z izgubo estrske skupine nastanejo zelo reaktivni elektrofilni arilnitrenijevi ioni, ki se kovalentno vežejo na DNA (Slika 5). Tako nastajajo HAA-DNA adukti, ki so vzrok za mutagenost HAA (Slika 6) (Kerdar in sod., 1993; Schut in Snyderwine, 1999).



Slika 5: Metabolna aktivacija HAA in nastanek arilnitrenijevega iona na primeru IQ
(prirejeno po Schut in Snyderwine, 1999).

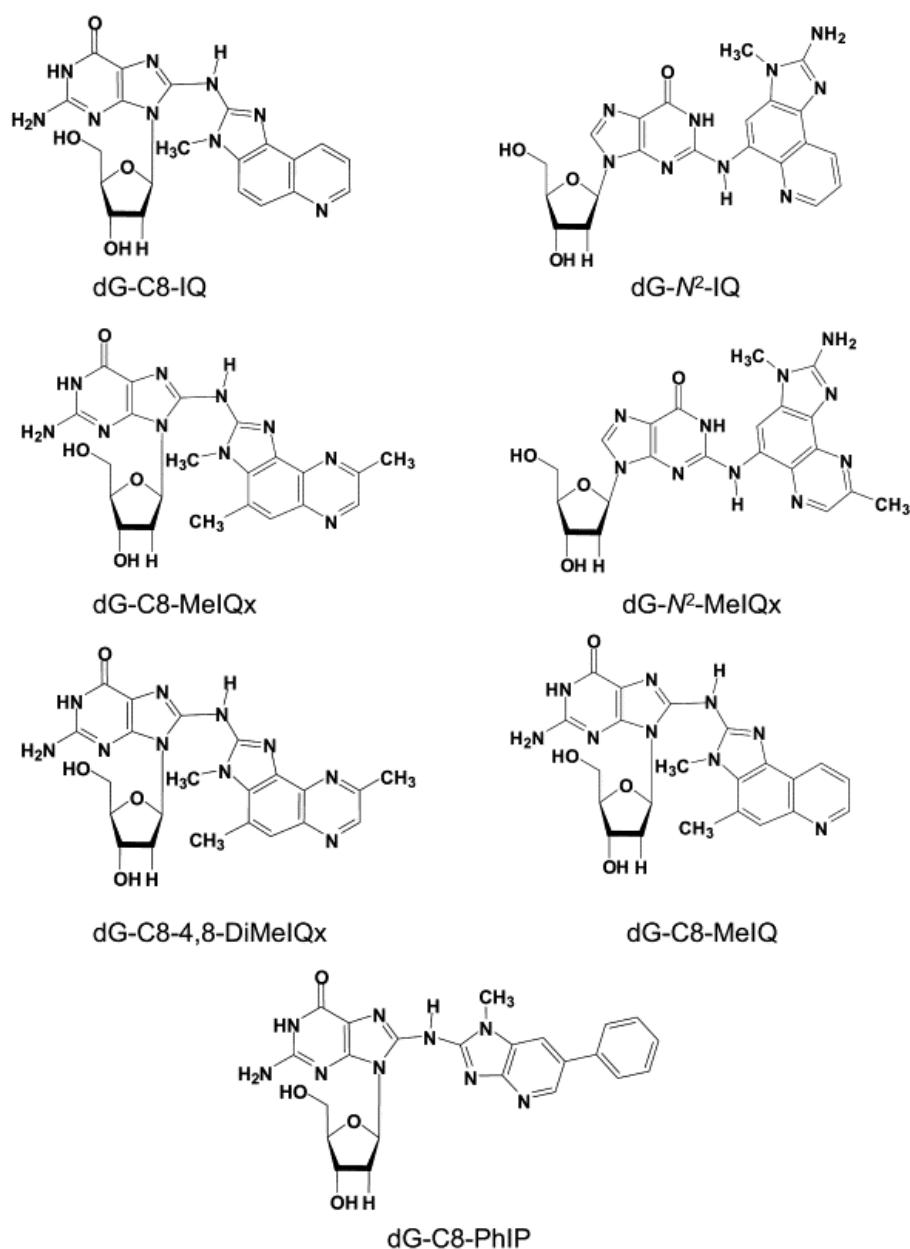
Večina HAA-DNA aduktov nastane z vezjo med ogljikovim atomom na C8 mestu deoksigvanozina in eksociklično amino skupino HAA (Schut in Snyderwine, 1999). MeIQx in IQ tvorita adukte tudi preko vezi med ogljikovim atomom na C5 mestu heterocikličnega obroča in amino skupino deoksigvanozina ali deoksiadenozina (Turesky in Vouros, 2004). Slednje nakazuje, da pri metabolni aktivaciji MeIQx in IQ, poleg arilnitrenijevega iona, nastane tudi karbenov ion (Turesky in sod., 1992).

DiMeIQ tvori DNA adukte tudi na C2 mestu deoksigvanozina (Frandsen in sod., 1994a).

Lightfoot in sod. (2000) so s pospeševalno masno spektrometrijo (iz ang. accelerator mass spectrometry – AMS) merili število nastalih PhIP-DNA aduktov v bolnicah z rakom dojke 4 do 6 ur po zaužitju 20 µg [¹⁴C] PhIP v kaspuli. Pri primerjavi števila PhIP-DNA aduktov med zdravim in rakavim tkivom niso opazili razlik. Število PhIP-DNA aduktov so ocenili med 46 in 423 aduktov/ 10^{12} nukleotidov v zdravem tkivu in med 26 ter 477 aduktov/ 10^{12} nukleotidov v rakavem tkivu. Nasprotno so Dingley in sod. (1999) odkrili razliko v številu PhIP-DNA aduktov med zdravim (35–135 PhIP-DNA aduktov/ 10^{12} nukleotidov) in rakavim (83–308 aduktov/ 10^{12} nukleotidov) tkivom debelega črevesa pri bolnikih, ki so zaužili 70 oz. 84 µg [¹⁴C] PhIP 48 oz. 72 ur pred posegom. Večje število PhIP-DNA aduktov v rakavem tkivu pojasnjujejo s povečano metabolno aktivacijo PhIP oz. njegovo zmanjšano detoksifikacijo ter okvarjenimi mehanizmi popravljanja DNA v rakavem tkivu.

Konformacijske spremembe DNA, ki jih povzročijo HAA-DNA adukti, naj bi določale biološko aktivnost aduktov, kot je premik bralnega okvirja ali zamenjava baznih parov med podvojevanjem oz. popravljanjem poškodb DNA (Hoffmann in Fuchs, 1997; Broyde in sod., 2007). HAA-DNA adukti se odstranjujejo z izrezovanjem nukelotidov (iz ang. nucleotide excision repair) (Bendaly in sod., 2007). Strukturne konformacije HAA-DNA aduktov vplivajo na obstojnost aduktov in sposobnost popravljalnih encimov odstranjevanja le-teh. HAA-DNA adukti v *sin* konformaciji se hitreje odstranjujejo kakor tisti v *anti* konformaciji (Turesky in sod., 1997).

HAA-DNA adukti lahko povzročajo prelome DNA (Benigni in Bossa, 2011). V človeških tkivih se v povprečju pri enakih uporabljenih koncentracijah HAA tvori višje število HAA-DNA aduktov kot pri glodavcih, kar je najverjetneje posledica razlik v metabolizmu (Turesky, 2005; Turesky, 2007) – podrobnejše razloženo v poglavju 2.4.



Slika 6: Kemijske strukture nekaterih HAA-DNA aduktov (prirejeno po Turesky in Vouros, 2004)

2.3.3 Mutagenost in genotoksičnost HAA

Mutageni potencial HAA izvira iz njihove sposobnosti tvorjenja DNA aduktov ter posledično konformacijskih sprememb DNA (Hoffmann in Fuchs, 1997; Delaney in Essigmann, 2007). V bakterijskih testnih sistemih s *Salmonella typhimurium* HAA povzročajo pretežno mutacije s premikom bralnega okvirja, manj pa točkovne mutacije

(Choi in sod., 2006). Malfati in sod. (1995) so dokazali, da je potrebnih približno 25 HAA-DNA aduktov za nastanek mutacije v sevu *S. typhimurium* TA98. Visok potencial HAA za premik bralnega okvirja izvira iz delecije GC baznega para, saj večina HAA-DNA aduktov nastane na deoksigvanozinu (Shibutani in sod., 1999; Choi in sod., 2006). Koch in sod. (1998) so dokazali, da PhIP povzroči zamenjavo GC baznega para z AT baznim parom oz. TA. Med posameznimi HAA obstajajo velike razlike v mutagenem potencialu. Pri Ames testu so se MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx in IQ izkazali kot eni izmed najmočnejših mutagenov. Nasprotno pa je mutageni potencial PhIP in AαC (2-amino-9H-pirido[2,3-*b*]indole) 100 oz. 1000-krat nižji (Felton in Knize, 1991; Sugimura in sod., 2004). Na mutageni potencial HAA vpliva njihova kemijska struktura. Pri aminokarbolinih so to mesto dušikovega atoma in vezana amino funkcionalna skupina na piridinski obroč ter mesto vezane metilne funkcionalne skupine na molekulo (Hatch in sod., 1991). Tako β-karbolini ne kažejo mutagenih učinkov v Ames testu, kar naj bi bila posledica manjkajoče amino skupine (Hatch, 1986; Cheng in sod., 2006). Na mutageni potencial AIA pa vpliva število obročev, število dušikovih atomov v obročih, metilna skupina vezana na enega izmed dušikovih atomov imidazolskega obroča in število ter mesto vezave metilnih skupin na ostale obroče molekule AIA. Kemijska struktura HAA vpliva na stabilnost bioaktiviranih HAA, različne funkcionalne skupine vezane na obroče pa lahko zavirajo izrezovanje HAA-DNA aduktov ali pa onemogočijo delovanje encimov vpletenih v detoksifikacijo (Hatch in sod., 1991; Hatch in sod., 1996).

Mutageni potencial HAA v sesalskih testnih sistemih je nižji, razlike v mutagenem potencialu med posameznimi HAA pa so manjše v primerjavi z razlikami določenimi z bakterijskimi testnimi sistemi (Thompson in sod., 1987; Gooperham in sod., 2001; Turesky, 2010). Nižja biološka aktivnost HAA v *in vitro* sesalskih testih v primerjavi z bakterijskimi je posledica različne ekso- in endogene metabolne aktivacije HAA, razlik v popravljanju poškodb DNA in razlik v mestu nastanka DNA aduktov oz. mutacij (Turesky, 2007). HAA v sesalskih celicah za razliko od bakterijskih povzročajo zamenjavo baznih parov, redko pa pride do premika bralnega okvirja (Schut in Snyderwine, 1999). PhIP in IQ povzročata predvsem zamenjavo GC baznega para s TA, pa tudi zamenjavo AT baznega para v TA, CG v AT in GC v CG (Thompson in sod.,

1987; Morgenthaler in Holzhäuser, 1995; Leong-Morgenthaler in sod., 1998). Podobne mutacije je povzročil PhIP tudi *in vivo* v tkivu debelega čревa transgenih glodavcev (Nagao in sod., 1997).

HAA v celicah povzročajo prelome DNA ter imajo klastogeni učinek. V različnih celičnih modelih *in vitro*, tako živalskih kot humanih, pa tudi *in vivo* so dokazali vpliv HAA na nastanek mikrojeder in izmenjavo sestrskih kromatid (Holme in sod., 1987; Thompson in sod., 1987; Aeschbacher in Turesky, 1991; Buonarati in sod., 1991). V krvi in kostnem mozgu miši kronično izpostavljenim HAA so odkrili tudi druge kromosomske preuređitve. MeIQx je v krvnih celicah povzročil aneuploidijo, MeIQ pa v limfocitih translokacije (Breneman in sod., 1996; Ramsey in sod., 1998).

HAA povzročajo tudi nastanek superoksidnih anionov (Sato in sod., 1992). HAA oz. *N*-hidroksi-HAA naj bi bili reducenti (donorji elektronov), reakcijo pa katalizira NADPH/citokrom P-450 reduktaza. Superoksidni anioni lahko poškodujejo DNA (Maeda in sod., 1999; Murata in sod., 1999).

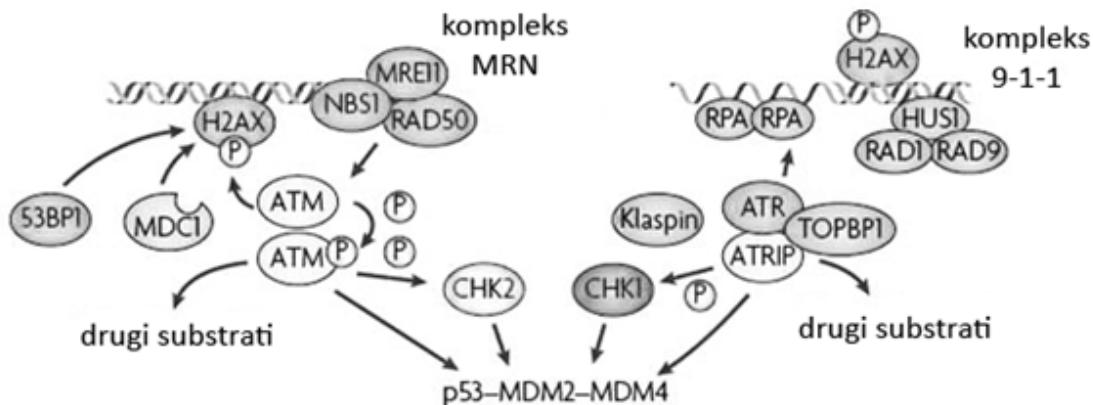
Mutagenost ekstraktov iz različnih vrst mesa je odvisna od načina pečenja mesa, kar ima za posledico različno vsebnost posameznih HAA v ekstraktu (Jägerstad in sod., 1998). Večja kot je vsebnost HAA v ekstraktu, večji je mutageni potencial v bakterijskih testnih sistemih (Tikkanen in sod., 1996; Knize in sod., 1997a, 1997b; Salmon in sod., 1997). V *in vivo* poskusih z mešanicami različnih HAA pa povezava med večjim številom posameznih HAA in njihovim vplivom ni tako očitna. Hasegawa in sod. (1991; 1994a; 1994b) so potrdili aditivne oz. sinergistične učinke mešanice HAA na glodavce. Nasprotno pa so Tsuda in sod. (1999) odkrili, da je PhIP v mešanici različnih HAA zaviral rakotvorni potencial HAA v izpostavljenih glodavcih. V raziskavi ekstraktov pečenega mesa z bakterijskim testnim sistemom so odkrili, da je mutagena aktivnost ekstrakta nižja od pričakovane na osnovi koncentracij posameznih HAA v ekstraktu (Constable in sod., 1999).

2.3.4 Odziv celic na poškodbe DNA

2.3.4.1 Vpliv HAA na signalne poti, ki se odzovejo na poškodbe DNA

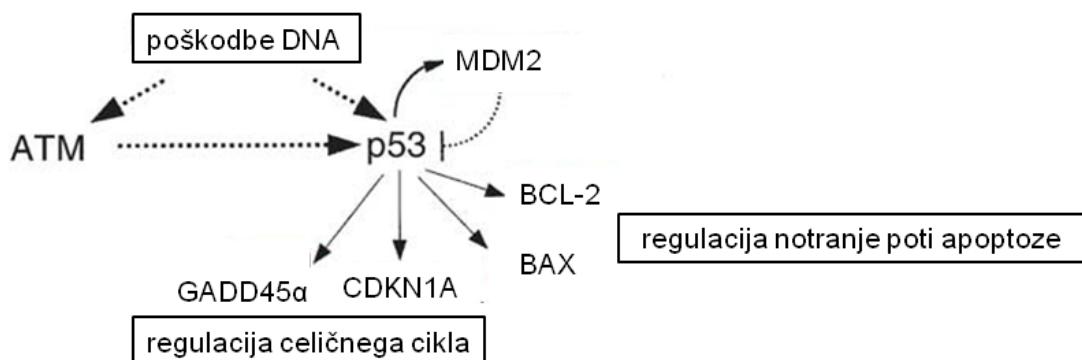
Poškodbe DNA oz. genotoksični stres v celicah sprožijo signalno pot oz. omrežje različnih signalnih poti. V te poti so vpleteni senzorji, ki prepoznajo poškodbe DNA, prenašalci signalov in efektorji. Po poškodbi DNA se v celicah sprožijo znotrajcelični procesi, ki vodijo v senescenco, apoptozo ali pa v popravilo DNA poškodb ter posledično nadaljevanje celičnega cikla. Kateri izmed procesov se bo v celicah odvил je odvisno od vrste in obsega DNA poškodb ter od aktiviranih končnih efektorjev (Zhou in Elledge, 2000; Harper in Elledge, 2007).

Senzorji poleg poškodb DNA zaznavajo tudi napake v delovanju mehanizma podvojevanja DNA. Med senzorje za zaznavanje poškodb DNA spada kompleks proteinov MRN (iz ang. Mre11/Rad50/Nbs1). Kompleks MRN se veže na mesto, kjer je poškodovana DNA in privabi prenašalce signalov (Slika 7). Vlogo prenašalcev signalov imajo kinaze: ATM (iz ang. ataxia telangiectasia mutated kinases), ATR (iz ang. ATM-Rad3-related) in DNA-PK (iz ang. DNA-dependent protein kinase) (Lee in Paull, 2005). Kinaze fosforilirajo histon H2AX (Rogakou in sod., 1998). Aktiviran H2AX povzroči vezavo številnih adapterskih proteinov in aktivacijo efektorjev, med katerimi so tudi kinaze kontrolnih točk celičnega cikla (iz ang. cell cycle checkpoint kinases) CHK1 in CHK2. Efektorji so tudi različni proteini, ki sodelujejo v procesih popravljanja DNA, regulacije transkripcije DNA in kontrole celičnega cikla (Zhou in Elledge, 2000).



Slika 7: Signalni poti odgovora na poškodbe DNA. Kompleks MRN (iz ang. Mre11-Rad50-Nbs1) prepozna poškodbe DNA ter aktivira kinaze ATM (iz ang. ataxia telangiectasia mutated kinases) in druge proteine, ki se odzovejo na poškodbe DNA. Kinaze ATM fosforilirajo P53, MDM2 in CHK2 ter druge proteine. Na poškodbe DNA se pa tudi lahko veže replikacijski protein RPA (iz ang. replication protein A). Nanj pa se veže kompleks ATRIP (iz ang. ATR-interacting protein), ki nato fosforilira kompleks 9-1-1 (sestavljen iz Rad9, Rad1 in Hus1). Posledično se ATR še močneje aktivira, poveže s klapsinom ter fosforilira P53, MDM2 in CHK1 (prirejeno po Petković, 2011; Meek, 2009).

Transkripcijski faktor P53 je ključni efektor pri poškodbah DNA. Z negativno povratno zanko ga regulira E3 ubikvitin ligaza (MDM2), ki prepreči njegovo transkripcijsko aktivnost in pospeši njegovo razgradnjo na proteosomu. P53 se aktivira v celicah izpostavljenim stresu ter regulira izražanje genov, ki so vpleteni v ustavitev celičnega cikla, sprožitev senescence oz. apoptoze (Lane, 1992). Med geni, katerih izražanje neposredno regulira P53 sta *CDKN1A* (imenovan tudi *P21*) – inhibitor od ciklina odvisnih kinaz, ki ustavi prehod iz G₁ v S fazo celičnega cikla (Waldman in sod., 1995) in *GADD45α*, ki kontrolira prehod iz G₂ v M fazo, procese popravljanja DNA in apoptizo (Zhan, 2005). Povečano izražanje *GADD45α* je povezano z odgovorom na oksidativni stres (Wang in sod., 1999). Ellinger-Ziegelbauer in sod. (2005) so s primerjavo profilov izražanja genov v jetrih podgan izpostavljenim genotoksičnim in ne-genotoksičnim karcinogenom ugotovili, da izražanje *CDKN1A*, *GADD45α* in *MDM2* specifično povečajo le genotoksični karcinogeni (Slika 8).



Slika 8: Poenostavljena shema regulacije P53 in njegovih transkripcijskih tarč

Vpliv HAA na izražanje genov, ki se odzovejo na poškodbe DNA in vpliv HAA na celični cikel sta slabo poznana. Gooderham in sod. (2002) so odkrili, da PhIP povzroči od doze odvisno povečanje izražanja proteinov CDKN1A in P53 v humanih limfoblastoidnih TK6 celicah. PhIP ustavlja celični cikel TK6 celic v S fazi (Zhu in sod., 2000). Poleg tega PhIP ustavlja celični cikel limfoblastoidnih celic (TK6, MT1 in WTK1) tudi v G₂ fazi celičnega cikla neodvisno od P53 signalne poti (Duc in Leong-Morgenthaler, 2004).

Popravljanje DNA je ključni mehanizem, ki preprečuje, da bi se poškodbe DNA udejanile v trajne mutacije. V primeru nepravilnega delovanja popravljalnih mehanizmov se verjetnost trajnih sprememb genoma poveča, kar lahko vodi v transformacijo celic in začetek karcinogeneze (Luch, 2005).

2.3.4.2 HAA in apoptoza

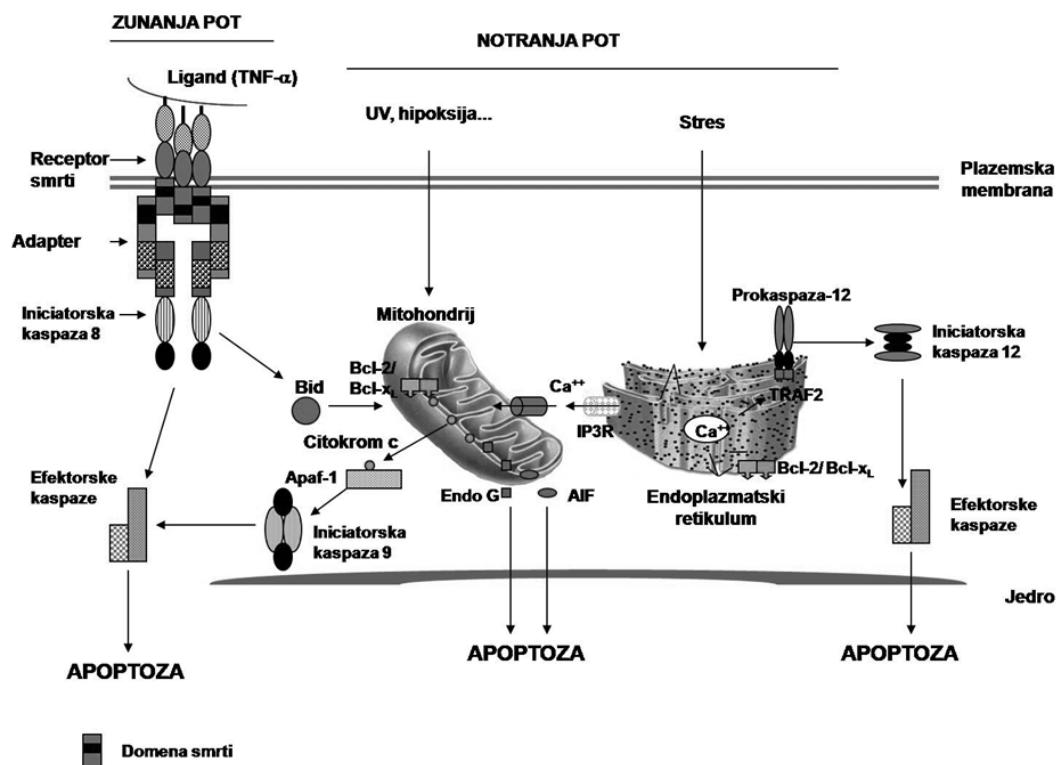
Programirana celična smrt ali apoptoza je nadzorovan proces, ki omogoča odstranjevanje potencialno nevarnih celic, kot so celice okužene z virusi ali celice s poškodovano DNA. Apoptoza je ključen proces za vzdrževanje stalnega števila celic v hitro obnavljajočih se tkivih odraslih organizmov. Pomembna je tudi v embrionalnem razvoju (Abraham in Shaham, 2004; Cooper in Hausman, 2009). Nepravilnosti v regulaciji apoptotskih poti lahko vodijo v preobsežno apoptozo ter posledično v številne

degenerativne in avtoimunske bolezni. Odsotnost apoptoze je ena izmed glavnih značilnosti nastanka benignih in malignih tumorjev (Hanahan in Weinberg, 2000).

Apoptotske celice prepoznamo po značilni morfologiji, kot so kondenzacija citoplazme in organelov, brstenje celične membrane, skrčenje celic, izguba povezave med celicami, kondenzacija kromatina in fragmentacija DNA ter nastanek apoptotskih teles (Saraste, 1999). Glavno vlogo v apoptotskih procesih imajo kaspaze, ki so cisteinske proteaze. Za njih je značilno, da specifično cepijo peptide za aspartatom. Poznanih je 7 kaspaz, ki sodelujejo pri apoptizi ter se razlikujejo po substratni specifičnosti. Kaspaze delimo glede na funkcijo na iniciatorske (kaspaze 2, 8, 9 in 10) in efektorske (kaspaze 3, 6 in 7) kaspaze (Hengartner, 2000). Iniciatorske kaspaze se lahko samoaktivirajo, medtem ko efektorske tega niso zmožne oz. jih lahko aktivirajo iniciatorske kaspaze. Aktivirane efektorske kaspaze cepijo različne proteine, kar posledično vodi v morfološke spremembe značilne za apoptizo (Reed, 2000). Tako cepitev inhibitorne enote endonukleaze povzroči fragmentacijo DNA, cepitev jedrnih laminov fragmentacijo jedra, cepitev citoskeletalnih proteinov pa vodi do brstenja membrane in fragmentacije celice (Cooper in Hausman, 2009).

Poznani sta dve poti poteka apoptoze: zunanja (ekstrinzična) pot in notranja (intrinzična) ali mitohondrijska pot. Zunanjo pot apoptoze sprožijo izvencelični signali preko družine membranskih TNF receptorjev, ki imajo na notranji strani celične membrane t.i. domeno smrti (iz ang. death domain) preko katere se povežejo s homolognimi domenami citoplazemskih adapterskih proteinov. Le-ti nato aktivirajo iniciatorski kaspazi 8 in 10, ki cepijo druge (efektorske) kaspaze, kar posledično vodi v celično smrt (Cooper in Hausman, 2009) (Slika 9). Notranjo pot apoptoze največkrat sproži poškodba DNA. Aktivira se prva skupina pro-apoptotskih molekul iz družine proteinov BCL-2 (BID, BAD, BIK, BIM, BMF, HRK, NIX, NOXA, PUMA). Le-ti蛋白 nato razgradijo anti-apoptotske proteine BCL-2 družine (BCL-2, BCL-X_L, BCL-w, MCL-1, A1/Bf11 in NRF3). Slednji regulirajo delovanje druge skupine pro-apoptotskih proteinov iz iste družine (BAX, BAK in BOK/MTD). Monomeri BAX in BAK polimerizirajo in se vključijo v zunano mitohondrijsko membrano, kjer tvorijo pore. To povzroči večjo prepustnost membrane ter sproščanje citokroma c v citosol.

Citokrom c aktivira iniciatorsko kaspazo 9, ki nadalje aktivira efektorski kaspazi 3 in 7 (Hengartner, 2000; Kaufmann in Hengartner, 2001; Haupt in sod., 2003; Khosravi-Far, 2004; Gupta in sod., 2006).



Slika 9: Shema apoptotskih poti. Apoptoza poteka po dveh poteh: zunanji in notranji. Zunanja pot sprožitve apoptoze se prične z zunajceličnimi signali, ki jih v notranjost celice posreduje TNF- α , t.i. receptor smrti. TNF- α aktivira iniciatorski kaspazi 8 in 10, posledično se aktivirata efektorski kaspazi 3 in 7. Notranja pot povzroči stres celic, aktivirajo oz. inaktivirajo se proteini družine BCL-2. Aktivirana BAX in BAK se vežeta v mitohondrijsko membrano, kjer tvorita pore. Začne se sproščanje citokroma c v citosol, ki se poveže z Apaf-1 in iniciatorsko kaspaze 9, kar povzroči aktivacijo kaspaz 3 in 7 (prirejeno po Petković, 2001 ter Gupta in sod., 2006).

V regulacijo izražanja številnih apoptotskih proteinov je vključen tudi transkripcijski faktor P53 (Haupt in sod., 2003). Na zunanjo pot apoptoze deluje tako, da inducira izražanje genov, ki kodirajo TNF receptorje ter njihov prenos na celično membrano. Neposredno regulira tudi izražanje večjega števila genov iz družine BCL-2 (BAX, NOXA, PUMA in BID) ali pa se veže na anti-apoptotska dejavnika BCL-2 in BCL-X_L ter ju inaktivira (Haupt in sod., 2003).

Vpliv HAA na procese apoptoze je slabo poznan. Odkrili so, da nekateri HAA, kot npr. Trp-P-1, povzročajo apoptozo humanih monocitov, podganjih celic priželjca in vranice izoliranih, medtem ko PhIP in IQ nista vplivala na pojav apoptoze pri izpostavljenih humanih monocitih (Hashimoto in sod., 2000; Hashimoto in sod., 2001). Podobno PhIP in *N*-hidroksi-PhIP nista povzročila apoptoze v celični liniji spontano imortaliziranih celic fibrocistične dojke MCF10A (Venugopal in sod., 1999)..

2.4 RAKOTVORNOST HAA

HAA-DNA adukti in posledično nastanek mutacij imajo glavno vlogo pri nastanku tumorjev, ki naj bi bili posledica zaužitih HAA (Schut in Snyderwine, 1999). V poskusnih živalih HAA povzročajo nastanek tumorjev v številnih tkivih. Glavna tarčna organa so jetra in debelo črevo. HAA povzročajo tumorje tudi v želodcu, tankem črevesju, mlečnih žlezah, krvnih žilah in limfi, pljučih, ustni votlini, mehurju, koži in žlezi slinavki (Sugimura, 1997; Cheng in sod., 2006; Alaejos in sod., 2008).

Izpostavljenost glodavcev HAA v *in vivo* raziskavah je navadno večja kot je dnevna izpostavljenost ljudi HAA v prehrani (Sugimura in sod., 2004). Tako je direktna primerjava rakotvornega potenciala HAA v glodavcih in ljudeh otežena. Ljudje naj bi bili bolj dovetni za nastanek tumorjev pod vplivom HAA, kar naj bi bila posledica različnega metabolizma HAA (Alaejos in sod., 2008). Obstajajo pomembne razlike v katalitični aktivnosti in regioselektivnosti encimov citokrom P450 glodavcev in ljudi, kar vpliva na toksične lastnosti HAA (Turesky, 2007). CYP1A2 pri ljudeh je bolj učinkovit v *N*-oksidaciji (bioaktivaciji) kot pa v oksidaciji aromatskih obročev (detoksifikaciji) PhIP, MeIQx in IQ, medtem ko je pri podganjem CYP1A2 ravno obratno (Wallin in sod., 1989; Hammons in sod., 1997; Turesky in sod., 1998a, 1998b). Tudi stopnja izražanja proteinov v človeških jetrih je do 10-krat večja kakor v glodavskih (Turesky in sod., 1998a).

Številne epidemiološke študije so pokazale, da so skupine ljudi, ki uživajo veliko pečenega (rdečega) mesa (govedina, jagnjetina, prašičje meso) oz. so izpostavljene

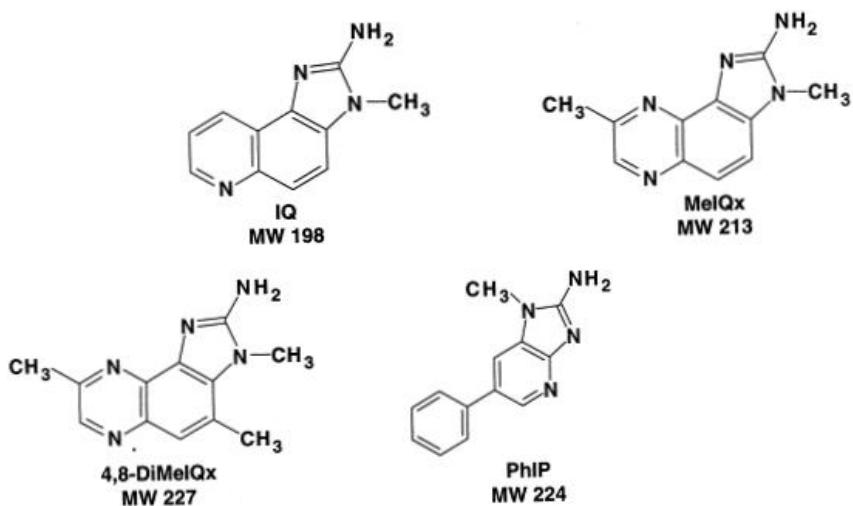
večjim količinam HAA bolj nagnjene k nastanku raka debelega črevesa, trebušne slinavke, pljuč in želodca ter pri moških raka prostate, pri ženskah pa raka dojk (Alaejos in sod., 2008; Zheng in Lee, 2009). Nekateri ljudje naj bi bili bolj dovzetni za vplive HAA in posledično nastanek raka. Tako naj bi bile razlike v dovzetnosti za nastanek raka debelega črevesa med posamezniki tudi več kot 1000-kratne, kar je posledica različne izpostavljenosti HAA in genske predispozicije posameznika (Felton in sod., 1997). Za gene, ki kodirajo metabolne encime udeležene v bioaktivaciji HAA, je značilen velik genski polimorfizem, predvsem razlike v enem nukleotidu – SNP (iz ang. single nucleotide polymorphism). Genski polimorfizem različno vpliva na funkcijo gena oz. proteina. Lahko pride do spremenjenega spajanja eksonov mRNA (iz ang. splicing), kar povzroči spremembo v aminokislinskem zaporedju v proteinih ter posledično spremembe v regulaciji izražanja in katalitični aktivnosti ter mestu delovanja encima (Marez in sod., 1997; Iida in sod., 2001; Kuehl in sod., 2001). Na primerih raka dojke, še bolj pa pri raku debelega črevesa, so odkrili vpliv aktivnosti metabolnih encimov na pojavnost raka. Pri posameznicah z genotipom »hitre« *NAT2 O-acetilacija*, tj. NAT2 encimom, katerega aktivnost je visoka in genotipom *SULT1A1 Arg/Arg*, ki prav tako določa visoko aktivnost encima in povzroča nastanek sulfatnih in sulfoniloksi estrov iz *N*-hidroksi-HAA, je večja verjetnost nastanka raka dojke v primerjavi z genotipom *SULT1A1 His/His*, ki vodi v nastanek sulfamatov in detoksifikacijo HAA (Deitz in sod., 2000; Zheng in sod., 2001). Podobno so odkrili, da redno uživanje pečenega mesa do 9-krat poveča verjetnost nastanka raka debelega črevesa pri posameznikih, ki imajo genotip »hitre« *CYP1A2 N-oksidacija* in »hitre« *NAT2 O-acetilacija*, v primerjavi s posamezniki z drugačnim genotipom (Le Marchand in sod., 2002; Turesky, 2007). Epidemiološka študija, ki so jo izvedli Marchand in sod. (2002), je tudi pokazala, da ni povečane verjetnosti nastanka raka debelega črevesa, če imajo posamezniki samo genotip »hitre« *CYP1A2 N-oksidacija* ali samo »hitre« *NAT2 O-acetilacija*. Podobno naj bi polimorfizem genov, ki kodirajo encime iz družine UDP-glukuronoziltransferaz 1A (UGT1A), vplival na nastanek raka debelega črevesa (Turesky, 2005). Butler in sod. (2005) so dokazali povezano med uživanjem pečenega mesa s HAA in povečanim nastankom raka debelega črevesa pri ljudeh z genotipom »počasne aktivnosti« UGT1A7 v primerjavi z genotipom »hitre aktivnosti« UGT1A7.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

V poskusih uporabljene kemikalije, reagenti in raztopine ter koncentracije založnih raztopin in topilo so navedene v besedilu opisa metod. Založne raztopine HAA (Slika 10), benzo(a)pirena (BaP) in staurosporina (STS) smo pripravili v dimetilsulfoksidu (DMSO). Koncentracija založnih raztopin PhIP in 4,8-DiMeIQx je bila 20 mM ter MeIQx in IQ 100 mM. Koncentracija založnih raztopin BaP in STS je bila 10 mM oz. 2 mM. Večino ostalih kemikalij smo raztopili po navodilih proizvajalca. Sestave vseh gojišč, pufrov in proizvajalci kemikalij so navedeni v Prilogah.



Slika 10: Strukturne formule in molska masa (MW) HAA uporabljenih v poskusih
(prirejeno po Guy in sod., 2000)

3.1.2 Bakterije *Salmonella typhimurium*

Pri Ames testu (bakterijski test povratnih mutacij) smo uporabili sev bakterije *Salmonella typhimurium* TA98. Bakterija *S. typhimurium* je Gram negativna in fakultativno anaerobna bakterija. Sev TA98 je od histidina (His-) odvisen sev, ki zaradi

mutacij v različnih genih na histidinskem operonu ne more sintetizirati aminokisline histidina. Sev TA98 se uporablja za ugotavljanje mutacij, kjer pride do delecije baznega para, tj. -1 premika bralnega okvirja blizu ponavljajoče sekvence -C-G-C-G-C-G-C-G-. Mutacija povzroči vzpostavitev pravilnega zaporedja in posledično bralnega okvirja (divji tip), kar omogoči bakterijam sintezo histidina in rast kolonij revertant na minimalnem gojišču v odsotnosti histidina.

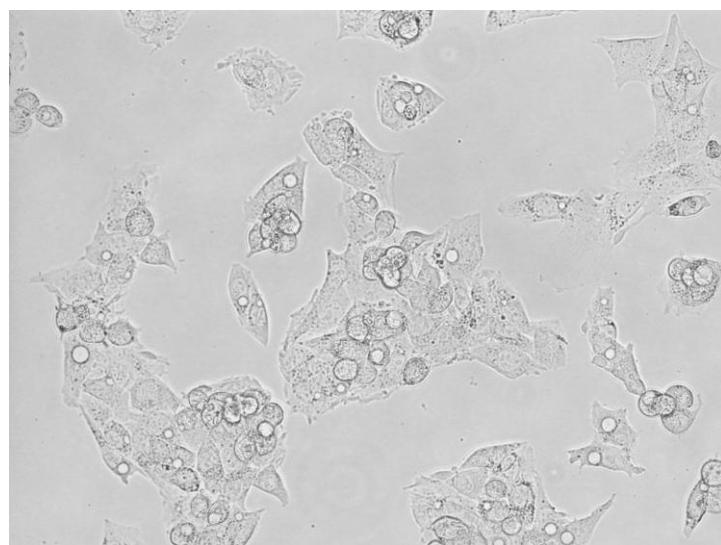
3.1.2.1 Gojenje bakterij

Bakterijske kulture *S. typhimurium* TA 98 se shranjuje pri temperaturi -80°C . Po odmrznitvi smo kulturo prenesli v centrifugirko s 15 ml hranilega gojišča (sestava v Prilogi B) z dodanim ampicilinom, katerega končna koncentracija je znašala $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Centrifugirka naj bi bila vsaj 3–5-krat večja, kot je volumen hranilnega gojišča, da se zagotovi zadostno prezračenje. Po inkubaciji, ki je trajala preko noči (ne več kot 16 h pri temperaturi 37°C) smo kulturo stresali 1,5–2 h na stresalniku pri 600 obratih/min in 37°C , da so bakterije dosegle eksponencialno stopnjo rasti.

3.1.3 Celična linija HepG2

Celice HepG2 so linija človeškega hepatoma (Slika 1). Izolirali so jih leta 1979 iz hepatoblastoma 11 letnega dečka iz Argentine (Aden in sod., 1979). Celice HepG2 imajo od 48 do 54 kromosomov – anevploiden kariotip. Delitveni čas celic je 20 do 28 h. Ohranjene imajo aktivnosti nekaterih encimov I. in II. stopnje metabolizma (citokromi P450, sulfotransferaze, N-acetyltransferaze, UDP-glukuronoziltransferaze in glutation-S-transferaze), sintetizirajo in sproščajo v medij številne beljakovine, ki jih izločajo tudi normalne jetrne celice. Encimska aktivnost celic HepG2 je nižja kot v sveže izoliranih človeških hepatocitih. Kljub temu je celična linija HepG2 uveljavljena v raziskavah genotoksičnosti direktnih in indirektnih mutagenov (Natarajan in Darroudi, 1991; Knasmuller in sod., 1998; Valentin-Severin in sod., 2003; Knasmuller in sod., 2004). Celice HepG2 izražajo tudi tumor supresorski

gen *P53* in njegove transkripcijske tarče, zato so primerne za raziskavo odziva celic na poškodbe DNA (Bressac in sod., 1990). Celice nam je poklonil dr. Firouz Darroudi (Oddelek za kemijsko mutagenezo, Univerza v Leidnu, Nizozemska). Uporabljali smo jih do 10. pasaže po odmrznitvi, saj pri višjih pasažah izražanje in aktivnost metabolnih encimov upade, spremeni se tudi morfologija celic.



Slika 11: Celice HepG2 pod faznim kontrastom. 460-kratna povečava (foto: A. Štraser)

3.1.3.1 Gojenje celic HepG2

Celično linijo HepG2 smo imeli shranjeno v tekočem dušiku. Po odmrznitvi smo celice gojili v celičnem gojišču (sestava v Prilogi C) v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Costar, Corning Corporation, ZDA) pri temperaturi 37 °C in 5% CO₂ vlažni atmosferi. Gojišče smo zamenjali vsak tretji dan. Celice smo presajali, ko je preraščenost plošče dosegla 80%. Za odlepljanje celic s plošče smo uporabljali 0,1% tripsin (sestava v Prilogi C). Število in gostoto celic smo določali z Burker-Türkovo komoro, na katero smo nanesli 10 µl z 0,4% tripan modrega barvila obarvane celične suspenzije (v razmerju 1:5). Vse poskuse smo izvajali pri 70–80% preraščenosti plošč.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava ekstrakta pečenega mesa in določanje vsebnosti HAA

Ekstrakte pečenega mesa in določanje vsebnosti HAA v njih so izvedli dr. Tomaž Polak in sodelavci s Katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

3.2.1.1 Priprava ekstraktov pečenega mesa

Zrezke debeline 10–15 mm so pripravili iz 9825 g prašičjega in 10240 g govejega mesa (zarebrnica, Longissimus dorsi) ter iz 10134 g piščančjih prsi. Na dvoploščnem žaru so meso termično obdelali pri temperaturi 220 °C, do središčne temperature 80 °C (± 1 °C), katero so preverili s sondim termometrom (Testo 177-T4). Po pečenju so zrezke 24 h hladili pri 4 °C (± 1 °C). Nato so HAA ekstrahirali iz 2 mm debele zapečene skorje in iz sredice pečenega zrezka. Homogenizirane vzorce skorje in sredice (750 g) so najprej razklopili v 1 l 2 M NaOH z mešanjem na magnetnem mešalu pri 500 obratih/min, 12 h. Dobljeni suspenziji so primešali diatomejsko zemljo Extrelut NT (500 g) in jo prenesli v kromatografske kolone (Lenz Laborglas, Nemčija), katere so spirali z etil acetatom in diklorometanom v razmerju 1:1 (1,2 l). Eluat vzorcev so čistili z ekstrakcijo s trdno fazo (iz ang. solid phase extraction – SPE) na kolonah Oasis MCX 500 mg (Waters, ZDA). MCX kolone so sprali z 0,1 M HCl (12 ml) in metanolom (12 ml), za ekstrakcijo pa uporabili 12 ml metanola in amoniaka v razmerju 19:1 (v/v). Ekstrakciji je sledila evaporacija topila v toku dušika (40 °C, 350 mbar), po evaporaciji pa raztapljanje v 1 ml metanola.

3.2.1.2 Določanje vsebnosti HAA v ekstraktih pečenega mesa

Vsebnost HAA v ekstraktih pečenega mesa je bila določena v skladu z metodami, ki jih je opisal Murkovic (Murkovic in sod., 1998; Murkovic, 2004) z manjšimi spremembami Polaka in sod. (2009a, 2009b).

Koncentracijo HAA v ekstraktih pečenega mesa so določali s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masnim spektrometrom (LC/MS). Ločba HAA s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) je potekala na sistemu Agilent 1100 z gelsko kolono z reverzno fazo (Semi Micro TSKgel ODS-80Ts, 5 µm, 250 mm × 2 mm; Tosho Bioscience LLC, Japonska). Kromatografija je potekala z gradientom mobilne faze A (20 mM amonijev formiat, pH 3,2) in mobilne faze B (acetonitril) pri konstantnem pretoku 0,3 ml/min in 3,2 pH. Program gradienta je bil: 95% A, 0–0,5 min; 95–80% A, 0,5–15,0 min; 80–40% A, 15–18 min; 40% A, 18–24 min; 40–95% A, 24–27 min; 95% A, 27–40 min. Injiciran volumen ekstraktov z internim standardom je bil 10 µl. Kot interni standard so uporabili 4,7,8-TriMeIQx (razredčen 1:10). HAA so določili in kvantificirali na podlagi retencijskih časov in spektrov posameznih standardov HAA (Harman, Norharman, IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, PhIP; Toronto Research Chemicals, Kanada) z znanimi koncentracijami.

Za detekcijo posameznih HAA so uporabili masnoselektivni detektor (Quattro micro API; Waters, USA) v ESI⁺ načinu (ionizacija z elektroni). Kot nosilni plin so uporabili dušik pri temperaturi 350 °C. Sušenje v toku dušika je potekalo pri temperaturi 350 °C in pretoku 10 L/min. Detekcija na masnem detektorju je potekala v SIM načinu (iz ang. single ion monitoring). Dobljene kromatograme so analizirali s programom MassLynx™ V4.1.

3.2.2 Določanje vpliva HAA in EPM na preživetje in celični cikel celic HepG2

3.2.2.1 Testa MTS in MTT za določanje citotoksičnosti

Citotoksičnost HAA in EPM za celice HepG2 smo določali z testoma MTS oz. MTT, kot ju je opisal Mosmann (1983). Pri testiranju genotoksičnega delovanja snovi je pomembno, da testiramo koncentracije, pri katerih te snovi ne povzročajo celične smrti. MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) je rumena vodotopna substanca, ki jo mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste nevodotopne kristale formazana. Kristali formazana so topni v dimetil sulfoksidu (DMSO) ali izopropanolu in podobnih organskih topilih. Podobno kot MTT tudi MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolim) mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza pretvori v vodotopni formazan ob prisotnosti PMS (fenazin metasulfat). Razmerje med količino nastalega formazana in številom živih celic oz. metabolno aktivnih, je linearno in specifično za vsako celično linijo (zaradi razlik v metabolni aktivnosti).

Potek testa MTS:

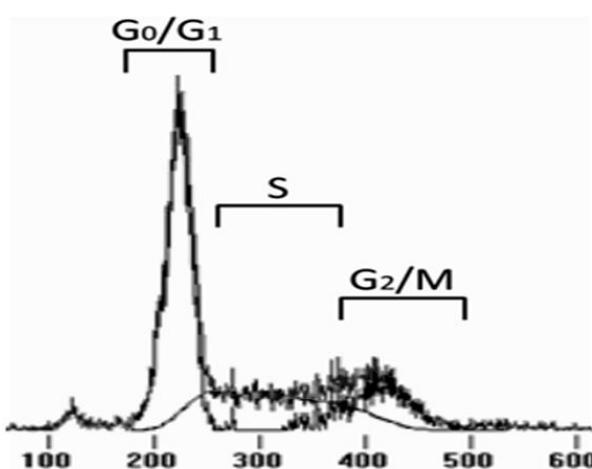
Celice smo nasadili na plošče s 96 jamicami (Nunc, ZDA) z gostoto 8000 celic/jamico v petih paralelkah. Po pritrdirtvji (naslednji dan) smo celice za 24 h izpostavili 50, 100 in 200 μM koncentraciji PhIP oz. 4,8-DiMeIQx ter 50, 100, 200, 500, 750, 1000 μM koncentraciji MeIQx oz. IQ. Delež topila smo uravnali na 1 vol. % DMSO pri vseh izpostavljenih celicah. Pri poskusu smo uporabili negativno kontrolo (sveže gojišče) in kontrolo topila (sveže gojišče z 1 vol. % DMSO). Po končani izpostavitvi smo celicam dodali raztopino MTS in PMS (končna koncentracija MTS 333 $\mu\text{g/ml}$ in PMS 25 $\mu\text{g/ml}$) ter jih inkubirali nadaljnje 3 h. Po inkubaciji smo pomerili absorbanco pri 515 nm (z referenčno valovno dolžino pri 690 nm) s spektrofluorimetrom (Tecan, Avstrija). Test smo ponovili dvakrat. Relativno preživelost smo določali s primerjavo povprečne absorbance pri izpostavljenih celicah in kontroli topila. Z enosmerno analizo variance (ANOVA) smo analizirali razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami (Dunnett post test, $p<0,05$).

Potek testa MTT:

Celice smo nasadili enako kot pri testu MTS. Celice smo za 24 h izpostavili trem različnim EPM iz skorje in sredice mesa v deležu 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 in 1 vol.%. Celice so bile tako izpostavljene od 0,15 do 2,35 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje govejega in od 0,24 do 3,77 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje prašičjega ter od 0,4 do 6,4 μM HAA v EPM iz skorje piščančjega mesa (Preglednica 1). Delež topila smo uravnali na 1 vol.% metanola v vseh izpostavljenih celicah. Pri poskusu smo uporabili negativno kontrolo (sveže gojišče) in kontrolo topila (sveže gojišče z 1 vol.% metanola). Po končani izpostavitvi smo celicam dodali MTT reagent (končna koncentracija 0,5 mg/ml). Po 3 h inkubacije smo odstranili gojišče z MTT reagentom in nastale formazanske kristale raztopili v DMSO. S spektrofluorimetrom (Tecan, Avstrija) smo pomerili absorbanco pri 570 nm (z referenčno valovno dolžino pri 690 nm). Test smo ponovili dvakrat in relativno preživelost določili enako kot pri testu MTS.

3.2.2.2 Določanje vpliva HAA in EPM na celični cikel celic HepG2 s pretočno citometrijo

Z barvanjem celic s propidijevim jodidom in analizo posameznih celic s pretočno citometrijo lahko zaznavamo deleže celic v posameznih fazah celičnega cikla. Propidijev jodid je fluorescenčno barvilo, ki obarva celično DNA, pretočni citometer pa izmeri intenziteto fluorescence posamezne celice. Intenziteta fluorescence DNA je odvisna od količine DNA v celici. V G_0 (mirovanje) in v G_1 fazi celičnega cikla (iniciacija delitve, sinteza RNA in proteinov) imajo celice stanje kromosomov $2n$, zato jih pri analizi količine DNA pretočni citometer združuje v en vrh G_0/G_1 v histogramu z 1-kratno intenziteto fluorescence (Slika 2). V G_2 (priprava na delitev) in M (celična delitev) fazah imajo celice podvojeno število kromosomov oz. DNA ($4n$). Zato so združene v enem vrhu histograma z 2-kratno intenziteto fluorescence. V S fazi celičnega cikla je število kromosomov v celicah med $2n$ in $4n$, zato je intenziteta fluorescence izmerjena s pretočnim citometrom med 1-kratno in 2-kratno intenzitetu fluorescence.



Slika 12: Tipičen histogram, ki ga dobimo pri analizi vzorca celic, barvanih s propidijevim jodidom, s pretočno citometrijo. X os predstavlja intenziteto fluorescence, Y os pa število dogodkov. Največ celic je v G₁ in G₀ fazi, z 1-kratno količino DNA. Celice v S fazi zaradi podvojevanja imajo med 1-kratno in 2-kratno, celice v G₂ in M fazi pa 2-kratno količino DNA (Hreljac, 2009).

Potek dela:

Celice smo nasadili na plošče s 6 jamicami (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 400 000 celic/jamic. Po pritrditvi (naslednji dan) smo celice izpostavili za 24 in 36 h 25, 50, 100 in 200 µM koncentracijam PhIP oz. 4,8-DiMeIQx ter 25, 50, 100 in 250 µM koncentracijam MeIQx in IQ. Delež topila smo uravnali na 1 vol.% DMSO pri vseh izpostavljenih celicah. Celice smo izpostavili tudi 1 vol.% EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa, tj. 6,4 µM koncentraciji HAA v EPM skorje. Celice smo izpostavili za 24 h tudi čistim HAA v koncentracijah in kombinacijah, ki so bile v 1 vol.% EPM iz skorje piščančjega mesa (2,89 µM PhIP; 3,15 µM MeIQx; 0,37 µM 4,8-DiMeIQx). Testirane kombinacije so bile: PhIP in MeIQx ter PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx. Delež topila smo uravnali na 1 vol.% metanola pri celicah izpostavljenim kombinacijam HAA. Pri vseh poskusih smo imeli negativno kontrolo in STS (1 µM) za pozitivno kontrolo. Po 24 h izpostavitvi smo celice tripsinizirali in centrifugirali pri 800 obratih/min (5 min, 4 °C) ter jih 3-krat sprali s hladnim 1x PBS. Celice smo nato resuspendirali v 0,5 ml hladnega 1x PBS in fiksirali s previdnim dodajanjem 1,5 ml absolutnega etanola (končna koncentracija etanola v kateri so bile celice je bila 75%), medtem ko smo celice počasi mešali na stresalniku (vortex). Sledila je inkubacija celic

preko noči pri temperaturi 4 °C. Po inkubaciji smo celice centrifugirali pri 1200 obratih/min (10 min, 4 °C) ter 2-krat sprali s hladnim 1x PBS. Potem smo celice 15 min barvali s pufom propidijevega jodida (BD Biosciences, ZDA). Vzorce smo analizirali s pretočnim citometrom FACSCalibur (BD Biosciences, ZDA). Dobljene histograme faz celičnega cikla smo analizirali s prosto dostopnimi programi WINMDI (<http://facs.scripps.edu/software.html>) ter CylchRed ([http://en.biosoftware.net/other/Cylchred.html](http://en.biiosoftware.net/other/Cylchred.html)). Z enosmerno analizo variance (ANOVA) smo analizirali razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami (Dunnett post test, $p < 0,05$).

3.2.3 Določanje mutagenosti in genotoksičnosti HAA in EPM

3.2.3.1 Test povratnih mutacij (Amesov test)

Test povratnih mutacij na sevih bakterije *S. typhimurium* je široko uporabljana metoda za določanje mutagenosti (Maron in Ames, 1983). Pri Amesovem testu uporabljamo različne seve bakterije *S. typhimurium*, v katerih je, zaradi mutacij v različnih genih na histidinskem operonu, zvrta sinteza aminokisline histidina. Na minimalnih glukoznih gojiščih s histidinom v sledovih lahko kolonije tvorijo le tiste bakterije, pri katerih pride do povratnih mutacij. Tako se vzpostavi pravilno zaporedje za sintezo histidina. Takšne kolonije imenujemo revertante. Število spontanih revertant na ploščo je relativno konstantno, v prisotnosti mutagenov pa se število povratnih mutacij poveča. Večje kot je število kolonij na ploščah, bolj je neka snov mutagena. Večina mutagenih snovi deluje indirektno, kar pomeni, da potrebujejo metabolno aktivacijo z encimi I. in II. stopnje metabolizma. Slednjih bakterije ne izražajo, zato je za metabolno aktivacijo potrebno dodajati zunanje metabolne encime. V ta namen se najpogosteje uporablja t.i. S9 mikrosomalna frakcija homogenata podganjih jeter. Podgane izpostavijo polikloriranim bifenilom (Arochlor 1254), da povečajo raven metabolnih encimov. S9 homogenat vsebuje encime I. stopnje metabolizma. Po dodatku potrebnih kofaktorjev dobimo aktivacijsko mešanico S9, ki jo uporabljamo pri Amesovem testu.

Potek Amesovega testa:

Pred začetkom testa smo pripravili plošče minimalnega glukoznega gojišča, kofaktorje potrebne za mešanico S9 in površinski agar z minimalno količino histidina. Sestave vseh gojišč in pufrov so navedene v Prilogi B. Priprava kulture *S. typhimurium* (sev TA98) je opisana v poglavju 3.1.2. Pred testom smo razredčili vzorce HAA in EPM. PhIP smo razredčili tako, da je bila končna koncentracija od 1 do 1000 ng/ploščo. Končna koncentracija 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ je bila od 0,01 do 10 ng/ploščo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili BaP (10 µg/ploščo). EPM iz sredice govejega, prašičjega in piščančjega mesa smo razredčili tako, da so bile končne razredčitve na ploščah 100, 200, 400 in 800-kratne (1, 0,5, 0,25, 0,125 vol.%), EPM iz skorje pa 250, 500, 1000, 2000, 4000 in 8000-kratne (oz. 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 vol.%). Končna koncentracija HAA v EPM iz skorje govejega je bila tako od 6,5 do 206 ng/ploščo, v EPM iz skorje prašičjega mesa od 10,3 do 82 ng/ploščo in v EPM iz skorje piščančjega mesa od 17,5 do 140 ng/ploščo. Negativna kontrola je bila 1% metanol. Za pozitivno kontrolo smo uporabili BaP (10 µg/ploščo) in 10 nM MeIQx (8,536 ng/ploščo).

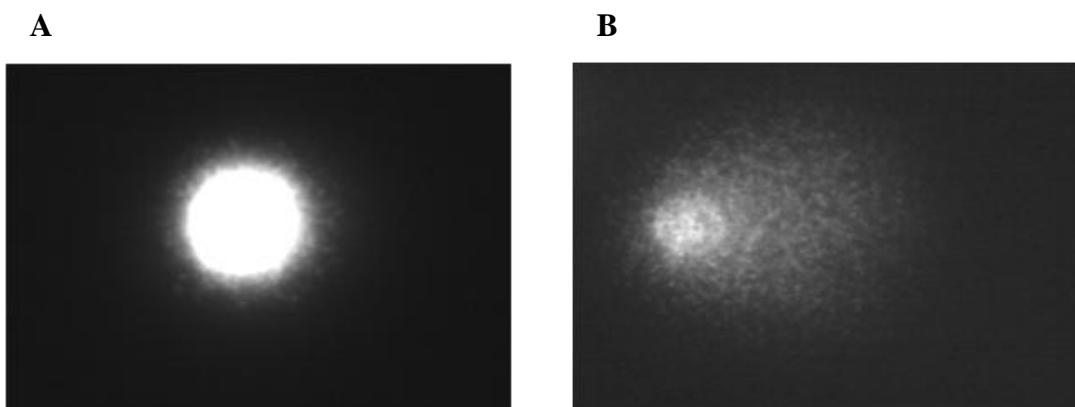
V termobloku (43 °C) smo si pripravili ustrezno število epruvetk in vanje odpipetirali 2 ml površinskega agarja z dodano 5 mM raztopino histidin/biotin. V vsako od epruvetk smo nato dodali 100 µl ustrezno razredčenega vzorca, 100 µl bakterijske suspenzije in 500 µl mešanice 4% S9. Vsebino epruvetke smo na kratko premešali na stresalniku (vortex) in razlili na plošče z minimalnim glukoznim gojiščem tako, da se je površinski agar enakomerno porazdelil po plošči. Vsak vzorec smo testirali na treh ploščah. Po končani inkubaciji (72 h, 37 °C), smo prešteli število kolonij in izračunali povprečje vseh treh paralelk. Snov se ocenjuje kot mutageno, če pri vsaj eni testirani koncentraciji povzroči vsaj 2-kratno povečanje števila revertant v primerjavi s kontrolo in če je povečanje števila revertant odvisno od odmerka. Za analizo razlik med izpostavljenimi in kontrolnimi bakterijami smo uporabili Studentov t-test ($p<0,05$).

3.2.3.2 Test komet na celicah HepG2

Test komet ali elektroforeza posamezne celice je preprosta in zelo občutljiva metoda za določanje eno- in dvoverižnih prelomov DNA. Zaznamo lahko prelome, ki nastanejo kot intermediati v procesih celičnega popravljanja, kot sta nukleotidno (NER) in bazno (iz ang. base excision repair – BER) izrezovanje. Ti prelomi so prehodnega značaja. Poleg tega test komet omogoča zaznavanje prelomov, ki so posledica alkalno labilnih mest, navzkrižnih povezav DNA-DNA in DNA-protein (Collins in sod., 1997; Tice in sod., 2000). Metodo sta razvila Ostling in Johanson leta 1984, nato pa je doživela številne modifikacije. Izbrali smo najbolj uporabljeno modifikacijo metode, ki so jo objavili Singh in sod. (1988). Gre za izvedbo testa pri visokem pH (>13), s katero je možno zaznati poleg dvo- in enoverižnih prelomov tudi prelome, ki so posledica alkalno labilnih mest in prelomov DNA, ki nastanejo kot vmesna stopnja pri popravljanju poškodb DNA (izrezovanje baz in nukleotidov) ter so prehodnega značaja (Singh in sod., 1988; Tice in sod., 2000). Če s testom komet zaznamo veliko poškodb DNA, to lahko pomeni, da je DNA zelo poškodovana ali pa je to posledica učinkovitega popravljanja poškodb DNA (Collins in sod., 1997). Pomanjkljivost metode je, da ne moremo natančno določiti narave poškodbe, ki jo zaznamo s tem testom (Horváthová in sod., 1998).

Komet test je zasnovan na dejstvu, da DNA z več prelomi v električnem polju potuje hitreje, kar po elektroforezi in barvanju z barvili, ki se vežejo na DNA, vidimo kot rep kometa. Po izpostavitvi celice imobiliziramo v agaroznem gelu. Sledi liza z detergentom pri pH 10, ki razgradi vse celične komponente razen jedra s superzavito DNA s histoni. Lizi sledi alkalno odvijanje (inkubacija v raztopini s pH>13) pri katerem se DNA odvije (denaturira) – izrazijo se enoverižni prelomi. Po alkalnem odvijanju sledi elektroforeza pri visokem pH. Nepoškodovana DNA je zvita okrog histonov in ne potuje v električnem polju, zato pri kontrolnih celicah ne opazimo značilnega repa kometa. Pri močno poškodovani (prelomljeni) DNA, fragmenti negativno nabite DNA prosto in hitreje potujejo v električnem polju ter ustvarijo značilen rep kometa (Slika 3), ki ga zaznamo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa, potem, ko smo jedra obarvali s fluorescenčnimi barvili, ki se vrinejo med bazne pare DNA (npr. etidijev bromid).

Dolžina repa se povečuje s številom poškodb. Maksimum dolžine je odvisen od pogojev izvedbe elektroforeze, ne pa od velikosti fragmentov.



Slika 13: Jedro celice z nepoškodovano (A) in s poškodovano DNA po testu komet pri 400-kratni povečavi (Žegura, 2004).

Potek testa komet:

Celice smo nasadili na plošče z 12 jamicami (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 40 000 celic/jamico in jih pustili preko noči, da so se pritrdile. Nato smo jih za 24 h izpostavili 50, 100 in 200 μM koncentracijam PhIP oz. 4,8-DiMeIQx ter 50, 100 in 250 μM koncentracijam MeIQx in IQ. Pri kontroli topila in vseh vzorcih HAA smo ohranjali 1 vol.% koncentracijo topila (DMSO). Celice smo izpostavili za 24 h tudi EPM iz sredice in skorje mesa v deležu 0,008, 0,04, 0,2 in 1 vol.%. Celice so bile tako izpostavljene od 0,02 do 2,35 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje govejega in od 0,03 do 3,77 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje prašičjega ter od 0,26 do 6,4 μM HAA v EPM iz skorje piščančjega mesa. Delež topila smo uravnali na 1 vol.% metanola pri vseh izpostavljenih celicah EPM. Pri vseh poskusih smo imeli negativno kontrolo in BaP (30 μM) za pozitivno kontrolo. Pred testom smo objektna stekelca, peskana po celi površini (Surgipath, Združeno kraljestvo), namočili v metanol za 24 h ter tik pred uporabo ožgali na gorilniku. Tako smo stekelca razmasti. Po izteku izpostavitve smo celice tripsinizirali in centrifugirali (800 obratov/min, 5 min) ter resuspendirali v majhni količini celičnega gojišča. Medtem smo na posušena stekelca nanesli 80 μl 1% NMP agaroze (iz ang. normal melting point agarose) raztopljljene v 1x PBS in pokrili s krovnim stekelcem. Po 5 min v hladilniku (4 °C) se je agariza strdila.

Previdno smo odstranili krovna stekelca in na NMP agarozo nanesli 30 µl celične suspenzije pomešane s 70 µl 1% LMP agaroze (iz ang. low melting point agarose), spet pokrili s krovnim stekelcem in inkubirali pri temperaturi 4 °C, da se je zgornja plast agaroze strdila. Od tu dalje je poskus potekal v temi in pri temperaturi 4 °C, da smo se izognili nespecifičnim poškodbam DNA. V kadičko s sveže pripravljenim hladnim pufrom za lizo (4 °C) smo položili objektna stekelca in jih inkubirali 1 h. Predtem smo jim zelo previdno odstranili krovna stekelca. Po končani inkubaciji smo stekelca prestavili v elektroforetsko kadičko tako, da so bili geli obrnjeni v isto smer. Elektroforetsko kadičko smo napolnili s sveže pripravljenim hladnim elektroforetskim pufrom (4 °C, pH 13) in inkubirali 20 min, da je poteklo alkalno odvijanje (denaturacija) DNA. Potem smo jedra celic izpostavili električnemu polju za 20 min pri napetosti 25 V in jakosti ~300 mA. Po končani elektroforezi smo stekelca prestavili v kadičko s sveže pripravljenim hladnim pufrom za nevtralizacijo (4 °C, pH 7,5) ter inkubirali nadaljnih 15 min. Sestava vseh raztopin in pufrov je navedena v Prilogi C. Stekelca smo barvali z etidijevim bromidom raztopljenim v destilirani vodi (5 µg/ml). Analizirali smo jih pod fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) pri 400-kratni povečavi. S pomočjo kamere (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies, Združeno kraljestvo) smo zajeli slike jeder in jih analizirali s programom Comet IV (Perceptive Instruments, Združeno kraljestvo). Za statistično analizo smo izbrali odstotek (%) DNA v repu kometa. V vsakem vzorcu smo poslikali 50 jeder, test pa trikrat neodvisno ponovili. Z enosmerno analizo variance (ANOVA) smo analizirali razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami (Dunnett post test, $p < 0,05$).

3.2.3.3 Določanje dvoverižnih prelomov DNA s pretočno citometrijo

Dvoverižni prelomi DNA lahko vodijo v prelome kromosomov in kromosomske preureditve. Dvoverižni prelomi DNA povzročijo fosforilacijo histona H2AX, ki je del histonskega oktomerja v nukleosomih. Fosforilirani histoni H2AX (t.i. γH2AX) se kopijo na mestih dvoverižnih prelomov DNA. γH2AX predstavljajo dvoverižne prelome DNA v razmerju 1:1, zato se uporabljajo kot indikator dvoverižnih prelomov

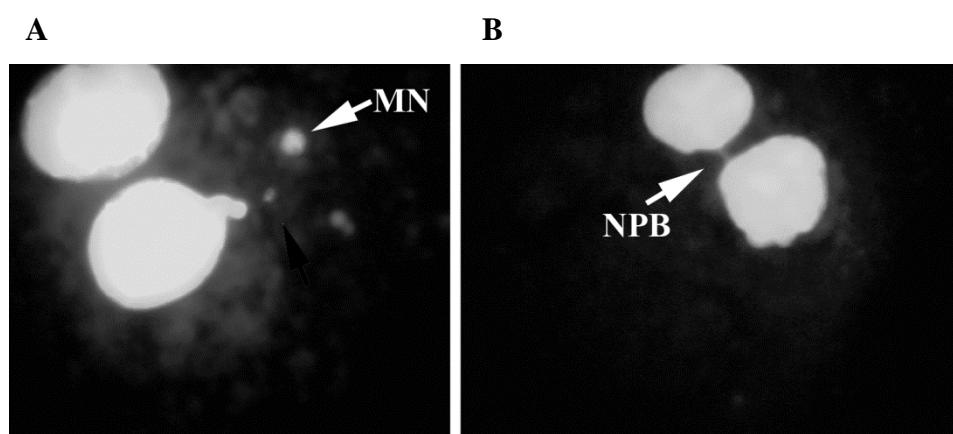
DNA (Rogakou in sod., 1998; Sedelinkova in sod., 2002). γ H2AX oz. dvojerižne prelome DNA smo v celicah HepG2 dokazovali z barvanjem celic s monoklonskimi fluorescenčno označenimi protitelesi in analizo celic s pretočno citometrijo.

Potek poskusa:

Celice smo nasadili na platenke s površino 25 cm^2 (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 800 000 celic/platenko. Po pritrditvi (naslednji dan) smo celice izpostavili za 24 h 25, 50, 100 in 200 μM koncentracijami PhIP oz. 4,8-DiMeIQx ter 25, 50, 100 in 250 μM koncentracijami MeIQx in IQ. Delež topila smo uravnali na 1 vol.% DMSO pri vseh izpostavljenih celicah. Pri poskusu smo uporabili negativno kontrolo (sveže gojišče) in kontrolo topila (sveže gojišče z 1 vol.% DMSO) ter pozitivno kontrolo (etopozid, 1 $\mu\text{g/ml}$ oz. 1,7 μM). Po 24 h izpostavitvi smo celice tripsinizirali in centrifugirali pri 800 obratih/min (5 min, 4 °C) ter jih 2-krat sprali s hladnim 1x PBS. Celice smo nato resuspendirali v 0,5 ml hladnega 1x PBS in fiksirali s previdnim dodajanjem 1,5 ml absolutnega etanola (končna koncentracija etanola v kateri so bile celice je bila 75%), medtem ko smo celice počasi mešali na stresalniku (vortex). Sledila je inkubacija celic preko noči pri temperaturi 4 °C. Po inkubaciji smo celice centrifugirali pri 1200 obratih/min (10 min, 4 °C) ter sprali s hladnim 1x PBS. Nato smo celice inkubirali v raztopini 2000-krat razredčenega protitelesa γ H2AX (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), Milipore, ZDA) 0,5 h v temi na ledu pri temperaturi 4 °C. Po inkubaciji smo celice 2-krat sprali s hladnim 1x PBS ter nato resuspendirali v 0,5 ml hladnega 1x PBS. Vzorce smo analizirali s pomočjo pretočnega citometra FACSCalibur (BD Biosciences, ZDA). Merili smo število celic (10000 dogodkov), ki so fluorescirale na kanalu FL1-H. Intenziteta FITC izmerjena na tem kanalu je bila referenčna vrednost za nadaljnjo analizo s pomočjo programa CellQuest Pro software (BD Biosciences, ZDA). S prosto dostopnim programom FCSEExtract (<http://research.stowers-institute.org/efg/ScientificSoftware/Utility/FCSEExtract/index.htm>) smo spremenili .fcs datoteke v .csv datoteke. Statistično značilno razliko med kontrolno skupino celic in izpostavljenimi celicami smo določili z linearimi modeli mešanih učinkov (iz ang. linear mixed-effects model) v programu R (R: A Language ... , 2012), z uporabo knjižnic reshape (Wickham, 2007), ggplot (Wickham, 2009) in nlme (Pinheiro in sod., 2012).

3.2.3.4 Test mikrojeder na celicah HepG2

S testom mikrojeder zaznavamo kromosomske preureditve: prelome, napačne prerazporeditve, izgubo in neločevanje kromosomov pri delitvi jedra, amplifikacijo genov. S testom ugotavljamo, ali določen agens povzroča nastanek mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov ali jedrnih brstov v celicah (Slika 14). Kvantifikacija je omejena na celice, ki so se le 1-krat delile. Takšne celice prepoznamo po dvojedrnem izgledu, ki nastane zaradi s citohalazinom B zavrte citokineze (Fenech, 2000). Mikrojedro (MN; iz ang. micronucleus) je skupek jedrne vsebine po obliki in strukturi podobno jedru, vendar bistveno manjše. Mikrojedro vsebuje bodisi fragment prelomljenega kromosoma (klastogeni učinek) bodisi cel kromosom, zaradi nepravilnega delovanja delitvenega vretena (anevgeni učinek). Mikrojedro nastane ker fragment ali cel kromosom nista pripreta na niti delitvenega vretena. Zato v anafazi celične delitve ne potujeta usmerjeno na celični pol. Nukleoplazmatski mostički (NPBs; iz ang. nucleoplasmic bridges) nastanejo, ko se v anafazi celične delitve centromere dicentričnih kromosomov ali kromatid premikajo proti nasprotnim celičnim polom (El-Zein in sod., 2006). Jedrni brsti (NB; iz angl. nuclear budds) so posledica pomnožitve genov. Pomnoženo DNA celice selektivno izločijo na obrobje jedra. Jedrni brst je z jedrom povezan z ozkim ali širokim pecljem nukleoplazemskega materiala, ki pa se lahko pretrga zaradi česar nastane mikrojedro. Poleg naštetega se s testom mirkojeder določa tudi delitveni indeks celic (NDI; iz angl. nuclear division index).



Slika 14: Dvojedrna celica (A) z mikrojedrom – MN in jedrnim brstom ter dvojedra celica z nukleoplazemskim mostičkom (NPB) (foto: A. Štraser)

Potek testa mikrojeder:

Celice smo nasadili na plostenke s površino 25 cm^2 (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 800 000 celic/plostenko. Po pritrditvi (naslednji dan) smo celice izpostavili za 24 h 50, 100 in 200 μM koncentracijami PhIP oz. 4,8-DiMeIQx ter 50, 100 in 250 μM koncentracijami MeIQx in IQ. V vseh vzorcih HAA in v kontroli topila smo koncentracijo topila (DMSO) uravnali na 1 vol. %. Celice smo izpostavili za 24 h tudi EPM iz sredice in skorje mesa v deležu 0,04, 0,2 in 1 vol. %. Celice so bile tako izpostavljene od 0,02 do 2,35 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje govejega in od 0,03 do 3,77 μM HAA v EPM iz skorje prašičjega ter od 0,26 do 6,4 μM HAA v EPM iz skorje piščančjega mesa. V vseh vzorcih EPM in v kontroli topila smo koncentracijo topila (metanol) uravnali na 1 vol. %. Pri vseh poskusih smo imeli negativno kontrolo in BaP (10 μM) kot pozitivno kontrolo. Po koncu izpostavitve smo celice 2-krat sprali z 1x PBS in dodali sveže gojišče s citohalazinom B (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; založna raztopina 1 mg/ml) ter jih gojili nadaljnih 26 h. V tem času je 40–60% celic HepG2 v kontrolni populaciji v dvojedrnem stanju. Po 26 h smo celice tripsinizirali in skupaj z odstranjenimi gojišči ter 1x PBS, ki smo ga uporabili za spiranje celic, centrifugirali 5 min pri 800 obratih/min in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in razbili pelete celic v 2 ml 1x PBS ter jih ponovno centrifugirali 5 min pri 800 obratih/min in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant do meje centrifugirke, kjer ta postane konična ter vzorcem počasi dodali 5 ml hladne 75 mM raztopine KCl in jih inkubirali 5 min ter jih nato centrifugirali pri 600 obratih/min in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo ponovno odstranili supernatant, tokrat pod mejo, kjer centrifugirka postane konična. Sledila je fiksacija celic s 5 ml Karnojevega fiksativa (raztopina metanola in ocetne kisline v razmerju 3:1) in tremi kapljicami formalaldehida. Vzorce smo nato centrifugirali 5 min pri 600 obratih/min in temperaturi 4 °C ter še 2-krat ponovili fiksacijo, vendar brez dodajanja formalaldehida. Po zadnjem fiksiranju smo odstranili supernatant ter s Karnojevim fiksativom razredčili suspenzijo celic na primerno gostoto. Potem smo nanesli 15 μl celične suspenzije na objektna stekelca in jih posušili pri sobni temperaturi. Preparate smo barvali z akridinoranžnim s koncentracijo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (založna raztopina 10 mg/ml) in analizirali s fluorescenčnega mikroskopa (Nikon Eclipse E800, Japonska) pri 400-kratni povečavi. Za vsak posamezen vzorec smo prešteli 1000 dvojedrnih celic.

Kriteriji za štetje mikrojeder smo povzeli po Fenech (1993; 2000):

- MN so obarvana enako ali manj intenzivno kot glavna jedra,
- MN so okrogle ali ovalne oblike in manjši od $\frac{1}{4}$ premera jedra,
- MN niso povezani z glavnimi jedri ter niso od njih oddaljeni več kot dva premera glavnega jedra,
- če ima celica glavni jedri in veliko manjših jader je verjetno apoptotska – tega ne štejemo,
- šteje se mikrojedra, nukleoplazemske mostičke in jedrne brste.

NDI smo določili s štetjem dodatnih 500 enojedrnih (M1), dvojedrnih (M2) in večjedrnih (M3) celic. NDI smo izračunali po formuli (Fenech, 1993; Fenech, 2000):

$$NDI \text{ (delitveni indeks celic)} = (M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / N \quad \dots (1)$$

Izvedli smo tri neodvisne poskuse. Za analizo razlik med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami smo uporabili Studentov t-test ($p < 0,05$)

3.2.4 Analiza sprememb v izražanju genov v celicah HepG2 pod vplivom HAA in EPM

3.2.4.1 Izpostavitev celic in izolacija celotne RNA

Celotno RNA smo izolirali s TRIzol® reagentom, ki je monofazna raztopina fenola in izotiocianata. TRIzol® reagent razbije celice in razgradi celične komponente, medtem ko RNA ostane nepoškodovana. Po dodatku kloroforma se ločita organska in vodna faza. V vodni fazi je RNA, ki jo oborimo z izopropanolom. Na koncu se s spiranjem RNA v 75% etanolu znebimo nečistoč.

Izpostavitev celic in potek izolacije RNA:

Celice smo nasadili v 25 cm^2 plastenke (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 1 000 000 celic/plastenko in pustili preko noči, da so se pritrstile. Naslednji dan smo

celice izpostavili za 24 h 25, 50, 100 in 200 μM koncentracijam PhIP oz. 4,8-DiMeIQx ter 25, 50, 100 in 250 μM koncentracijam MeIQx in IQ. Delež topila smo uravnali na 1 vol. % DMSO pri vseh celicah izpostavljenim HAA. Celice smo izpostavili tudi 1 vol. % EPM iz sredice in skorje mesa, tj. 2,35 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje govejega mesa; 3,77 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje prašičjega mesa; 6,4 μM koncentraciji HAA v EPM iz skorje piščančjega mesa. Celice smo izpostavili za 24 h tudi čistim HAA v koncentracijah in kombinacijah, ki so bile v 1 vol. % EPM iz skorje prašičjega mesa (1,7 μM PhP; 1,91 μM MeIQx), govejega (0,74 μM PhP; 2,97 μM MeIQx) in piščančjega mesa (2,89 μM PhIP; 3,15 μM MeIQx; 0,37 μM 4,8-DiMeIQx). Testirane kombinacije so bile: PhIP in MeIQx, PhIP in 4,8-DiMeIQx, MeIQx in 4,8-DiMeIQx ter PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx. Pri izpostavitvi celic EPM in kombinacijam čistih HAA smo koncentracijo topila (metanol) uravnali na 1 vol. %. Pri vseh poskusih smo imeli negativno kontrolo in BaP (30 μM) kot pozitivno kontrolo. Po 24 h smo odstranili gojišče, celice sprali z 1x PBS ter jim dodali TRIzol® reagent. Izolacijo RNA smo nadaljevali po navodilih proizvajalca. Na koncu smo izolirano RNA raztopili v vodi očiščeni RNaz in DNaz in jo shranili pri temperaturi -80°C . Poskus smo trikrat neodvisno ponovili.

3.2.4.2 Določanje koncentracije in čistosti DNA

Koncentracijo in čistost RNA smo določili s spektrofotometrom NanoDrop NT-1000 (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Na podlagi izmerjene absorbance pri 260 nm spektrofotometer izračuna vsebnost RNA. Z merjenjem razmerja med absorbanco pri 260 nm in 280 nm pa določi tudi čistost RNA v vzorcu. Vsi vzorci RNA so imeli razmerje v območju med 1,8 in 2, kar pomeni visoko čistost izolirane RNA.

3.2.4.3 Prepis RNA v enoverižno komplementarno cDNA (reverzna transkripcija – RT-PCR)

RNA smo prepisali v cDNA z uporabo kompleta reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ZDA) po navodilih proizvajalca. Reakcija je potekala v aparatu Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA). Komplet vsebuje naključne začetne oligonukleotide, ki se v prvi fazi naključno povežejo z RNA (10 min pri temperaturi 25 °C), potem pa poteka prepisovanje cDNA s pomočjo encima reverzne transkriptaze (2 h pri temperaturi 37 °C). Vzorce DNA smo shranili pri temperaturi –20 °C.

3.2.4.4 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času – qRT-PCR

Kvantitativna reakcija s polimerazo v realnem času je zelo natančna in občutljiva metoda za določanje izražanja genov na ravni transkripcije. V osnovi gre za verižno reakcijo z DNA polimerazo, ki ciklično prepisuje cDNA v vzorcu, količina katere se zato v vsakem ciklu približno podvoji. Aparat po vsakem ciklu pomnoževanja zazna fluorescentni signal, ki nastaja pri pomnoževanju produkta PCR. Količina produkta, ki nastane v vsakem ciklu, je sorazmerna količini fluorescence. Pri qPCR metodi obstaja več načinov fluorescentnega označevanja. Uporabili smo metodo Taqman (Applied Biosystems, ZDA). Pri tej metodi poleg začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na specifična zaporedja genov v cDNA, ki se pomnožuje, dodamo reakciji še sondi, ki se veže na del nukleotidnega zaporedja med obema začetnima oligonukleotidoma. Na 5' koncu sonde je pripeto fluorescentno barvilo, na 3' koncu pa zaviralec signala. Dokler sta obe molekuli vezani na sondi, zaviralec polovi vso svetlobo, ki jo oddaja fluorescentno barvilo. PCR polimeraza, ki ima tudi eksonukleazno aktivnost, začne podaljševati 3' začetni oligonukleotid. Ko pri prepisovanju cDNA pride do vezane sonde, jo razgradi. Pri tem se sprostita nukleotida z barvilm in zaviralcem, ki nista več tesno skupaj in zato lahko zaznamo fluorescentni signal sporočevalnega barvila. Pri prepisu ene molekule tarčnega zaporedja se sprosti ena molekula fluorescentnega barvila, zato je količina oddane svetlobe sorazmerna s količino PCR produkta, ki

nastane v tem ciklu. Zaporedna številka cikla, pri katerem se produkt PCR reakcije pojavi oz. številka cikla v katerem jakost signala doseže določen prag zaznavanja jakosti fluorescence (vrednost Ct), je sorazmerna količini tarčne cDNA na začetku. Vrednost Ct je tako merilo za relativno količino mRNA posameznega gena oz. za stopnjo izražanja gena v vzorcu.

Potek qPCR:

Pripravili smo reakcijsko zmes, ki je poleg cDNA posameznega vzorca vsebovala še univerzalno mešanico za PCR – TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA), ki vsebuje Taq polimerazo ter vse potrebne kofaktorje. Začetne oligonukleotide za pomnoževanje posameznih genov in 5'-FAM (fluorescenčno barvilo) ter 3'-TAMRA (zaviralec) označeno sondo TaqMan smo naročili kot pripravljenе teste (Taqman Gene Expression Assays, Applied Biosystems, ZDA). Pomnoževali smo metabolne gene I. stopnje (*CYP1A1*, št. testa Hs00153120_m1; *CYP1A2*, Hs01070374_m1) in II. stopnje metabolizma (*NAT2*, št. testa Hs00605099_m1; *SULT1A1*, Hs00419411_m1; *UGT1A1*, Hs02511055_s1; *GSTA1-1*, Hs00275575_m1), gene, ki se odzovejo na poškodbe DNA (*P53*, št. testa Hs00153349_m1; *MDM2*, Hs00234753_m1; *CDKN1A*, Hs00355782_m1; *GADD45α*, Hs00169255_m1;) in gene, ki sodelujejo pri regulaciji apoptoze (*BAX*, št. testa Hs99999001_m1; *BCL-2*, Hs00608023_m1; *CASP3*, Hs00234387_m1; *CASP7*, Hs00169152). Kot notranjo kontrolo, na katero smo normalizirali izražanje preiskovanih genov, smo uporabili pripravljen test za gen GAPDH (Human Endogenous Controls, kat. št.: 4310884E, Applied Biosystems, ZDA) in reakcijo izvedli v enaki reakcijski zmesi kot reakcijo za specifične gene. Normalizacija na notranjo kontrolo prepreči napako zaradi morebitne različne vsebnosti cDNA v vzorcu. Reakcije pomnoževanja so potekale na mikrotitrski plošči s 384 jamicami (Applied Biosystems, ZDA). V jamico smo nanašali 9 µl reakcijske zmesi in 1 µl vzorca. Reakcijska zmes je bila sestavljena iz 0,5 µl pripravljenе mešanice sonde in začetnikov za preiskovani gen, 5 µl univerzalne PCR mešanice in 3,5 µl destilirane vode. Reakcije so potekale v aparaturi ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA). Temperaturni potek reakcije je bil: 2 min pri 50 °C, 10 min pri 95 °C (aktivacija DNA polimeraze) in 40 ponovitev cikla: 15 s pri 95 °C (denaturacija) in 1 min pri 60 °C (pripenjanje začetnikov in

podvajanje DNA). Relativno izražanje genov smo izračunali z algoritmom $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ki izražanje gena poda relativno na kontrolo. Izračun temelji na razlikah v vrednostih Ct vzorca ter kontrole, ki so posledica različne vsebnosti tarčne cDNA:

$$\Delta Ct = Ct_{tarčnega\ gena} - Ct_{endogene\ kontrole\ GAPDH} \text{ (izračunamo za vse vzorce)} \quad \dots (2)$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{izpostavljenega\ vzorca} - \Delta Ct_{kontrolnega\ vzorca}$$

Dobljeno RNA v vsakem izmed treh ponovljenih poskusov izpostavitev celic smo s kvantitativno reakcijo s polimerazo v realnem času delali v dveh paralelah. Z enosmerno analizo variance (ANOVA) smo analizirali razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami (Dunnett post test, $p<0,05$).

3.2.5 Analiza izražanja proteinov v celicah HepG2 pod vplivom HAA

3.2.5.1 Priprava proteinskih vzorcev

Celice smo nasadili v 25 cm^2 plostenke (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 1 000 000 celic/plostenko ter pustili preko noči, da so se celice pritrstile. Naslednji dan smo celicam odstranili gojišče in jim dodali sveže gojišče s $100\text{ }\mu\text{M}$ PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx ali IQ. Pri vseh izpostavitvah celic in v kontroli topila smo koncentracijo DMSO uravnali na 1 vol.%. V poskusu smo uporabili negativno in pozitivno kontrolo ($30\text{ }\mu\text{M}$ BaP). Po 24 h izpostavitev smo celice 2-krat sprali v 1x PBS ter jih nato postrgali v 1x PBS. Po centrifugiranju (5 min, 1000 obratov/min) smo odstranili supernatant ter dodali homogenizacijski pufer. Sestava homogenizacijskega pufra je navedena v Prilogi D. Celice smo razbili s tremi cikli zaporednega zamrzovanja v tekočem dušiku in odtajanja pri temperaturi $37\text{ }^\circ\text{C}$. Sledili so trije cikli sonifikacije (razbijanje celic z ultrazvokom) po 10 s, vmes 1 min na ledu. Homogenat smo centrifugirali v predohlajeni centrifugi ($4\text{ }^\circ\text{C}$) 30 min pri 12000 obratih/min. Supernatant s proteini smo razdelili in shranili pri temperaturi $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Koncentracijo proteinov smo izmerili s testom Bradford. Vsak vzorec smo razredčili 10-krat in mu dodali Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Labs, Nemčija). Ta se ob vezavi na proteine

obarva modro, intenziteta barve pa je sorazmerna s koncentracijo proteinov. Absorbanco smo izmerili pri 595 nm s spektrofotometrom (Tecan, Avstria). Koncentracije proteinov v vzorcih smo izračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili iz govejega serumskega albumina (BSA, Sigma-Aldrich, Nemčija) znanih koncentracij.

3.2.5.2 Prenos Western

Pri metodi prenosa Western najprej proteine ločimo glede na velikost s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z denaturiranjem. Potem jih iz gela prenesemo na PVDF (poliviniliden difluorid) membrano. Izbrane proteine na membrani zaznamo z uporabo specifičnih, z encimom konjugiranih protiteles, ki razgradijo dodani substrat.

Potek prenosa Western:

Vsek vzorec proteinov (ustrezen volumen enakovreden 20 µg celokupnih proteinov) smo zmešali s 5 µl nanašalnega pufra z DTT (Fermentas, Kanada) ter proteine denaturirali s segrevanjem 5 min pri temperaturi 95 °C. Tako pripravljene vzorce smo nanesli na 12% SDS separacijski poliakrilamidni gel. Sestava gela je navedena v Prilogi D. Na gel smo nanesli tudi proteinski standard (Fermentas, Kanada) z velikostmi od 250 kDa do 17 kDa. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru (Priloga D) 30 min pri napetosti 80 V ter nadaljnjih 120 min pri 100 V. Po končani elektroforezi smo gel s proteini prenesli na PVDF membrano s pomočjo BioRad sistema za moker prenos (Bio-Rad Labs, Nemčija). Prenos je potekal preko noči v pufru za prenos (Priloga D) pri temepraturi 4 °C in napetosti 16 V. Nato smo z mlečnimi proteini (raztopina za blokiranje – Priloga D) blokirali prosta vezavna mesta na membrani 3 h na stresalniku pri sobni temperaturi. Membrano smo nato inkubirali preko noči v raztopini primarnega protitelesa (Abcam, Združeno kraljestvo) na stresalniku pri temperaturi 4 °C. Določevali smo izražanje P53 (kat. št. ab1101), CDKN1A (kat. št. ab102013), BAX (kat. št. ab7977) in BCL-2 (kat. št. ab59348) proteinov in GAPDH (kat. št. ab9485), ki je služil kot kontrola enakomernega nanosa vzorcev proteinov. Protitelesa smo pred uporabo razredčili: 1:500 P53 in BCL-2, 1:1000 CDKN1A in BAX, 1:5000 β-

aktin. Po inkubaciji s primarnimi protitelesi smo membrano sprali 5-krat po 5 min v raztopini za blokiranje ter jo inkubirali 60 min v 1:2500 razredčeni raztopini s hrenovo peroksidazo konjugiranih sekundarnih proti-mišijih ali proti-zajčjih protiteles (oba Promega, ZDA). Sledilo je spiranje membrane v raztopini za blokiranje 5-krat po 5 min. Za zaznavanje izbranega proteina smo uporabili komplet reagentov za kemiluminiscenco (ECL) in avtoradiografski film (GE Healthcares, Združeno kraljestvo) ter razvijalec in fiksir (Kodak, ZDA). Zaznavanje smo izvedli po navodilih proizvajalca kompleta reagentov za kemiluminiscenco. Reakcija na membrani je potekala 5 min v temi. Filme smo izpostavili reakciji za 15 do 30 s (čas izpostavitve smo določili empirično) ter jih nato razvili, fiksirali in sprali z vodo.

3.2.6 Določanje vpliva HAA in EPM na apoptozo celic HepG2

3.2.6.1 Izpostavitev celic HepG2 s HAA in EPM piščanca

Pred izvedbo vsakega poskusa smo celice nasadili v želeno plastenko in pustili preko noči, da se pritrđijo. Naslednji dan smo celice izpostavili za 24 h 25, 50, 100 in 200 μM koncentracijam PhIP oz. 4,8-DiMeIQx ter 25, 50, 100 in 250 μM koncentracijam MeIQx in IQ (v vseh izpostavitvah in v kontroli topila smo uravnali koncentracijo DMSO 1 vol.%) ter 1 vol.% EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa, tj. 6,4 μM koncentracija HAA v EPM skorje piščančjega mesa. Celice smo izpostavili za 24 h tudi čistim HAA v koncentracijah in kombinacijah, ki so bile v 1 vol.% EPM skorje piščančjega mesa (2,89 μM PhIP; 3,15 μM MeIQx; 0,37 μM 4,8-DiMeIQx). Testirane kombinacije so bile: PhIP in MeIQx ter PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx. V kontroli topila in v izpostavitvah EPM in kombinacijah čistih HAA smo koncentracijo metanola uravnali na 1 vol.%. Pri vseh poskusih smo uporabili negativno kontrolo in 1 μM STS za pozitivno kontrolo.

3.2.6.2 Določanje spremembe mitohondrijskega membranskega potencial (MMP) v celicah HepG2

Ena od značilnosti apoptoze je tudi povečanje prepustnosti mitohondrijske membrane. Spremembo mitohondrijskega membranskega potenciala v živih celicah lahko določamo s pomočjo fluorescenčnega barvila 5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-karbocianin jodidom (JC-1) (Cossarizza in sod., 1993). JC-1 je lipofilen kation, ki vstopa v žive celice in se kopiči v mitohondrijih, kjer tvori aggregate, ki oddajajo svetlobo v rdečem delu spektra. Pri nizkem mitohondrijskem membranskem potencialu pa prehaja v citosol, kjer ostane v obliki monomerov, ki oddajajo svetlobo v zelenem delu spektra (Reers in sod., 1991).

Potek poskusa:

Celice smo nasadili na črno ploščo s 96 jamicami (Nunc, ZDA) z gostoto 125 000 celic/ml. Po pritrditvi (naslednji dan) smo celice izpostavili kot je opisano v poglavju 3.2.7.1 v petih paralelkah za posamezno koncentracijo HAA, EPM piščančjega mesa oz. različne kombinacije HAA. Po končani izpostavitvi smo gojišču dodali 200 µl probe JC-1 (10 µM v 1x PBS; založna raztopina 10 mM v DMSO) ter inkubirali 30 min pri temperaturi 37 °C v 5% CO₂ atmosferi. Po inkubaciji smo probo JC-1 odstranili, celice sprali z 1x PBS in dodali 100 µl 1x PBS. S spektrofluorimetrom (Tecan, Avstrija) smo izmerili intenziteto zelene fluorescence pri valovni dolžini 485 nm (ekscitacija) in 535 nm (emisija) ter intenziteto rdeče fluorescence pri valovni dolžini 535 nm (ekscitacija) in 595 nm (emisija). Povišano razmerje med zeleno in rdečo fluorescenco nakazuje na spremembo mitohondrijskega membranskega potenciala. Poskus smo trikrat neodvisno ponovili. Z enosmerno analizo variance (ANOVA) smo analizirali razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami (Dunnett post test, p<0,05).

3.2.6.3 Določanje vpliva HAA in EPM piščanca na izgubo asimetrije celične membrane celic HepG2 s pretočno citometrijo

Ena od zgodnjih morfoloških sprememb apoptotskih celic je izguba asimetrije plazemske membrane. Pri tem se membranski fosfolipid fosfatidil serin (FS) prenese iz notranjega sloja v zunajšnji sloj plazemske membrane in se tako izpostavi zunajceličnemu okolju. Kljub temu struktura in funkcija membrane ostaneta ohranjeni do pozne apoptoze. Aneksin V je protein, ki se z visoko afiniteto veže na FS, vendar samo na celice, kjer je FS izpostavljen na površini. Aneksin V je označen s fluorescenčnim barvilkom (fluorescein isothiocianat – FITC). Za določanje števila celic v zgodnjih stopnjah apoptoze uporabljamo fluorescenčno označen Aneksin V, delež obarvanih celic pa izmerimo s pretočnim citometrom. Intenziteta fluorescentnega signala, ki se pretvori v digitalnega, je sorazmerna številu izpostavljenih molekul FS (Koopman in sod., 1994). V poznejših stopnjah celične smrti (kot posledica apoptoze, nekroze ali drugih oblik celične smrti) postane celična membrana tudi bolj prepustna. Zato pri barvanju celic s FITC označenim Aneksinom V dodamo še propidijev jodid (PI), ki je vitalno barvilo. PI nam tako omogoči ločevanje med zgodnje in pozno apoptotskimi celicami, hkrati pa tudi določitev deleža ne-apoptotskih mrtvih celic (npr. nekrotičnih). Pozno apoptotske celice so dvojno obarvane, nekrotične pa samo s propidijevim jodidom.

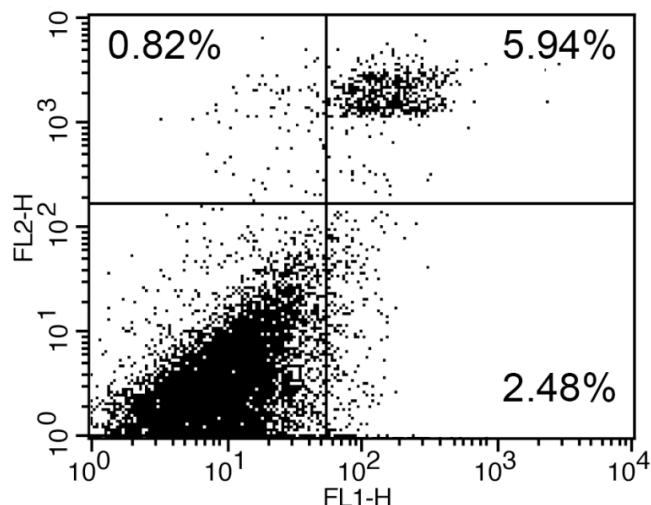
Potek poskusa:

Celice smo nasadili na plošče s 6 jamicami (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 400 000 celic/jamico. Po pritrditvi (naslednji dan) smo celice izpostavili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.7.1. Po izteku izpostavitve smo tripsinizirane celice združili z odstranjenimi gojišči. Tako smo zajeli tudi plavajoče celice. Po centrifugiranju (800 obratov/min, 5 min, 4 °C) smo celice 2-krat sprali s hladnim 1x PBS in ponovno centrifugirali (800 obratov/min, 5 min, 4 °C). Nato smo jih resuspendirali v 300 µl 1x vezavnega pufra (založna raztopina 10x vezavni pufer: 0,1 M HEPES, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂, destilirana voda) in barvali s FITC-Aneksinom V ter PI (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II) po navodilih proizvajalca (BD Pharmingen, ZDA). Po inkubaciji (15 min) v temi smo celicam dodali še 200 µl 1x

vezavnega pufra. Intenziteto fluorescence smo izmerili s pretočnim citometrom (BD FACSCalibur™, ZDA).

Merili smo število celic (10 000 dogodkov), ki so fluorescirale na kanalih FL1-H (FITC-Aneksin V) in FL2-H (PI) (Slika 15). Za nastavitev napetosti FL1-H in FL2-H ter kompenzacije napetosti FL1–FL2 ter FL2–FL2 smo uporabili naslednje vzorce:

- negativno kontrolo (NK) – neizpostavljeni celici, ki niso bile obarvane,
- pozitivno kontrolo 1 (PK1) – celice izpostavljeni STS, obarvane samo s FITC-Aneksinom V,
- pozitivno kontrolo 2 (PK2) – celice izpostavljeni STS, obarvane samo s PI.



Slika 15: Primer določitve števila apoptotskih celic barvanih s FITC-Aneksinom V in PI na pretočnem citometru. Posamezna pika je signal, ki ga odda celica. Na kanalu FL1-H se zazna barvilo FITC-Aneksin V, na kanalu FL2-H pa propidijev jodid (PI). Pozno apoptotske celice so dvojno obarvane, nekrotične pa samo s propidijevim jodidom. V spodnjem levem kvadrantu so neobarvane (žive) celice in v spodnjem desnem kvadrantu so celice obarvane z Aneksinom V (zgodnje apoptotske celice). V zgornjem desnem kvadrantu so dvojno obarvane celice (Aneksin V in PI) – pozno apoptotske celice in v zgornjem levem kvadrantu celice obarvane samo s PI – nekrotične celice. PI je vitalno barvilo (prehaja samo v mrtve celice).

3.2.6.4 Merjenje aktivnosti efektorskih kaspaz 3 in 7

Kaspaze so specifične citosolne proteaze, katerih vloga je, da celico programirano razgradijo na apoptotska telesca. V celicah so prisotne v neaktivni obliki (proencimi). Aktivirajo se s proteolitskimi cepitvami. Poznamo iniciatorske kaspaze (-2, -8, -9, -10) in efektorske kaspaze (-3, -6, -7) (Orrenius, 2004). Kaspaza 8 in 9 aktivirata kaspazo 3 s proteolitsko cepitvijo, kaspaza 3 pa lahko nato cepi celične proteine ali pa s cepitvami aktivira še dodatne kaspaze, npr. kaspazo 7 (Salvesen in Dixit, 1997; Slee in sod., 1999). Aktivnost kaspaz 3/7 smo merili s testnim kitom Apo-ONE™ Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega, ZDA). Apo-ONE™ Homogenous Caspase-3/7 pufer hitro in uspešno lizira/permeabilizira sesalske celice in omogoča optimalno encimatsko aktivnost kaspaze3/7. Substrat kaspaze3/7, rodamin110 (bis-(N-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartat amin; Z-DEVD-R110) je v profluorescentni obliki. V vzorce celic dodamo mešanico pufra in substrata. Kaspazi 3/7 odcepita peptid DEVD, zato nastali rodamin 110 fluorescira. Jakost fluorescenčnega signala je v sorazmerju z aktivnostjo kaspaze 3/7 v vzorcu celic.

Potek testa:

Celice smo nasadili na črno ploščo s 384 jamicami (Costar, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 60 000 celic/ml. Preko noči smo jih pustili, da se pritrđijo na podlago. Nato smo celicam odstranili gojišče in jih izpostavili kot je opisano v poglavju 3.2.7.1 v štirih paralelkah za posamezno koncentracijo HAA, EPM piščančjega mesa oz. različnih kombinacij HAA. Po koncu izpostavitve smo v vsako luknjico dodali enak volumen Caspase-3/7 reagenta, kot je bil volumen celične suspenzije v posamezni luknjici. Ploščo smo nato 30 s stresali na stresniku. Sledila je 1 h inkubacija pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo izmerili fluorescenco s spektrofluorimetrom (Tecan, Avstrija) pri valovni dolžini 485 nm (ekscitacija) in 530 nm (emisija). Poskus smo dvakrat neodvisno ponovili. Z enosmerno analizo variance (ANOVA) smo analizirali razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami (Dunnett post test, $p < 0,05$).

4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST HAA V EKSTRAKTIH PEČENEGA MESA

Ekstrakcijo HAA iz pečenega mesa ter analizo vsebnosti in sestavo HAA v ekstraktih smo določali s pomočjo tekočinske kromatografije sklopljene z masnim spektrometrom (HPLC-MS/MS) in z masnoselektivnim detektorjem v ESI⁺ načinu. Ekstrakcijo in analizo ekstraktov smo opravili na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

V ekstraktih skorje pečenega mesa smo določili tri heterociklične aromatske amine: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin (MeIQx) in 2-amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]kinoksalin (4,8-DiMeIQx) (Preglednica 1). Količina ostalih HAA je bila pod mejo zaznavnosti (0,001 µg/ml). V ekstraktih sredice pečenega mesa nismo zaznali HAA. Največjo vsebnost HAA smo izmerili v skorji piščančjega mesa (140,24 µg/ml), nato v skorji prašičjega (82,54 µg/ml), najmanj pa v skorji govejega mesa (51,61 µg/ml). V EPM je po količini prevladoval MeIQx, razen pri EPM iz govejega mesa, kjer smo izmerili največ PhIP, vendar pa so bile razlike med obema koncentracijama majhne. Najmanjši delež v EPM je imel 4,8-DiMeIQx, katerega koncentracija je bila najmanj 8-krat manjša od koncentracije najpogostejšega HAA v EPM. Potrdili smo, da ekstrakti pečenega mesa niso vsebovali akrilamida, ki bi lahko vplival na rezultate toksikoloških testiranj.

Preglednica 1: Sestava in vsebnost HAA v ekstraktih iz skorje pečenega govejega, prašičjega in piščančjega mesa ter v 100-krat razredčenih ekstraktih (1 vol.%). Spodnja meja zaznavnosti je bila 0,001 µg/ml. Molarne koncentracije so izračunane na podlagi končnega volumna ekstrakcije (1 ml) in gostote ekstrakta.

Table 1: HAA content in grilled meat extracts of beef, pork and chicken meat and HAA content in 100-times diluted extracts. Detection limit was 0.001 µg/ml. Molar concentrations were calculated on the basis of final volume of extraction (1 ml) and concentrations of extracts.

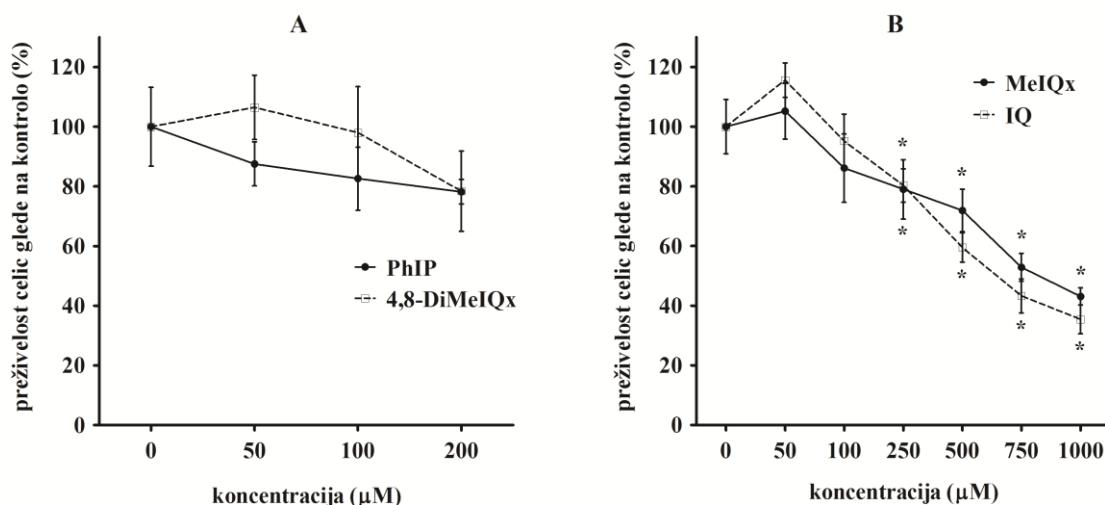
		1 vol.% EPM iz skorje ^a			
HAA v EPM iz skorje govejega mesa	µg/ml	µM	µg/ml	µM	
PhIP	27,03	120,53	0,27	1,21	
MeIQx	22,24	104,30	0,224	1,04	
4,8-DiMeIQx	2,34	10,30	0,023	0,10	
vsi HAA	51,61	235,12	0,516	2,35	
HAA v EPM iz skorje prašičjega mesa					
PhIP	38,23	170,47	0,382	1,71	
MeIQx	40,83	191,47	0,408	1,91	
4,8-DiMeIQx	3,48	15,31	0,035	1,53	
vsi HAA	82,54	377,26	0,825	3,77	
HAA v EPM iz skorje piščančjega mesa					
PhIP	64,7	288,5	0,647	2,88	
MeIQx	67,21	315,18	0,672	3,15	
4,8-DiMeIQx	8,33	36,65	0,083	0,37	
vsi HAA	140,24	640,4	1,402	6,4	

^a 1 vol.% EPM iz skorje predstavlja 100-kratno razredčitev vzorca, ki smo jo v poskusih porabljali kot največjo testirano koncentracijo

4.2 VPLIV HAA IN EPM NA PREŽIVETJE IN CELIČNI CIKEL CELIC HepG2

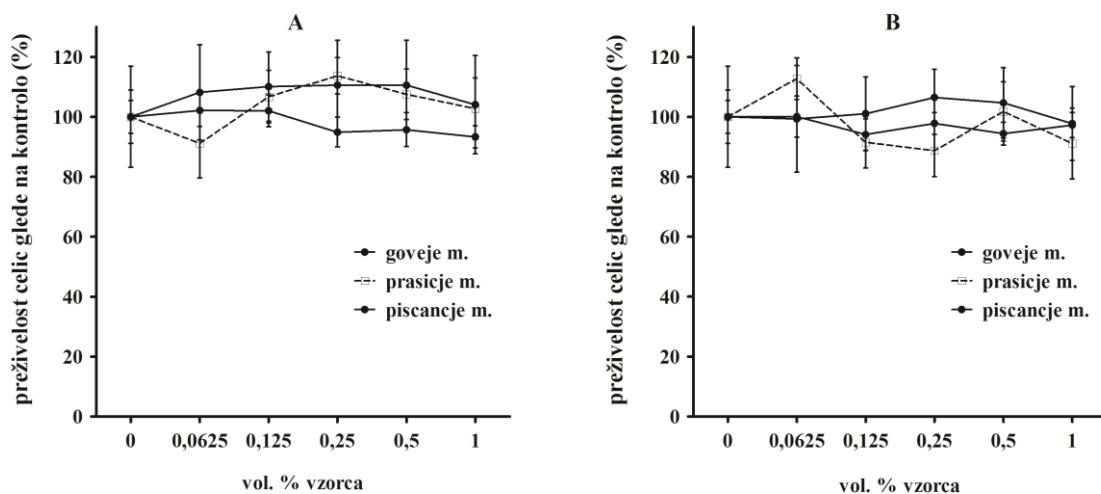
4.2.1 Vpliv na preživetje

Citotoksičnost HAA in EPM smo določali z MTS oz. MTT testom po 24-urni izpostavitvi celic HepG2. Preživetje celic se je zmanjšala le pri MeIQx in IQ v koncentracijah večjih od 250 μM (Slika 16), kjer je bilo preživetje celic zmanjšano za več kot 30%. Pri največji testirani koncentraciji MeIQx in IQ (500 μM) je bilo preživetje celic zmanjšano za 57% oz. 65%. PhIP in 4,8-DiMeIQx ter EPM v testiranih koncentracijah niso vplivali na preživetje celic (Slika 16 in 17).



Slika 16: Vpliv HAA na preživetje celic HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 50–200 μM PhIP in 4,8-DiMeIQx (A) ter 50–1000 μM MeIQx in IQ (B). Nato smo preživetje določili z MTS testom. Preživetje je podano kot % preživelih celic glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov \pm SD). Preživetje celic se med negativno kontrolo in kontrolo topila ni statistično značilno razlikovalo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Figure 16: The effect of HAA on the viability of HepG2 cells. The cells were exposed for 24 h to different concentrations off HAA: 50–200 μM PhIP and 4,8-DiMeIQx (A) and 50–1000 μM MeIQx and IQ (B). Viability was determined with the MTS assay and presented as % of survived cells compared to vehicle control (average of three independent experiments \pm SD). The viability of the cells in the vehicle control did not differ significantly from that of nontreated control cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between vehicle control and treated cells (1-way ANOVA; Dunnett's test, $p<0.05$).



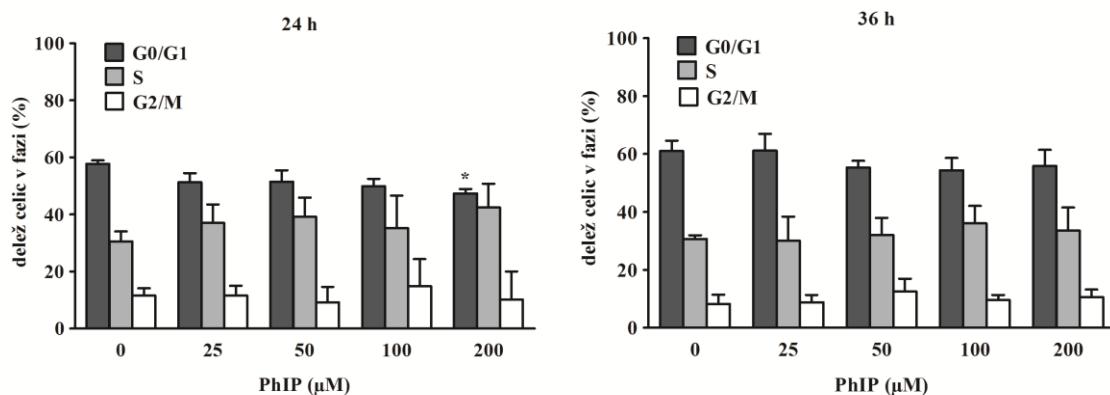
Slika 17: Vpliv ekstraktov pečenega mesa na preživetje celic HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili različnim razredčinam (0,0625–1 vol.%) EPM iz skorje (A) in sredice (B), nato pa smo preživetje določili z MTT testom. 1 vol.% EPM iz skorje mesa je ekvivalenten 2,35 µM koncentraciji HAA v EPM govedine, 3,77 µM koncentraciji HAA v EPM prašiča in 6,4 µM koncentraciji HAA v EPM piščanca (Preglednica 1). Preživetje celic se med negativno kontrolo in kontrolo topila ni statistično značilno razlikovala. Preživetje je podano kot % preživelih celic glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD). (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

Figure 17: The effect of grilled meat extracts from crust and core on the viability of HepG2 cells. The cells were exposed for 24 h to different dilutions (0.0625–1 vol.%) of GME from crust (A) and core (B). 1 vol.% GME from core is equivalent to 2.35 µM concentration of HAA in beef, 3.77 µM concentration of HAA in pork and 6,4 µM concentration of HAA in chicken GME (Table 1). Viability was determined with the MTT assay and is presented as % of survived cells compared to vehicle control (average of three independent experiments ± SD). The viability of the cells in the vehicle control did not differ significantly from that of nontreated control cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between vehicle control and treated cells (1-way ANOVA; Dunnett's test, p<0.05).

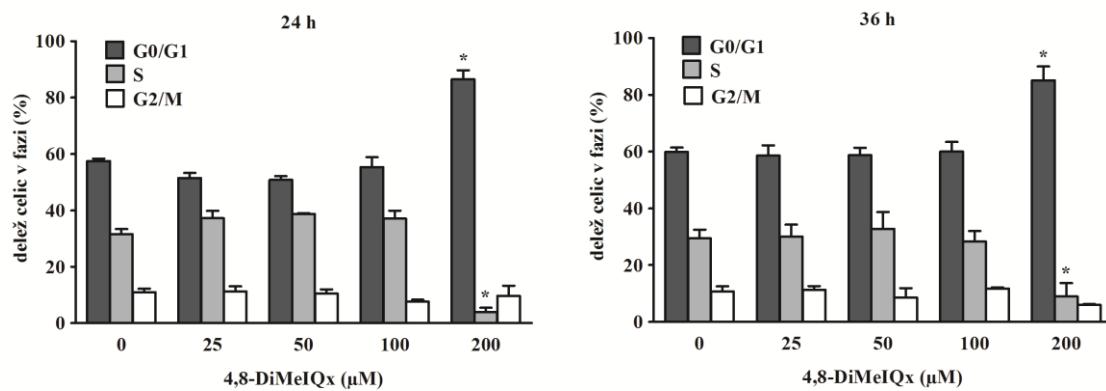
4.2.2 Vpliv na celični cikel

Spremembe v celičnem ciklu celic HepG2 po izpostavitvi posameznim in kombinacijam HAA ter EPM piščanca smo merili s pretočno citometrijo kot je opisano v poglavju 3.2.2.2.

A



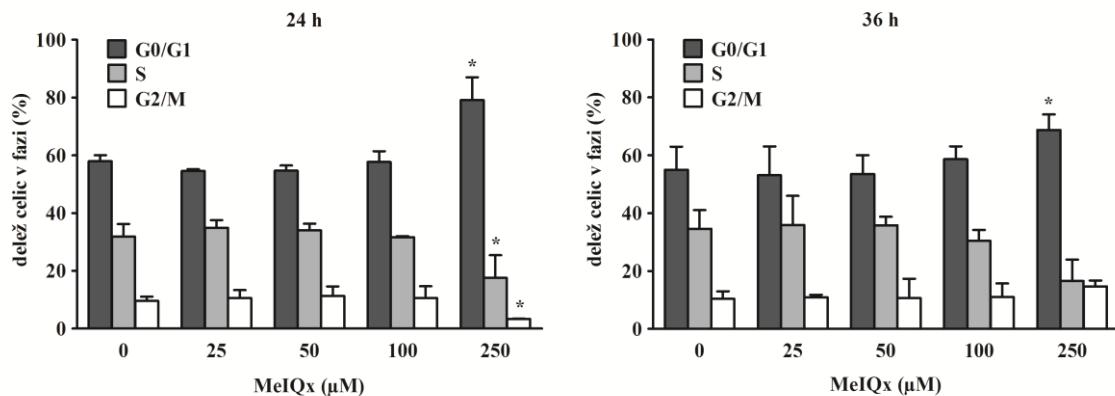
B



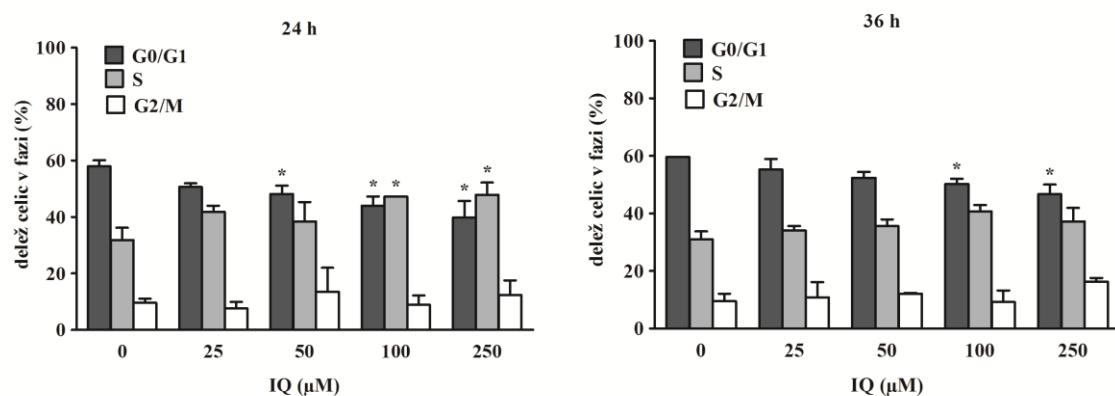
Slika 18: Vpliv PhIP in 4,8-DiMeIQx na spremembo celičnega cikla celic HepG2. Celice smo za 24 h oz. 36 h izpostavili različnim koncentracijam PhIP (A) in 4,8-DiMeIQx (B). Nato smo celice fiksirali, barvali s propidijevim jodidom in analizirali s pretočnim citometrom. Prikazan je povprečni delež celic (%) treh ponovitev poskusa \pm SD. Razlik v celičnem ciklu celic med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Figure 18: Cell-cycle distribution of HepG2 cells after exposure to PhIP and 4,8-DiMeIQx. The cells were exposed for 24 h and 36 h to different concentrations of PhIP (A) and 4,8-DiMeIQx (B). The cells were fixed and stained with propidium iodide and the DNA content analyzed with the flow cytometry. Results are presented as average portion (%) of the cells in three independent experiments \pm SD. No statistical significant differences in cell-cycle of HepG2 were observed between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between vehicle control and treated cells (One way ANOVA; Dunnett's test, $p<0.05$).

C



D



Slika 19: Vpliv MeIQx in IQ na spremembo celičnega cikla celic HepG2. Celice smo za 24 h oz. 36 h izpostavili različnim koncentracijam MeIQx (C) in IQ (D). Nato smo celice fiksirali, barvali s propidijevim jodidom in analizirali s pretočnim citometrom. Prikazan je povprečni delež celic (%) treh ponovitev poskusa \pm SD. Razlik v celičnem ciklu celic med negativno kontrolo in kontrolno topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Figure 19: Cell-cycle distribution of HepG2 cells after exposure to MeIQx and IQ. The cells were exposed for 24 h and 36 h to different concentrations of MeIQx (C) and IQ (D). The cells were fixed and stained with propidium iodide and the DNA content analyzed with the flow cytometry. Results are presented as average portion (%) of the cells in three independent experiments \pm SD. No statistical significant differences in cell-cycle of HepG2 were observed between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between vehicle control and treated cells (One way ANOVA; Dunnett's test, $p<0.05$).

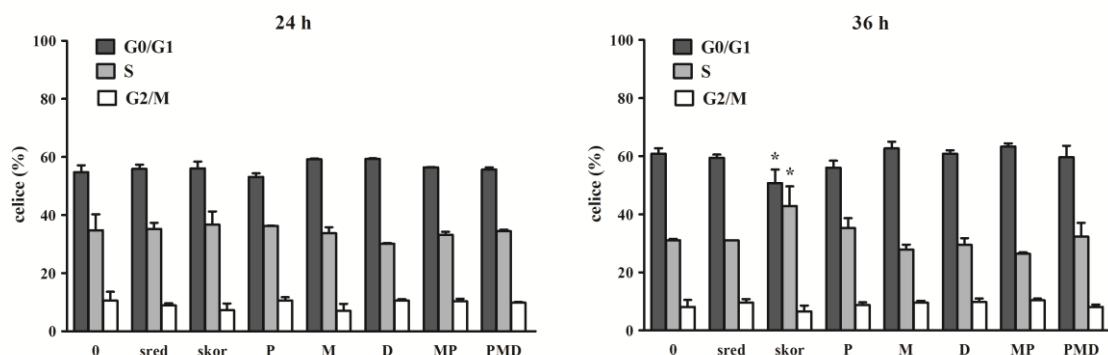
Po 24 h izpostavitve celic HepG2 različnim koncentracijam IQ (25–250 μ M) se je delež celic v G₀/G₁ fazi celičnega cikla zmanjševal, delež celic v S fazi pa povečeval od doze

odvisno (Slika 19D). Pri največji testirani koncentraciji IQ je bil delež celic v G₀/G₁ fazi po 24 h izpostavitvi 40%, kar je za 18% manj kot v kontrolni skupini celic. Delež celic v S fazi pa se je statistično značilno povečal za 16% v primerjavi s kontrolno skupino celic, kjer je bil 31%. Podobno, od doze odvisno, se je zmanjševal delež celic v G₀/G₁ fazi po 36 h izpostavitve celic IQ (Slika 19D), vendar manj izrazito kot po 24 h izpostavitve. Tako je bil delež celic v G₀/G₁ fazi po 36 h izpostavitve največji koncentraciji IQ (250 µM) 47%, v kontrolni skupini pa 60%.

PhIP je podobno kot IQ od doze odvisno zmanjšal delež celic v G₀/G₁ fazi celičnega cikla po 24 h izpostavitve, vendar statistično značilno le pri največji testirani koncentraciji (Slika 18A). Delež celic v G₀/G₁ fazi izpostavljenim 200 µM PhIP je bil 47%, kar je 10% manj v primerjavi s kontrolno skupino celic. Po 36 h pa PhIP ni povzročil sprememb v celičnem ciklu celic HepG2 (Slika 18A). Nasprotno sta 4,8-DiMeIQx in MeIQx pri največji testirani koncentraciji (200 oz. 250 µM) ustavila celični cikel celic HepG2 v G₀/G₁ fazi tako po 24 h kot po 36 h izpostavitve (Slika 18B in 19C). Delež celic v G₀/G₁ fazi je bil po 24 h izpostavitve 200 µM 4,8-DiMeIQx 87% in po 36 h izpostavite 85%, kar je za 29% in 25% več od kontrolne skupine celic. MeIQx (250 µM) je po 24 h izpostavitve povečal delež celic v G₀/G₁ fazi za 21% in po 36 h izpostavitve za 14% v primerjavi s kontrolno skupino celic, kjer je delež celic v G₀/G₁ fazi znašal 58% oz. 54%.

Po 24 h izpostavitvi celic HepG2 1 vol.% EPM iz skorje piščančjega mesa in kombinacijam HAA v enakih koncentracijah, kot so bile določene v EPM piščanca nismo zaznali sprememb v celičnem ciklu celic HepG2 (Slika 20). Po 36 h izpostavitve pa je le EPM iz skorje piščančjega mesa statistično značilno zmanjšal delež celic G₀/G₁ fazi oz. statistično značilno povečal delež v S fazi celičnega cikla. Delež celic v S fazi je bil tako 43%, kar je za 12% več, kot je bil delež celic v S fazi kontrolne skupine celic. Prav tako se je po 36 h izpostavitve EPM iz skorje piščančjega mesa delež celic v S fazi povečal, vendar statistično neznačilno, v primerjavi s skupino celic, ki je bila izpostavljena kombinaciji treh HAA (0,37 µM 4,8-DiMeIQx, 3,15 µM MeIQx in 2,88 µM PhIP). Statistično značilno razliko v deležu celic v G₀/G₁ fazi celičnega cikla pa smo določili med celicami izpostavljenim EPM skorje in celicami izpostavljenim

omenjeni kombinaciji treh HAA (4,8-DiMeIQx, MeIQx in PhIP) po 36 h izpostavitev. Delež celic v G₀/G₁ fazi izpostavljenim EPM iz skorje piščančjega mesa je tako znašal 51%, kar je za 9% manj od deleža celic v G₀/G₁ fazi skupine celic izpostavljenih kombinaciji treh HAA.



Slika 20: Vpliv EPM piščanca in kombinacij HAA na spremembo celičnega cikla celic HepG2.
 Celice smo za 24 oz. 36 h izpostavili 1 vol.% EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa ter kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM (Preglednica 1). Nato smo celice fiksirali, barvali s propidijevim jodidom in analizirali s pretočnim citometrom. Prikazan je povprečni delež celic (%) treh ponovitev poskusa \pm SD. Razlik v celičnem ciklu celic med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Legenda grafa: sred ... 1 vol.% EPM sredice; skor ... 1 vol.% EPM skorje (ekvivalent 6,4 μ M HAA); P ... 2,88 μ M PhIP; M ... 3,15 μ M MeIQx; D ... 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx; MP ... kombinacija 2,88 μ M PhIP in 3,15 μ M MeIQx; PMD ... kombinacija 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3,15 μ M MeIQx in 2,88 μ M PhIP

Figure 20: Cell-cycle distribution of HepG2 cells after exposure to grilled meat extract from chicken meat and combinations of HAA. The cells were exposed for 24 and 36 h to 1 vol.% GME from core and crust of chicken meat and different combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. The cells were fixed and stained with propidium iodide and the DNA content analyzed with the flow cytometry. Results are presented as average portion (%) of the cells in three independent experiments \pm SD. No statistical significant differences in cell-cycle of HepG2 cells were observed between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between vehicle control and treated cells (One way ANOVA; Dunnett's test, $p<0.05$).

Graph legend: sred ... 1 vol.% GME core; skor ... 1 vol.% GME crust (equivalent 6.4 μ M HAA); P ... 2.88 μ M PhIP; M ... 3.15 μ M MeIQx; D ... 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx; MP ... combination of 2.88 μ M PhIP and 3.15 μ M MeIQx; PMD ... combination of 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3.15 μ M MeIQx and 2.88 μ M PhIP

4.3 VPLIV HAA IN EPM NA IZRAŽANJE GENOV, KI KODIRajo METABOLNE ENCIME CELIC HepG2

Celice HepG2 smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA (25–250 µM), 1 vol. % EPM iz skorje in sredice govejega, prašičjega in piščančjega mesa ter različnim kombinacijam HAA, ki se pojavljajo v EPM skorje (Preglednica 1). Z metodo qRT-PCR smo preverjali spremembe v izražanju šestih genov, ki kodirajo metabolne encime I. (CYP1A1, CYP1A2) in II. (NAT2, SULT1A1, UGT1A1, GSTA1) stopnje metabolizma (Preglednici 2 in 3). Izbrani geni, ki kodirajo metabolne encime, sodelujejo pri metabolizmu HAA, kot je opisano v poglavju 2.3.1.

HAA so povzročili statistično značilno povečano izražanje genov *CYP1A1* in *CYP1A2* pri vseh testiranih koncentracijah (Preglednica 2). Izražanje *CYP1A1* je bilo v povprečju večje od izražanja *CYP1A2*, razen pri izpostavitvi celic IQ. Največje spremembe v izražanju *CYP1A1* so povzročili 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ, najmanj pa PhIP. Podobno smo ugotovili za *CYP1A2*, katerega izražanje je bilo največje v celicah izpostavljenim IQ, nato v celicah izpostavljenim 4,8-DiMeIQx, MeIQx ter PhIP. V povprečju je bilo izražanje *CYP1A1* v celicah izpostavljenim PhIP 8-krat manjše od izražanja v celicah pod vplivom IQ ter kar 46-krat manjše v celicah izpostavljenim 4,8-DiMeIQx. Izražanje *CYP1A2* v celicah izpostavljenim PhIP pa je bilo v primerjavi z ostalimi HAA od 8- do 9-krat manjše.

Preglednica 2: Vpliv HAA na spremembe izražanja genov, ki kodirajo metabolne encime celic HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 µM PhIP in 4,8-DiMeIQx ter 25–250 µM MeIQx in IQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 2: Modulation of mRNA expression of selected genes involved in HAA metabolism in HepG2 cells. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 25–200 µM PhIP and 4,8-DiMeIQx or 25–250 µM MeIQx and IQ. BaP (30 µM) was used as a positive control.

HAA (µM)	Encimi I. stopnje metabolizma		Encimi II. stopnje metabolizma		
	CYP1A1	CYP1A2	NAT2	GSTA1	UGT1A1
PhIP					
25	4.1 ± 1.1*	2.8 ± 1.4	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.6 ± 0.2*
50	4.0 ± 2.3	3.7 ± 1.1*	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1*
100	6.3 ± 3.1*	7.9 ± 1.1*	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.04	1.7 ± 0.02*
200	13.3 ± 1.9*	15.3 ± 3.0*	1.6 ± 0.7	0.8 ± 0.04	2.9 ± 0.2*
4,8-DiMeIQx					
25	209.0 ± 55.5*	63.0 ± 0.9*	1.0 ± 0.1	<i>0.3 ± 0.1*</i>	4.7 ± 0.5*
50	302.0 ± 68.0*	59.8 ± 5.3*	1.0 ± 0.03	<i>0.2 ± 0.1*</i>	3.1 ± 0.6*
100	330.7 ± 61.2*	65.3 ± 5.6*	1.1 ± 0.3	<i>0.1 ± 0.04*</i>	4.4 ± 0.3*
200	436.7 ± 34.2*	52.6 ± 8.9*	1.2 ± 0.1	<i>0.1 ± 0.01*</i>	4.9 ± 1.0*
MeIQx					
25	35.1 ± 11.6*	17.7 ± 1.4*	1.0 ± 0.1	<i>0.4 ± 0.1*</i>	1.9 ± 0.4*
50	45.6 ± 6.8*	28.1 ± 3.8*	1.1 ± 0.02	<i>0.3 ± 0.03*</i>	2.3 ± 0.4*
100	80.0 ± 45.9*	56.2 ± 1.9*	1.3 ± 0.1	<i>0.2 ± 0.1*</i>	2.9 ± 0.3*
250	163.3 ± 37.0*	114.3 ± 6.3*	0.9 ± 0.01	<i>0.1 ± 0.01*</i>	3.1 ± 1.1*
IQ					
25	73.7 ± 20.7*	31.8 ± 14.7*	1.7 ± 0.7	0.8 ± 0.2	2.2 ± 0.7
50	47.9 ± 4.7*	75.3 ± 15.1*	<i>0.4 ± 0.7*</i>	0.8 ± 0.3	2.9 ± 0.9*
100	42.7 ± 3.4*	74.7 ± 7.6*	<i>0.6 ± 0.2*</i>	0.7 ± 0.4	2.8 ± 0.8*
250	68.7 ± 5.2*	88.4 ± 10.4*	<i>0.4 ± 0.2*</i>	0.5 ± 0.2*	3.9 ± 0.6*
BaP (µM)					
30	314.3 ± 141.5*	14.7 ± 7.8*	1.1 ± 0.7	<i>0.2 ± 0.04*</i>	1.9 ± 0.7*

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{\Delta\Delta Ct}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD. Razlik v izražanju genov med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p < 0,05$).

Izražanje genov, ki kodirajo encime II. stopnje metabolizma, ni bilo tako izrazito kot izražanje *CYP* (Preglednica 2). Izražanje *NAT2* je bilo statistično značilno zmanjšano v celicah izpostavljenim IQ pri koncentracijah večjih od 25 µM (za več kot 1,7-krat), medtem ko ostali testirani HAA niso povzročili sprememb v izražanju *NAT2*. Izražanja *SULT1A1* nismo ugotovili niti v kontrolni skupini celic niti v celicah izpostavljenim HAA. Izražanje *GSTA1* je bilo statistično značilno zmanjšano v celicah izpostavljenim različnim koncentracijam 4,8-DiMeIQx in MeIQx, tudi do 10-krat manjše izražanje v primerjavi s kontrolno skupino celic. PhIP ni povzročil sprememb v izražanju *GSTA1*, IQ pa je zmanjšal izražanje *GSTA1* le v celicah izpostavljenim največji koncentraciji (2-krat manjše izražanje v primerjavi s kontrolno skupino celic). HAA so povečali izražanje *UGT1A1* pri vseh testiranih koncentracijah. 4,8-DiMeIQx je povzročil največje izražanje *UGT1A1*, tudi do 5-krat povečano izražanje v primerjavi s kontrolno skupino celic, PhIP pa najmanjše (do 3-krat povečano izražanje). Izražanje *UGT1A1* korelira z izražanjem *CYP1A1* (Pearsonova korelacija, $r=0,795$; $p<0,0002$) ter v manjši meri z izražanjem *CYP1A2* (Pearsonova korelacija, $r=0,630$; $p<0,009$).

Podobno kot HAA so tudi EPM iz skorje mesa in kombinacije HAA v celicah HepG2 najbolj povečali izražanje *CYP1A1*, *CYP1A2* in *UGT1A1* (Preglednica 3). Velikost izražanja obeh genov v celicah izpostavljenim EPM iz skorje mesa je primerljiva z izražanjem *CYP* in *UGT1A1* pri celicah, ki so bile izpostavljene posameznemu HAA v mnogo večjih koncentracijah kot pa smo jih določili v EPM (Preglednici 2 in 3). Tako je bila koncentracija HAA v EPM piščanca 4-krat manjša od najmanjše testirane koncentracije posameznega HAA (25 µM), v EPM prašiča smo izmerili 7-krat in v EPM govedine kar 11-krat manjšo koncentracijo HAA od najmanjše testirane koncentracije posameznega HAA. Med posameznimi EPM iz skorje mesa ni bilo statistično značilnih razlik v stopnji izražanja obeh genov. EPM iz skorje piščančjega in prašičjega mesa ter kombinacije HAA v koncentracijah, ki smo jih izmerili v EPM piščanca so povečale izražanja *NAT2*, vendar statistično značilno le v EPM iz skorje prašičjega mesa, in sicer za 1,5-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic. Izražanja *SULT1A1* nismo ugotovili niti v kontrolni skupini celic niti v celicah izpostavljenim EPM in kombinacijam HAA.

Preglednica 3: Vpliv ekstraktov pečenega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja genov, ki kodirajo metabolne encime celic HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol.% EPM iz sredice in skorje govejega, prašičjega in piščančjega mesa ter različnim kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol. % EPM. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 3: Modulation of mRNA expression of selected genes involved in HAA metabolism in HepG2 cells exposed to grill meat extracts and combinations of HAA. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of beef, pork and chicken meat and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. BaP (30 µM) was used as a positive control.

Izpostavitev	Encimi I. stopnje metabolizma		Encimi II. stopnje metabolizma		
	CYP1A1	CYP1A2	NAT2	GSTA1	UGT1A1
EPM govedine					
1 vol. % sredica	1,6 ± 0,7	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,1*
1 vol. % skorja (2,35 µM konc. HAA)	56,4 ± 24,5*	41,6 ± 7,3*	1,5 ± 0,003*	1,4 ± 0,7	2,0 ± 0,2*
PhIP (1,21 µM)	1,2 ± 0,6	2,9 ± 0,2*	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,9 ± 0,6
MeIQx (1,04 µM)	7,2 ± 2,7*	6,4 ± 1,0*	1,4 ± 0,4	0,9 ± 0,1	2,7 ± 0,5*
PhIP+MeIQx (1,21 + 1,04 µM)	12,9±2,3*	10,8 ± 1,8*	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,03	2,3 ± 0,8
EPM prašiča					
1 vol. % sredica	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,6
1 vol. % skorja (3,77 µM konc. HAA)	56,1 ± 2,1*	29,8 ± 8,7*	1,6 ± 0,9	1,0 ± 0,1	4,8 ± 1,9*
PhIP (1,71 µM)	1,6 ± 0,3*	1,5 ± 0,3*	1,6 ± 0,4	0,7 ± 0,2*	1,6 ± 0,04*
MeIQx (1,91 µM)	10,3 ± 1,4*	5,1 ± 3,1*	1,5 ± 0,6	0,6 ± 0,1*	2,1 ± 0,9
PhIP+MeIQx (1,71 + 1,91 µM)	6,5 ± 2,6*	6,4 ± 3,2*	1,4 ± 0,7	0,8 ± 0,1	2,03 ± 0,4*
EPM piščanca					
1 vol. % sredica	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,6	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,03
1 vol. % skorja (6,4 µM konc. HAA)	64,4 ± 4,1*	43,0 ± 5,7*	2,1 ± 1,0	0,6 ± 0,01*	3,2 ± 0,1*
PhIP (2,88 µM)	2,8 ± 0,2*	1,2 ± 0,1	2,5 ± 0,7	0,7 ± 0,03*	1,04 ± 0,1
MeIQx (3,15 µM)	15,8 ± 4,6*	5,8 ± 2,2*	2,8 ± 1,8	0,5 ± 0,04*	1,4 ± 0,02*
DiMeIQx (0,37 µM)	16,8 ± 2,3*	12,9 ± 1,9*	1,7 ± 0,3	0,9 ± 0,1	2,01 ± 0,2*
PhIP+MeIQx (2,88 + 3,15 µM)	12,4 ± 1,2*	6,5 ± 0,2*	2,4 ± 1,4	0,6 ± 0,1*	1,4 ± 0,04*
PhIP+DiMeIQx (2,88 + 0,37 µM)	28,1 ± 5,3*	35,1 ± 13,7*	2,2 ± 1,4	0,4 ± 0,1*	2,6 ± 0,4*
MeIQx+DiMeIQx (3,15 + 0,37 µM)	37,0 ± 7,1*	51,7 ± 16,5*	1,5 ± 0,7	0,1 ± 0,3*	3,3 ± 0,3*

se nadaljuje

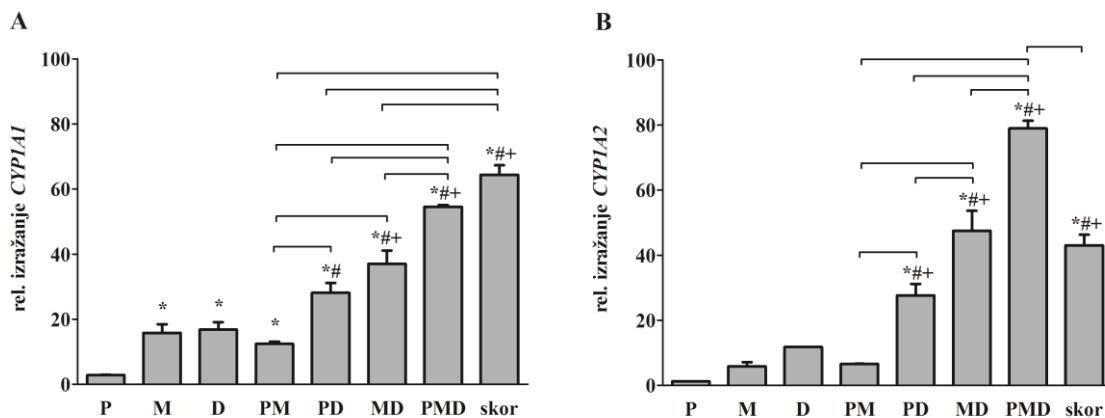
nadaljevanje

Izpostavitev	Encimi I. stopnje metabolizma		Encimi II. stopnje metabolizma		
	<i>CYP1A1</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>NAT2</i>	<i>GSTA1</i>	<i>UGT1A1</i>
EPM piščanca					
PhIP+MeIQx+DiMeIQx (2,88 + 3,15 + 0,37 µM)	54,6 ± 0,9*	79,0 ± 4,1*	1,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1*	3,4 ± 0,2*
BaP (30 µM)	91,6 ± 49,9*	8,0 ± 1,4*	3,6 ± 1,5*	0,1 ± 0,1*	5,6 ± 2,5*

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD. Razlik v izražanju genov med negativno kotnrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Zmanjšanje izražanja *GSTA1* v celicah je od EPM povzročil le ekstrakt iz skorje piščančjega mesa (1,7-kratno zmanjšanje v primerjavi s kontrolno skupino celic). Večina kombinacij HAA je bodisi zmanjšala izražanje *GSTA1* bodisi niso vplivale na njegovo izražanje. Največje zmanjšanje izražanja *GSTA1* ($0,1 \pm 0,3$) v celicah je povzročila kombinacija 4,8-DiMeIQx in MeIQx v koncentracijah izmerjenih v EPM iz skorje piščančjega mesa (3,15 oz. 0,37 µM). Vsi ekstrakti iz skorje pečenega mesa in večina kombinacij HAA so povečali izražanje *UGT1A1* v izpostavljenih celicah. Izražanje *UGT1A1* korelira z izražanjem *CYP1A1* (Pearsonova korelacija, $r = 0,999$; $p<0,001$) in *CYP1A2* (Pearsonova korelacija, $r=0,998$; $p<0,002$) pri EPM in kombinacijah HAA iz prasičjega ter pri EPM in kombinacijah HAA iz piščančjega mesa (*CYP1A1*, Pearsonova korelacija, $r = 0,943$; $p<0,0004$; *CYP1A2*, Pearsonova korelacija, $r=0,988$; $p<0,000004$). Pri EPM in kombinacijah HAA iz govejega mesa korelacije ni.

Kombinacije posameznih HAA v koncentracijah, ki smo jih izmerili v EPM piščanca, so različno vplivale na izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2* v celicah HepG2 (Slika 21). Kombinacija PhIP (2,88 µM) in 4,8-DiMeIQx (0,37 µM) je povzročila 2-krat večje izražanje *CYP1A1* ($28,1 \pm 5,3$) in *CYP1A2* ($35,1 \pm 13,7$) kakor kombinacija PhIP (2,88 µM) in MeIQx (3,15 µM) (*CYP1A1* $12,4 \pm 1,2$; *CYP1A2* $6,5 \pm 0,2$). V kombinacijah HAA, kjer je prisoten 4,8-DiMeIQx smo zaznali aditiven oz. sinergistični učinek izražanja *CYP1A1* in *CYP1A2* v primerjavi z izražanjem, ki ga povzročijo posamezni HAA. Tako je bilo izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2* pod vplivom 2,88 µM PhIP $2,8 \pm 0,2$ oz. $1,2 \pm 0,1$, pod vplivom 3,15 µM MeIQx je bilo izražanje *CYP1A1* $15,8 \pm 4,6$ in izražanje *CYP1A2* $5,8 \pm 2,2$ ter pod vplivom 0,37 µM 4,8-DiMeIQx $16,8 \pm 2,3$ za *CYP1A1* in $12,9 \pm 1,9$ za *CYP1A2*. Aditiven učinek na izražanje *CYP1A1* je imela kombinacija MeIQx in 4,8-DiMeIQx ($37,03 \pm 7,1$), sinergističnega pa kombinacija PhIP in 4,8-DiMeIQx ($28,1 \pm 5,3$) in kombinacija vseh treh HAA določenih v EPM piščanca ($54,6 \pm 0,9$), tj. 2,88 µM PhIP; 3,15 µM MeIQx; 0,37 µM 4,8-DiMeIQx. Podobno so imele kombinacije HAA sinergistični učinek na izražanje *CYP1A2*: PhIP in 4,8-DiMeIQx ($35,1 \pm 13,7$), MeIQx in 4,8-DiMeIQx ($51,7 \pm 16,5$) ter treh HAA 4,8-DiMeIQx, MeIQx in PhIP ($66,6 \pm 21,6$). Pri kombinaciji PhIP in MeIQx, PhIP ne vpliva na izražanje *CYP1A1*. Med stopnjama izražanja *CYP1A1* pod vplivom treh testiranih HAA in EPM iz skorje piščančjega mesa ni bilo statistično značilne razlike, medtem ko je bila stopnja izražanja *CYP1A2* pod vplivom kombinacije treh HAA 2-krat večja od stopnje izražanja, ki jo je povzročil EPM iz skorje piščančjega mesa.



Slika 21: Vpliv kombinacij HAA na spremembe izražanja genov CYP1A1 in CYP1A2 v celicah HepG2. Celice smo izpostavili kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM piščanca. Po 24 h smo izmerili iztažanje CYP1A1 (A) in CYP1A2 (B). Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2-\Delta\Delta Ct$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov \pm SD. (*) statistično značilna razlika glede na PhIP, (#) statistično značilna razlika glede na MeIQx, (+) statistično značilna razlika glede na 4,8-DiMeIQx, (—) statistično značilna razlika med kombinacijami HAA (ANOVA, Bonferroni post test, $p<0,05$).

Legenda grafa: skor ... 1 vol.% EPM skorje (ekvivalent 6,4 μ M HAA); P ... 2,88 μ M PhIP; M ... 3,15 μ M MeIQx; D ... 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx; PM ... kombinacija 2,88 μ M PhIP in 3,15 μ M MeIQx; PD ... kombinacija 2,88 μ M PhIP in 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx; MD ... kombinacija 2,88 μ M PhIP in 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx; DMP ... kombinacija 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3,15 μ M MeIQx in 2,88 μ M PhIP

Figure 21: Modulation of mRNA expression of genes CYP1A1 and CYP1A2 in HepG2 cells exposed to combinations of HAA. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of chicken meat and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME of chicken meat. mRNA expression of genes was determined using the qRT-PCR. The results are expressed as relative mRNA expression normalized to the vehicle control and present as means \pm SD of three independent experiments. The asterisk (*) denotes a significant difference between PhIP and treated cells, the asterisk (#) denotes a significant difference between MeIQx and treated cells, the asterisk (+) denotes a significant difference between 4,8-DiMeIQx and treated cells, the asterisk (—) denotes a significant difference between combinations of HAA (ANOVA, Bonferroni post test, $p<0.05$)

Graph legend: skor ... 1 vol.% GME crust (equivalent 6.4 μ M HAA); P ... 2.88 μ M PhIP; M ... 3.15 μ M MeIQx; D ... 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx; PM ... combination of 2.88 μ M PhIP and 3.15 μ M MeIQx; PD ... combination of 2.88 μ M PhIP in 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx; MD ... combination of 2.88 μ M PhIP and 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx; DMP ... combination of 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3.15 μ M MeIQx and 2.88 μ M PhIP

4.4 GENOTOKSIČNO DELOVANJE HAA IN EPM

4.4.1 Vpliv HAA in EPM na nastanek povratnih mutacij v *S. typhimurium*

Mutagenost posameznih HAA in EPM smo določali z Ames testom. Uporabili smo bakterijski sev *S. typhimurium* TA98, s katerim zaznavamo delecije baznih parov ter posledično premik bralnega okvirja. Test smo izvajali z dodatkom S9 mešanice metabolnih encimov potrebnih za metabolno aktivacijo HAA. Snov se ocenjuje kot mutageno, če pri vsaj eni testirani koncentraciji povzroči vsaj 2-kratno povečanje števila revertant v primerjavi s kontrolo in če je povečanje števila revertant od doze odvisno.

Preglednica 4: Vpliv HAA na nastanek povratnih mutacij v bakterijskem sevu *S. typhimurium* TA98. Bakterije smo izpostavili različnim koncentracijam HAA: 0,01–10 ng/pl IQ, MeIQx in 4,8-DiMeIQx ter 1–1000 ng/pl PhIP. Koncentracije HAA so izražene kot ng/ploščo (ng/pl). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili BaP (10 µg/pl).

Table 4: HAA induced His⁺ revertants in *S. typhimurium* TA98.

Bacteria were exposed to different concentrations of HAA: 0.01–10 ng/pl IQ, MeIQx or 4,8-DiMeIQx and 1–1000 ng/pl PhIP. Concentrations of HAA are expressed as ng/plate (ng/pl). BaP (10 µg/pl) was used as a positive control.

št. revertant/pl				št. revertant/pl	
Konc. (ng/pl)	IQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	Konc. (ng/pl)	PhIP
0	33,7 ± 3,5	33,7 ± 3,5	33,7 ± 3,5	0	33.7 ± 3.5
0,01	28,0 ± 3,6	22,0 ± 4,4*	33,7 ± 5,8	1	26.3 ± 9.0
0,1	44,3 ± 7,6	36,3 ± 3,2	59,3 ± 8,0*	10	36.7 ± 3.1
1	95,7 ± 7,6*	57,3 ± 2,1*	283,3 ± 52,3*	100	42.3 ± 4.9
10	483,3 ± 148,1*	360,7 ± 20,6*	771,5 ± 57,3*	1000	758.3 ± 21.4*
BaP (10 µg/pl)	173,0 ± 7,0*				

Prikazani so rezultati treh paralelki ± SD. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino, Studentov t-test ($p < 0,05$).

Vsi testirani HAA in EPM so povzročili povečanje števila revertant v odvisnosti od doze (Preglednici 4 in 5). Največji mutageni potencial smo določili pri 4,8-DiMeIQx, nato pri IQ in MeIQx, medtem ko je PhIP povzročil statistično značilno povečanje števila revertant v primerjavi s kontrolo šele pri 1000-krat večji koncentraciji kakor drugi testirani HAA. 4,8-DiMeIQx je pri koncentraciji 1 ng/pl povzročil $283,3 \pm 53,3$ revertant, kar je 8-kratno povečanje v številu revertant v primerjavi s kontrolo ($33,7 \pm 3,5$), skoraj 3-kratno povečanje v primerjavi z IQ ($95,7 \pm 7,6$) in skoraj 4-kratno povečanje v primerjavi z MeIQx ($57,3 \pm 2,1$). 4,8-DiMeIQx je povzročil tudi skoraj 11-krat večje število revertant, kot jih je povzročil PhIP ($26,3 \pm 9,0$). Pri enaki koncentraciji (1 ng/pl) je IQ povzročil skoraj 3-kratno povečanje števila revertant v primerjavi s kontrolo in MeIQx skoraj 2-kratno, medtem ko PhIP ni povzročil statistično značilnega povečanja števila revertant v primerjavi s kontrolo.

Pri testiranju EPM smo največji mutageni potencial določili pri EPM iz skorje piščančjega mesa, najmanjšega pa pri EPM iz skorje govejega mesa. Tako je 2000-krat razredčen EPM skorje piščančjega mesa (70 ng HAA/pl) povzročil $603,7 \pm 69,8$ revertant, kar je 6-krat večje število revertant, kot pa jih je povzročil 1000-krat razredčen EPM iz skorje prašičjega mesa (82 ng HAA/pl), tj. $99,7 \pm 1,2$ in skoraj 8-krat več, kot jih povzročil 1000-krat razredčen EPM iz skorje govejega mesa (51,5 ng HAA/pl), tj. $79,0 \pm 8,5$. Ekstrakti iz sredice pečenega prašičjega in piščančjega mesa so tudi povzročili statistično značilno povečanje števila revertant, vendar pri 10-krat večjih koncentracijah kakor EPM iz skorje.

Preglednica 5: Vpliv ekstraktov pečenega mesa na nastanek povratnih mutacij v bakterijskem sevu *S. typhimurium TA98*. Bakterije smo izpostavili različnim razredčinam EPM (25x–800x). Koncentracije so izražene kot ng HAA/ploščo (ng/pl). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili BaP (10 µg/pl).

Table 5: Grilled meat extracts induced His⁺ revertants in *S. typhimurium TA98*. Bacteria were exposed to different dilutions of extracts (25x–800x). Concentrations of HAA in extracts are expressed as ng/plate (ng/pl). BaP (10 µg/pl) was used as a positive control.

EPM skorje govejega mesa		EPM skorje prašičjega mesa		EPM skorje piščančjega mesa	
Konc. HAA v ng/pl (razredčitev)	št. revertant/pl	Konc. HAA v ng/pl (razredčitev)	št. revertant/pl	Konc. HAA v ng/pl (razredčitev)	št. revertant/pl
0	36,7 ± 4,7	0	35,3 ± 3,5	0	33,7 ± 3,5
6,44 (8000x)	40,0 ± 10,1	10,3 (8000x)	52,0 ± 10,6	17,5 (8000x)	151,0 ± 9,5*
12,88 (4000x)	38,3 ± 18,0	20,5 (4000x)	59,0 ± 7,0*	35 (4000x)	328,3 ± 66,4*
25,75 (2000x)	45,0 ± 7,8	41 (2000x)	84,3 ± 19,2*	70 (2000x)	603,7 ± 69,8*
51,5 (1000x)	79,0 ± 8,5*	82 (1000x)	99,7 ± 1,2*	140 (1000x)	1004,3 ± 62,1*
103 (500x)	97,7 ± 12,2*				
206 (250x)	117,0 ± 36,4*				
EPM sredice govejega mesa		EPM sredice prašičjega mesa		EPM sredice piščančjega mesa	
Razredčitev	št. revertant/pl	št. revertant/pl		št. revertant/pl	
0	30,0 ± 7,0	35,3 ± 3,5		42,3 ± 13,6	
800x	33,0 ± 4,6	62,3 ± 2,1*		45,3 ± 13,2	
400x	30,3 ± 7,5	58,3 ± 17,5		57,3 ± 10,5	
200x	38,7 ± 3,1	62,5 ± 2,1*		82,7 ± 4,9*	
100x	31,3 ± 0,6	52,7 ± 9,3*		115,7 ± 9,1*	
BaP (10 µg/pl)	221,0 ± 15,6*				

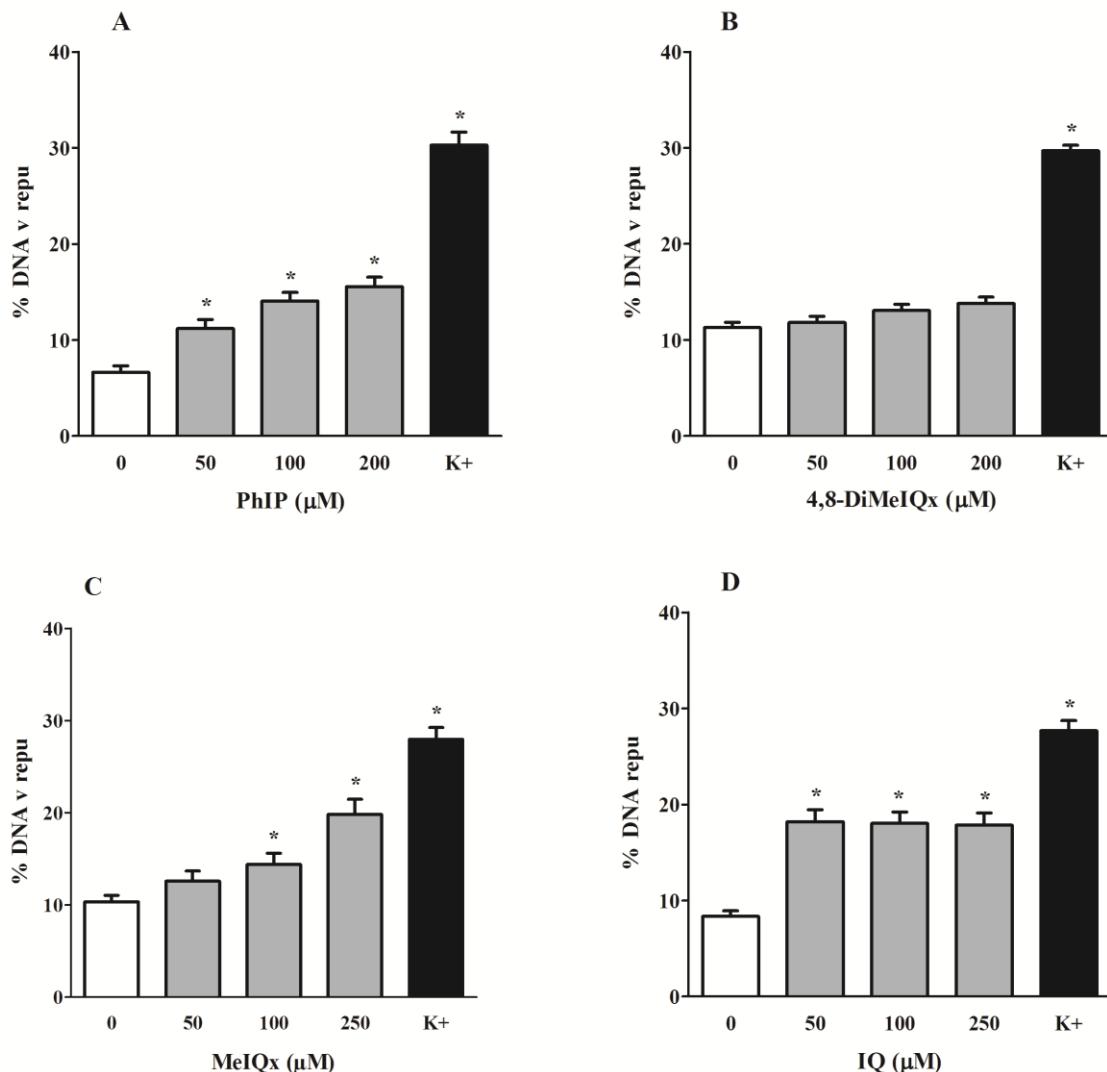
Prikazani so rezultati treh paralelki ± SD. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino, Studentov t-test ($p<0,05$).

4.4.2 Vpliv HAA in EPM na nastanek prelomov DNA v celicah HepG2

Nastanek prelomov DNA v celicah izpostavljenim HAA in EPM smo ugotavljali s testom komet. Z alkalno različico testa komet smo poleg eno- in dvoverižnih prelomov DNA, kot posledica neposrednega delovanja HAA, zaznavali tudi prelome, ki nastanejo kot posledica popravljanja poškodb DNA povzročenih s HAA.

MeIQx in PhIP sta v celicah HepG2 po 24 h izpostavitvi povzročila od doze odvisno povečanje verižnih prelomov DNA (Slika 22). IQ je v celicah HepG2 povzročil statistično značilno povečanje prelomov DNA pri vseh testiranih koncentracijah, vendar pa le to ni bilo odvisno od doze. 4,8-DiMeIQx ni povzročil nobenih prelomov DNA v primerjavi s kontrolno skupino celic.

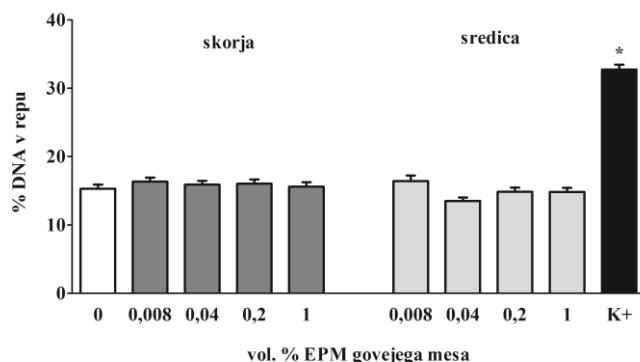
EPM iz govejega in prašičjega mesa v testiranih koncentracijah oz. razredčinah niso povzročili prelomov DNA v celicah HepG2 po 24 h izpostavitvi (Slika 23). EPM iz skorje piščančjega mesa je povzročil prelome DNA v celicah izpostavljenim 0,2 in 1 vol. % EPM, vendar statistično neznačilno.



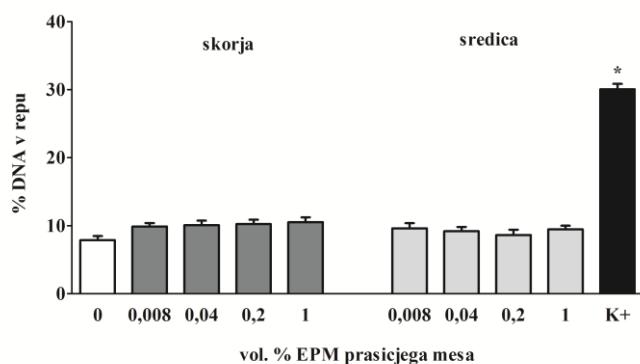
Slika 22: Nastanek prelomov DNA v celicah HepG2 pod vplivom HAA. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 50–200 μM PhIP (A) in 4,8-DiMeIQx (B) ter 50–250 μM MeIQx (C) in IQ (D). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 μM BaP. Prelome DNA smo določevali s testom komet. Prikazan je povprečni delež DNA v repu (%) treh neodvisnih ponovitev poskusa \pm SE. Razlik med poškodovano DNA celic negativne kontrole in kontrole topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Figure 22: HAA induced DNA strand breaks in HepG2 cells. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 50–200 μM PhIP (A) and 4,8-DiMeIQx (B), 50–250 μM MeIQx and IQ. BaP (30 μM) was used as a positive control. DNA damage was assessed with the comet assay and is expressed as average \pm SE % of tail DNA of the three independent experiments. The % tail DNA of the vehicle control cells did not differ significantly from that of non-treated control cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, $p<0.05$).

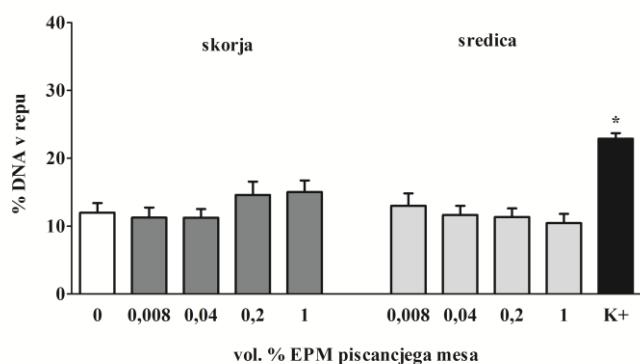
A



B



C



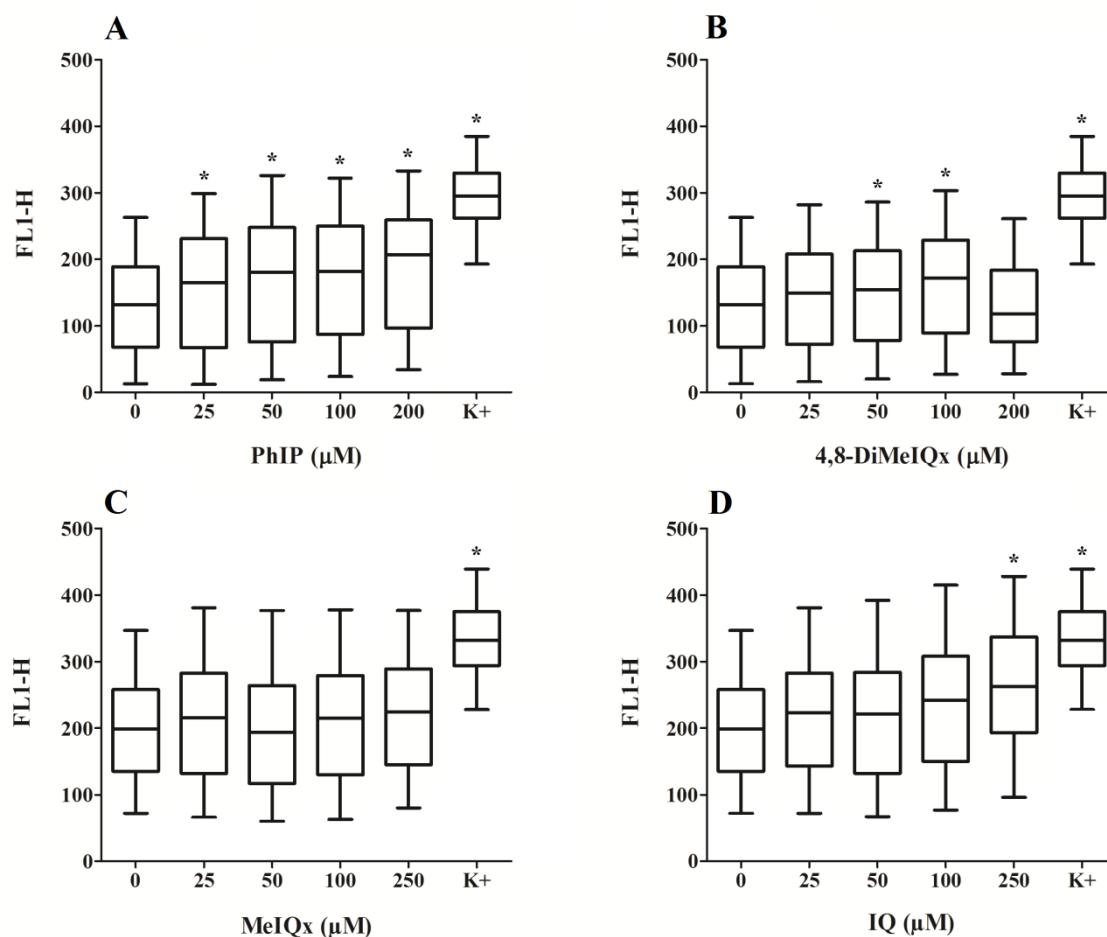
Slika 23: Nastanek prelomov DNA v celicah HepG2 pod vplivom EPM iz govejega (A), prašičjega (B) in piščančjega (C) mesa. Celice smo za 24 h izpostavili različnim razredčinam EPM iz skorje in sredice mesa (0,008–1 vol. %). 1 vol. % EPM iz skorje je ekvivalenten 2,35 µM koncentraciji HAA v EPM govedine, 3,77 µM koncentraciji HAA v EPM prašiča in 6,4 µM koncentraciji HAA v EPM piščanca (Preglednica 1). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP. Prelome DNA smo določevali s testom komet. Prikazan je povprečni delež DNA v repu (%) treh neodvisnih ponovitev poskusa ± SE. Razlik med poškodovano DNA celic negativne kontrole in kontrole topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

Figure 23: Effect of grilled meat extracts of beef (A), pork (B) and chicken meat (C) on DNA strand breaks in HepG2 cells. The cells were exposed for 24 h to different dilutions of GME from crust and core (0.008–1 vol.%). 1 vol. % GME is equivalent to 2.35 µM HAA in beef, 3.77 µM HAA in pork and 6.4 µM HAA in chicken meat. BaP (30 µM) was used as a positive control. DNA damage was assessed with the comet assay and is expressed as average ± SE % of tail DNA of the three independent experiments. The % tail DNA of the vehicle control cells did not differ significantly from that of non-treated control cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, p<0.05).

4.4.3 Vpliv HAA na nastanek dvoverižnih prelomov DNA v celicah HepG2

Nastanek dvoverižnih prelomov DNA (DSB, iz ang. double strand breaks) v celicah HepG2 izpostavljenim HAA, smo ugotavljali s pretočno citometrijo, kot je opisano v poglavju 3.2.3.3.

PhIP je v celicah HepG2 po 24 h izpostavitve povzročil statistično značilno od doze odvisno povečanje DSB (Slika 24). Podobno od doze odvisno povečanje DSB je povzročil tudi IQ, vendar pa smo statistično značilno povečanje prelomov izmerili, le pri največji testirani koncentraciji (250 µM). 4,8-DiMeIQx je v celicah povzročil statistično značilno povečanje DSB pri dveh testiranih koncentracijah, 50 in 100 µM. Pri največji testirani koncentraciji (250 µM) pa je 4,8-DiMeIQx, sicer statistično neznačilno, zmanjšal število DSB v primerjavi z drugimi testiranimi koncentracijami (25–100 µM) in kontrolno skupino celic. MeIQx v celicah izpostavljenim 25–250 µM koncentracijam ni povzročil sprememb v številu DSB v primerjavi s kontrolno skupino celic (Slika 24).



Slika 24: Nastanek dvoverižnih prelomov DNA v celicah HepG2 pod vplivom HAA. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 μM PhIP (A) in 4,8-DiMeIQx (B) ter 25–250 μM MeIQx (C) in IQ (D). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 1,7 μM etopozid (1 $\mu\text{g/ml}$). Dvoverižne prelome DNA smo določevali indirektno, preko merjenja γH2AX s pretočno citometrijo. Rezultati so podani kot porazdelitev fluorescentnega signala posameznih celic v obliki okvirjev z ročaji, ki prikažejo porazdelitev spremenljivke. Prečka v okvirju prikazuje mediano, spodnji del okvirja določa prvi kvartil, zgornji del pa tretji kvartil. Spodnji ročaj in zgornji ročaj določata 95% mejo zaupanja. V vsakem vzrocu smo izmerili 10^4 celic (dogodkov) ter poskus trikrat neodvisno ponovili. Med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo statistično značilnih razlik. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Linear mixed-effects model, $p < 0,05$).

Figure 24: HAA induced DNA double strand breaks in HepG2 cells. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 25–200 μM PhIP (A) and 4,8-DiMeIQx (B), 25–250 μM MeIQx and IQ. Etoposide (1 $\mu\text{g/ml}$ or 1,7 μM) was used as a positive control. DNA double strand breaks were assessed with the flow cytometry, indirectly through the detection of γH2AX foci. Distribution of the fluorescent signals of individual cells in the samples is shown. Data are presented as quantile box plots.

The edges of the box represent the 25th and 75th percentiles, the median is a solid line through the box, and the bars represent 95% confidence intervals. In each sample 10^4 events were recorded and experiment was repeated 3-times independently. The fluorescent signal (the amount of DNA double strand breaks) of the vehicle control cells did not differ significantly from that of non-treated control cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (Linear mixed-effects model, $p<0.05$).

4.4.4 Vpliv HAA in EPM na nastanek poškodb kromosomov v celicah HepG2

Poškodbe kromosomov v celicah HepG2 izpostavljenim HAA in EPM smo ugotavljali s testom mikrojeder, s katerim zaznavamo nastanek mikrojeder, nukleoplazemskih mostičkov in jedrnih brstov.

HAA v testiranih koncentracijah niso povzročili povečanega nastanka mikrojeder (MN), nukleoplazemskih mostičkov (NPBs) in jedrnih brstov (NB) v celicah HepG2 po 24 h izpostavitvi (Preglednica 6). Delitveni indeks celic pa se je znižal samo pri 100 in 200 μM koncentraciji 4,8-DiMeIQx.

Podobno kot HAA tudi EPM iz skorje govejega in prašičjega mesa nista povzročila povečanega nastanka mikrojeder, nukleoplazemskih mostičkov in jedrnih brstov ter nista spremenila delitvenega indeksa celic HepG2 po 24 h izpostavitvi (Preglednica 7). EPM iz skorje piščančjega mesa je od doze odvisno povečal število mikrojeder v celicah HepG2, pri največjih razredčinah (0,2 in 1 vol.%) tudi statistično značilno, medtem ko je število nukleoplazemskih mostičkov in jedrnih brstov ter delitveni indeks ostal nespremenjen v primerjavi s kontrolno skupino celic. Vsi trije EPM iz sredice niso povzročili poškodb kromosomov v celicah HepG2 po 24 h izpostavitvi.

Preglednica 6: Nastanek mikrojeder (MN), nukleoplazemskih mostičkov (NPBs) in jedrnih brstov (NB) ter spremembe v delitvenem indeksu celic HepG2 pod vplivom HAA. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 µM PhIP in 4,8-DiMeIQx ter 25–250 µM MeIQx in IQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 6: Micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NPB), nuclear buds (NB) and nuclear division index (NDI) in HepG2 cells exposed to HAA. The cells were exposed for 24 h to different dilutions of HAA: 25–200 µM PhIP or 4,8-DiMeIQx and 25–250 µM MeIQx or IQ. BaP (30 µM) was used as a positive control.

HAA (µM)	št. celic z MN/10 ³ dvojedrnh celic	št. MN/10 ³ dvojedrnh celic	št. NPB/10 ³ dvojedrnh celic	št. NB/10 ³ dvojedrnh celic	NDI
PhIP					
0	16,3 ± 8,7	16,7 ± 9,3	2,7 ± 0,6	43,3 ± 6,7	1,8 ± 0,1
50	22,0 ± 5,0	23,0 ± 6,0	1,0 ± 1,0	44,3 ± 28,0	1,7 ± 0,1
100	18,3 ± 5,5	19,7 ± 5,8	1,0 ± 0,0	64,0 ± 19,3	1,8 ± 0,1
200	19,0 ± 6,6	20,0 ± 7,2	1,7 ± 1,5	56,0 ± 20,9	1,7 ± 0,1
4,8-DiMeIQx					
0	11,3 ± 5,1	11,7 ± 5,7	1,0 ± 1,0	37,7 ± 12,7	1,9 ± 0,1
50	9,7 ± 6,4	10,0 ± 7,0	0	35,0 ± 5,6	1,9 ± 0,03
100	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,3 ± 0,6	40,7 ± 19,9	1,7 ± 0,1*
200	9,0 ± 4,4	9,0 ± 4,4	0,7 ± 1,2	32,0 ± 18,3	1,6 ± 0,1*
MeIQx					
0	14,0 ± 4,0	15,0 ± 4,6	3,3 ± 4,0	36,0 ± 21,3	1,8 ± 0,1
50	19,3 ± 4,9	21,7 ± 4,6	3,3 ± 1,5	46,3 ± 14,0	1,8 ± 0,1
100	18,0 ± 1,0	20,0 ± 3,0	2,7 ± 2,1	28,3 ± 19,9	1,8 ± 0,1
250	17,3 ± 3,2	17,7 ± 3,8	2,7 ± 3,1	31,7 ± 13,4	1,7 ± 0,1
IQ					
0	14,0 ± 7,5	18,0 ± 9,0	3,3 ± 4,0	36,0 ± 21,3	1,8 ± 0,1
50	19,3 ± 4,9	20,3 ± 6,0	3,3 ± 1,5	46,3 ± 14,0	1,8 ± 0,1
100	18,0 ± 1,0	21,7 ± 4,6	2,7 ± 2,1	28,3 ± 19,9	1,8 ± 0,1
250	17,3 ± 3,2	20,0 ± 3,0	2,7 ± 3,1	31,7 ± 13,4	1,7 ± 0,1
BaP (µM)					
10	37,7 ± 12,5*	38,9 ± 14,3*	1,7 ± 2,6	46,3 ± 21,4	1,6 ± 0,1*

MN, NPB in NB smo določili v 1000 dvojedrnh celicah. Prikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih poskusov ± SD. Med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo statistično značilnih razlik. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

Preglednica 7: Nastanek mikrojeder (MN), nukleoplazemskih mostičkov (NPBs) in jedrnih brstov (NB) ter spremembe v delitvenem indeksu celic HepG2 pod vplivom EPM. Celice smo za 24 h izpostavili različnim razredčinam EPM iz skorje (0,008–1 vol. %). 1 vol. % EPM iz skorje je ekvivalenten 2,35 µM koncentraciji HAA v EPM govedine, 3,77 µM koncentraciji HAA v EPM prašiča in 6,4 µM koncentraciji HAA v EPM piščanca (Preglednica 1). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 10 µM BaP.

Table 7: Micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NPB), nuclear buds (NB) and nuclear division index (NDI) in HepG2 cells exposed to HAA. The cells were exposed for 24 h to different dilutions of GME (0,04–1 vol. %). 1 vol. % GME is equivalent to 2.35 µM HAA in beef, 3.77 µM HAA in pork and 6.4 µM HAA in chicken meat. BaP (30 µM) was used as a positive control.

EPM skorje (vol. %)	št. celic z MN/ 10^3 dvojedrnh celic	št. MN/ 10^3 dvojedrnh celic	št. NPB/ 10^3 dvojedrnh celic	št. NB/ 10^3 dvojedrnh celic	NDI
goveje meso					
0	23,3 ± 2,9	24,3 ± 2,1	1,3 ± 1,2	19,7 ± 11,0	1,8 ± 0,1
0,04	20,3 ± 4,5	21,3 ± 5,0	0,3 ± 0,6	21,3 ± 3,2	1,8 ± 0,1
0,2	19,3 ± 3,1	20,7 ± 4,5	1,0 ± 1,7	19,0 ± 10,4	1,8 ± 0,1
1	14,0 ± 4,4*	14,7 ± 4,9*	0,7 ± 0,6	18,0 ± 4,4	1,8 ± 0,1
prašičje meso					
0	26,0 ± 9,9	28,0 ± 11,3	1,0 ± 1,4	11,5 ± 6,4	1,6 ± 0,4
0,04	20,5 ± 14,9	20,5 ± 14,9	0	11,5 ± 0,7	1,9 ± 0,1
0,2	27,5 ± 5,0	27,5 ± 5,0	1,0 ± 1,4	26,5 ± 7,8	1,9 ± 0,1
1	25,0 ± 8,5	25,0 ± 8,5	0	4,0 ± 4,2	1,8 ± 0,2
piščanje meso					
0	41,7 ± 4,5	49,0 ± 6,2	1,3 ± 1,5	31,3 ± 8,1	1,9 ± 0,1
0,04	52,3 ± 14,8	59,3 ± 16,9	2,7 ± 2,9	47,3 ± 28,6	1,9 ± 0,1
0,2	54,3 ± 0,6*	63,0 ± 1,0*	2,3 ± 4,1	33,0 ± 6,1	1,9 ± 0,1
1	70,0 ± 17,1*	85,0 ± 23,6	2,7 ± 1,5	44,7 ± 22,5	1,9 ± 0,003
BaP (µM)					
10	95,3 ± 13,1*	113,7 ± 21,8*	2,3 ± 3,2	24,7 ± 17,6	1,4 ± 0,4

MN, NPB in NB smo določili v 1000 dvojedrnh celicah. Prikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih poskusov ± SD. Med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo statistično značilnih razlik. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

4.4.5 Vpliv HAA in EPM na izražanje genov, ki se odzovejo na poškodbe DNA v celicah HepG2

Celice HepG2 smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA (25–250 µM), 1 vol. % EPM iz skorje in sredice govejega, prašičjega in piščančjega mesa ter različnim kombinacijam HAA, ki se pojavljajo v EPM (Preglednica 1). Z metodo qRT-PCR smo preverjali spremembe v izražanju štirih genov (*P53*, *CDKN1A*, *GADD45α* in *MDM2*) (Preglednice 8, 9 in 10), ki sodelujejo v signalnem odgovoru na poškodbe DNA, kot je opisano v poglavju 2.3.4. Z metodo prenosa Western pa smo določali izražanje *P53* in *CDKN1A* v celicah HepG2 pod vplivom HAA tudi na proteinskem nivoju (Slika 24).

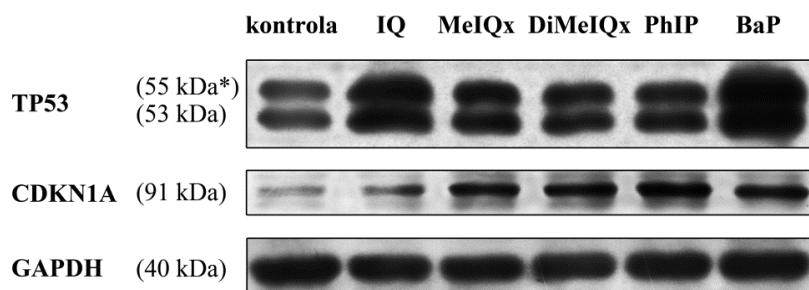
HAA so povzročili statistično značilno povečano izražanja gena *CDKN1A* (Preglednica 8, Slika 23). Največje povečanje izražanja *CDKN1A* v celicah HepG2 sta povzročila 4,8-DiMeIQx in MeIQx, nato IQ in PhIP. Tako je bilo pri najmanjši testirani koncentraciji (25 µM) izražanje *CDKN1A* v celicah pod vplivom 4,8-DiMeIQx 1,4-krat večje kot v kontrolni skupini celic, pri največji testirani koncentraciji (200 µM) pa 6,6-krat večje. Pri celicah izpostavljenim 25 oz. 250 µM MeIQx je bilo izražanje *CDKN1A* 1,8-krat oz. 3,1-krat večje od kontrolne skupine celic. IQ je pri koncentraciji 25 µM povzročil 1,3-kratno povečanje izražanja *CDKN1A*, pri koncentraciji 250 µM pa ni povzročil sprememb v izražanju omenjenega gena. Nasprotno PhIP pri najmanjši testirani koncentraciji (25 µM) ni povzročil sprememb v izražanju *CDKN1A*, v celicah izpostavljenim 200 µM PhIP pa je bilo izražanje *CDKN1A* 1,7-krat večje od kontrolne skupine celic. Izražanje *CDKN1A* v celicah izpostavljenim HAA korelira z izražanjem *CYP1A1* (Pearson r = 0,741, p<0,001). Povečano izražanje *CDKN1A* v celicah HepG2 pod vplivom HAA smo dokazali tudi na proteinskem nivoju. Vsi testirani HAA so v koncentraciji 100 µM povečali izražanje proteina CDKN1A v primerjavi s kontrolno skupino celic (Slika 24). Pod vplivom HAA se je v celicah HepG2 povečalo tudi izražanje *GADD45α*, najbolj pod vplivom MeIQx. 4,8-DiMeIQx in PhIP sta povečala izražanje *GADD45α* le pri največji testirani koncentraciji (200 µM), in sicer 2-kratno povečanje v primerjavi s kontrolno skupino celic. V celicah izpostavljenim IQ ni prišlo do sprememb v izražanju *GADD45α* pri nobeni testirani koncentraciji (Preglednica 8).

Preglednica 8: Vpliv HAA na spremembe izražanja genov, ki sodelujejo v signalnem odgovoru na poškodbe DNA v celicah HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 µM PhIP in 4,8-DiMeIQx ter 25–250 µM MeIQx in IQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 8: Modulation of mRNA expression of DNA damage responsive genes in HepG2 cells after exposure to HAA. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 25–200 µM PhIP and 4,8-DiMeIQx or 25–250 µM MeIQx and IQ. BaP (30 µM) was used as a positive control.

HAA (µM)	<i>P53</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>GADD45α</i>	<i>MDM2</i>
PhIP				
25	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1
50	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2*	0,9 ± 0,1
100	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,2*	1,2 ± 0,3	0,8 ± 0,2
200	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1*	2,0 ± 0,2*	0,8 ± 0,1
4,8-DiMeIQx				
25	0,7 ± 0,1*	1,4 ± 0,1*	1,1 ± 0,6	1,4 ± 0,1*
50	0,7 ± 0,1*	1,6 ± 0,2*	1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,1
100	0,8 ± 0,2	3,1 ± 1,2*	1,7 ± 0,5	1,4 ± 0,01*
200	0,6 ± 0,2*	6,6 ± 1,0*	2,0 ± 0,4*	1,2 ± 0,1
MeIQx				
25	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,2*	1,6 ± 0,04*	0,9 ± 0,1
50	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,4*	1,3 ± 0,02*	0,8 ± 0,1
100	1,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2*	2,1 ± 0,2*	1,2 ± 0,1
250	1,0 ± 0,1	3,1 ± 0,5*	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1
IQ				
25	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1*	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1*
50	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,03*	1,2 ± 0,03	0,7 ± 0,1*
100	1,7 ± 0,3*	1,5 ± 0,1*	1,2 ± 0,7	0,6 ± 0,1*
250	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,05	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,1*
BaP				
30	1,5 ± 0,5	17,0 ± 5,8*	7,1 ± 2,9*	0,6 ± 0,2*

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD. Razlik v izražanju genov med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).



Slika 25: Izražanje proteinov P53 in CDKN1A v celicah HepG2 po izpostavitvi HAA določena s prenosom Western. Celice smo izpostavili PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ v 100 µM koncentraciji. Po 24 h izpostavitve smo iz celic izolirali proteine in z metodo prenosa Western preverili prisotnost P53 in CDKN1A. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP. GAPDH je kontrola nanosa vzorcev proteinov. (*) možne posttranslacijske modifikacije TP53.

Figure 25: Western blot of TP53, CDKNA1 in HepG2 cells after exposure to HAA. The cells were exposed to 100 µM PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx or IQ for 24 h. Then the proteins was isolated and detected using Western blot. BaP (30 µM) was used as a positive control. GAPDH was used as loading control. The asterisk (*) denotes possible post-translation modification of protein TP53.

HAA niso povzročili sprememb v izražanju *P53*, medtem ko se je količina proteina P53 v celicah izpostavljenim 100 µM koncentracijam HAA v primerjavi s kontrolno skupino celic povečala (Slika 24). Največjo spremembo v količini P53 v primerjavi z ostalimi HAA je povzročil IQ, ki je tudi v celicah izpostavljenim 100 µM IQ povečal izražanje gena, ki kodira P53. PhIP in MeIQx nista vplivala na izražanje *MDM2* v celicah HepG (Preglednica 8). 4,8-DiMeIQx je povečal izražanje *MDM2* za 1,4-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic le pri dveh koncentracijah 25 in 200 µM. IQ je povzročil znižanje izražanja *MDM2* pri vseh testiranih koncentracijah. Izražanje *MDM2* pod vplivom HAA je negativno koreliralo z izražanjem *P53* (Pearson r = -0,753, p<0,01).

EPM iz govejega mesa in posamezni oz. kombinacije HAA v koncentracijah, ki so bile v EPM govedine niso vplivale na izražanje genov *CDKN1A* in *MDM2* v celicah HepG2 (Preglednica 9). PhIP je v koncentraciji 1,71 µM, ki smo jo določili v EPM iz skorje prašičjega mesa, povzročil povečanje izražanja *CDKN1A* za 1,4-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic. Podobno je bilo povečano izražanje *CDKN1A* v celicah, ki so bile izpostavljene EPM iz skorje prašičjega in piščančjega ($1,5 \pm 0,2$ oz. $1,7 \pm 0,04$) ter kombinacijama 4,8-DiMeIQx in MeIQx ($1,5 \pm 0,2$) oz. PhIP, 4,8-DiMeIQx in MeIQx

($2,9 \pm 0,1$) v koncentracijah, ki smo jih določili v EPM piščanca (Preglednici 9 in 10). Izražanje *CDKN1A* v celicah izpostavljenim EPM iz piščančjega mesa in kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v EPM piščanca, korelira z izražanjem *CYP1A1* (Pearson $r = 0,882$, $p = 0,002$) in *CYP1A2* (Pearson $r = 0,889$, $p < 0,01$). Izražanje *MDM2* v celicah HepG2 pod vplivom EPM ni bilo spremenjeno. Le MeIQx in kombinacija slednjega s PhIP v koncentraciji ($2,88 \mu\text{M}$ PhIP in $3,15 \mu\text{M}$ MeIQx), ki smo jo določili v EPM piščanca, je zmanjšala izražanje *MDM2* v izpostavljenih celicah za 1,7-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic.

Preglednica 9: Vpliv ekstraktov pečenega govejega in prašičjega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja genov, ki sodelujejo v signalnem odgovoru na poškodbe DNA v celicah HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol.% EPM iz sredice in skorje mesa ter različnim kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili $30 \mu\text{M}$ BaP.

Table 9: Modulation of mRNA expression of DNA damage responsive genes in HepG2 cells after exposure to grilled meat extracts and combinations of HAA from beef and pork. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of beef and pork and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. BaP ($30 \mu\text{M}$) was used as a positive control.

	<i>CDKN1A</i>	<i>MDM2</i>		<i>CDKN1A</i>	<i>MDM2</i>
EPM govejega mesa			EPM prašičjega mesa		
1 vol.% sredica	$1,0 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,2$	1 vol.% sredica	$0,7 \pm 0,1^*$	$0,8 \pm 0,1$
1 vol.% skorja ($2,35 \mu\text{M}$ konc. HAA)	$0,9 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,3$	1 vol.% skorja ($3,77 \mu\text{M}$ konc. HAA)	$1,5 \pm 0,2^*$	$0,8 \pm 0,2$
PhIP ($1,21 \mu\text{M}$)	$1,6 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,2$	PhIP ($1,71 \mu\text{M}$)	$1,4 \pm 0,2^*$	$0,9 \pm 0,2$
MeIQx ($1,04 \mu\text{M}$)	$2,0 \pm 1,3$	$1,1 \pm 0,3$	MeIQx ($1,91 \mu\text{M}$)	$1,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
PhIP+MeIQx ($1,21 + 1,04 \mu\text{M}$)	$1,1 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,04$	PhIP+MeIQx ($1,71 + 1,91 \mu\text{M}$)	$1,2 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,2$
BaP (30 μM)	$34,2 \pm 5,6^*$	$1,2 \pm 0,4$			

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov \pm SD. Razlik v izražanju genov med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p < 0,05$).

Preglednica 10: Vpliv ekstrakta pečenega piščančjega mesa in kombinacij HAA na spremembe izražanja genov, ki sodelujejo v signalnem odgovoru na poškodbe DNA v celicah HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol. % EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa ter različnim kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 10: Modulation of mRNA expression of DNA damage responsive genes in HepG2 cells after exposure to grilled meat extract and combinations of HAA from chicken meat. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of chicken meat and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. BaP (30 µM) was used as a positive control.

	<i>CDKN1A</i>	<i>MDM2</i>
1 vol. % sredica	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
1 vol. % skorja (6,4 µM konc. HAA)	1,7 ± 0,04*	1,0 ± 0,1
PhIP (2,88 µM)	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,3
MeIQx (3,15 µM)	1,1 ± 0,01	0,6 ± 0,01*
DiMeIQx (0,37 µM)	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
PhIP+MeIQx (2,88 + 3,15 µM)	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,02*
PhIP+DiMeIQx (2,88 + 0,37 µM)	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2
MeIQx+DiMeIQx (3,15 + 0,37 µM)	1,4 ± 0,2*	1,0 ± 0,2
PhIP+MeIQx+DiMeIQx (2,88 + 3,15 + 0,37 µM)	2,9 ± 0,1*	1,2 ± 0,5
BaP (30 µM)	21,4 ± 9,8*	0,5 ± 0,1*

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD. Razlik v izražanju genov med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

4.5 VPLIV HAA IN EPM NA PROCESE APOPTOZE V CELICAH HepG2

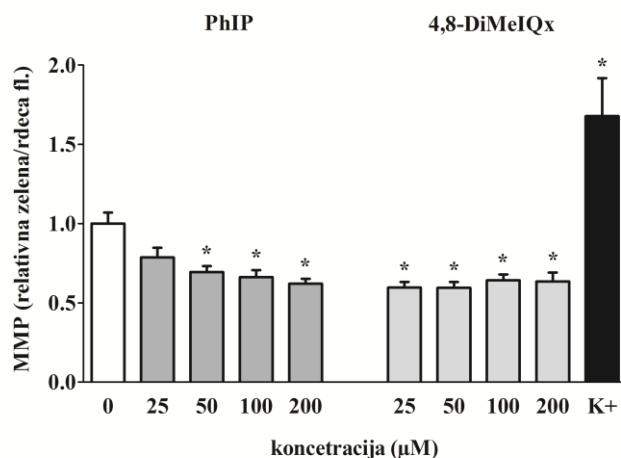
4.5.1 Prepustnost zunanje mitohondrijske membrane

Spremembe v prepustnosti zunanje mitohondrijske membrane celic HepG2 smo določali s pomočjo fluorescenčnega barvila 5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-karbocianin jodidom (JC-1) kot je opisano v poglavju 3.2.6.2. Celice HepG2 smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA (25–250 µM) in 1 vol.% EPM piščanca ter kombinacijam HAA, ki smo jih določili v EPM iz skorje piščančjega mesa (Preglednica 1).

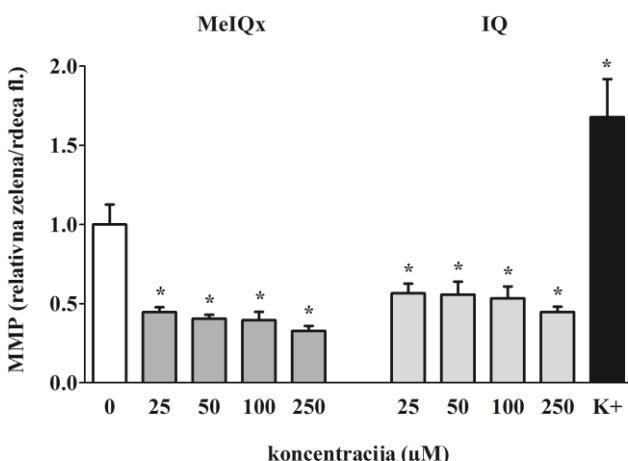
Vsi testirani HAA so povzročili hiperpolarizacijo zunanje mitohondrijske membrane celic HepG2 (Slika 25). PhIP in MeIQx sta v celicah povzročila od doze odvisno hiperpolarizacijo mitohondrijske membrane.

EPM piščanca in kombinacije HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v njem, niso povzročili statistično značilnih sprememb v mitohondrijskem membranskem potencialu (Slika 26).

A

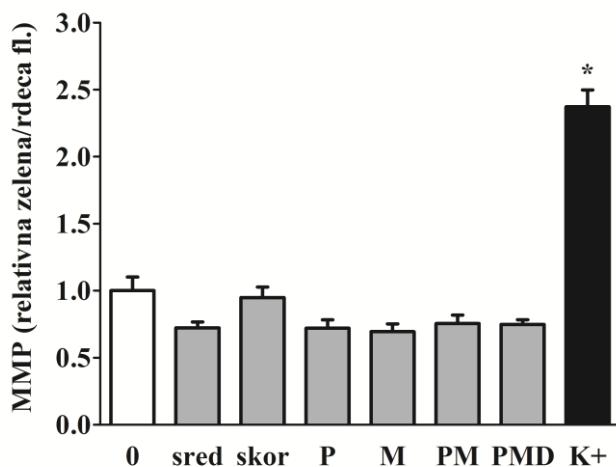


B



Slika 26: Vpliv HAA na spremembo mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP) v celicah HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 µM PhIP in 4,8-DiMeIQx (A) ter 25–250 µM MeIQx in IQ (B). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 1 µM STS. Prikazano je povprečje relativnega razmerja med zeleno in rdečo fluorescenco treh neodvisnih poskusov ± SE. Razlik v spremembi MMP med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

Figure 26: Changes in the mitochondrial membrane potential (MMP) of HepG2 cells after exposure to HAA. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 25–200 µM PhIP and 4,8-DiMeIQx (A) or 25–250 µM MeIQx and IQ (B). STS (1 µM) was used as a positive control. Results are presented as average relative ratio between green and red fluorescence of three independent experiments ± SE. No statistical significant difference in changes of MMP was detected between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, p<0.05).



Slika 27: Sprememba mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP) v celicah HepG2 po izpostavitvi ekstraktu pečenega piščančjega mesa in kombinacijam HAA. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol.% EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa ter kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM (Preglednica 1). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 1 μ M staurosporin (STS). Prikazano je povprečje relativnega razmerja med zeleno in rdečo fluorescenco treh neodvisnih poskusov \pm SE. Razlik v spremembji MMP med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

Legenda grafa: sred ... 1 vol.% EPM sredice; skor ... 1 vol.% EPM skorje (ekvivalent 6,4 μ M HAA); P ... 2,88 μ M PhIP; M ... 3,15 μ M MeIQx; MP ... kombinacija 2,88 μ M PhIP in 3,15 μ M MeIQx; PMD ... kombinacija 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3,15 μ M MeIQx in 2,88 μ M PhIP

Figure 27: Changes in the mitochondrial membrane potential (MMP) of HepG2 cells after exposure to grilled meat extracts and combinations of HAA from chicken meat. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of chicken meat and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. STS (1 μ M) was used as a positive control. Results are presented as average relative ratio between green and red fluorescence of three independent experiments \pm SE. No statistical significant difference in changes of MMP was detected between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, p<0.05).

Graph legend: sred ... 1 vol.% GME core; skor ... 1 vol.% GME crust (equivalent 6.4 μ M HAA); P ... 2.88 μ M PhIP; M ... 3.15 μ M MeIQx; MP ... combination of 2.88 μ M PhIP and 3.15 μ M MeIQx; PMD ... combination of 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3.15 μ M MeIQx and 2.88 μ M PhIP

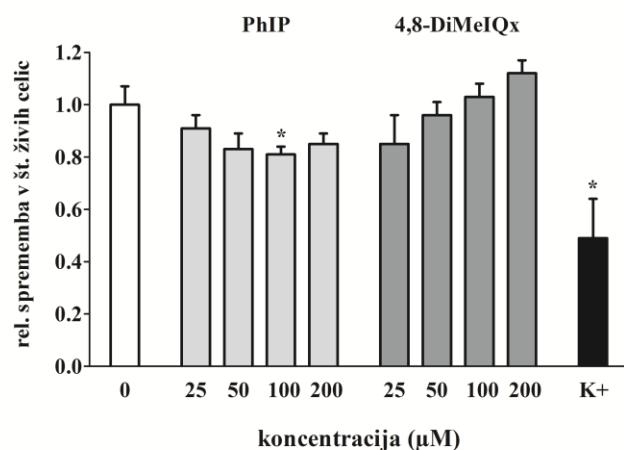
4.5.2 Delež apoptotskih celic po izpostavitvi HAA in EPM

Delež apoptotskih celic HepG2 smo določali z barvanjem celic z aneksinom V/PI in analizo na pretočnem citometru, kot je opisano v poglavju 3.2.6.3.

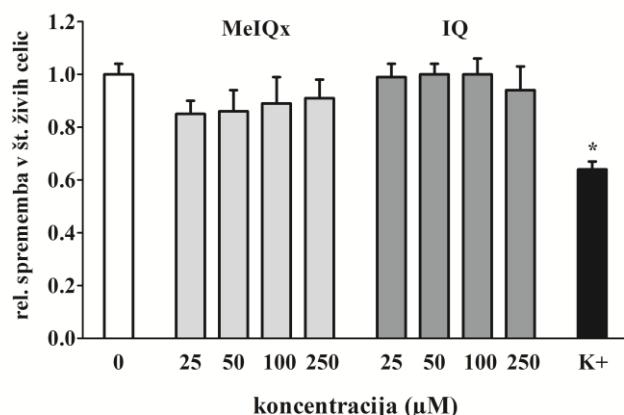
PhIP je v celicah HepG2 po 24 h izpostavitve povzročil statistično neznačilno od doze odvisno zmanjšanje deleža živih celic (Slika 27). Pri največji testirani koncentraciji ($250 \mu\text{M}$), je tako PhIP statistično neznačilno zmanjšal delež živih celic za 1,2-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic. Ostali testirani HAA (4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ) po 24 h izpostavitve niso vplivali na povečanje celične smrti in s tem spremembo deleža živih celic.

Podobno EPM piščanca in kombinacije HAA, v koncentracijah določenih v EPM iz skorje piščančjega mesa, niso povzročili zmanjšanja deleža živih celic (Slika 28).

A

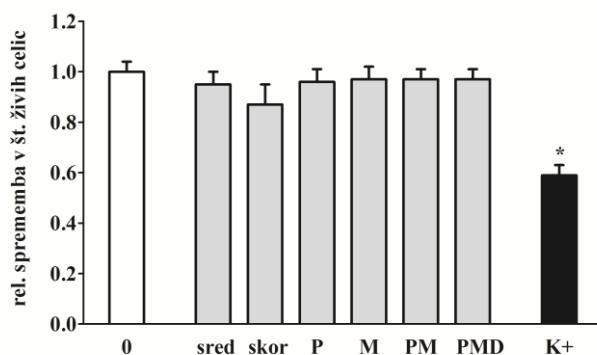


B



Slika 28: Relativna sprememba deleža živih celic HepG2 po izpostavitvi HAA. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 µM PhIP in 4,8-DiMeIQx (A) ter 25–250 µM MeIQx (B) in IQ (C). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 0,5 µM staurosporin (STS). Prikazano je povprečje relativnih vrednosti števila živih celich v treh neodvisnih ponovitvah poskusa ± SD. Razlik v spremembi relativnega števila živih celic med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

Figure 28: Relative change in number of live HepG2 cells after exposure to HAA. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 25–200 µM PhIP and 4,8-DiMeIQx (A) or 25–250 µM MeIQx and IQ (B). STS (0.5 µM) was used as a positive control. Results are presented as average relative number of live cells of three independent experiments ± SD. No statistical significant difference in changes of relative number of live cell was detected between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, p<0.05).



Slika 29: Relativna sprememba deleža živih celic HepG2 po izpostavitvi ekstraktu pečenega piščančjega mesa in kombinacijam HAA. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol. % EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa ter kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol. % EPM (Preglednica 1). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 0,5 µM staurosporin (STS). Prikazano je povprečje relativnih vrednosti števila živih celich v treh neodvisnih ponovitvah poskusa ± SD. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05).

Legenda grafa: sred ... 1 vol. % EPM sredice; skor ... 1 vol. % EPM skorje (ekvivalent 6,4 µM HAA); P ... 2,88 µM PhIP; M ... 3,15 µM MeIQx; MP ... kombinacija 2,88 µM PhIP in 3,15 µM MeIQx; PMD ... kombinacija 0,37 µM 4,8-DiMeIQx, 3,15 µM MeIQx in 2,88 µM PhIP

Figure 29: Relative change in number of live HepG2 cells after exposure to grilled meat extracts of chicken meat and combinations of HAA. The cells were exposed for 24 h to 1 vol. % GME from core and crust of chicken meat and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. STS (0.5 µM) was used as a positive control. Results are presented as average relative number of live cells of three independent experiments ± SD. No statistical significant difference in changes of relative number of live cell was detected between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, p<0.05).

Graph legend: sred ... 1 vol. % GME core; skor ... 1 vol. % GME crust (equivalent 6.4 µM HAA); P ... 2.88 µM PhIP; M ... 3.15 µM MeIQx; MP ... combination of 2.88 µM PhIP and 3.15 µM MeIQx; PMD ... combination of 0.37 µM 4,8-DiMeIQx, 3.15 µM MeIQx and 2.88 µM PhIP

4.5.3 Izražanje genov, ki so vpleteni v apoptozo celic HepG2

Celice HepG2 smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA (25–250 µM), 1 vol. % EPM iz skorje in sredice govejega, prašičjega in piščančjega mesa ter različnim kombinacijam HAA, ki se pojavljajo v EPM (Preglednica 1). Z metodo qRT-PCR smo preverjali spremembe v izražanju štirih genov (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3* in *CASP7*), ki

sodelujejo v celičnih poteh povezanih s procesi apoptoze, kot je opisano v poglavju 2.3.4.2 (Preglednice 11, 12 in 13, Slika 29).

Izražanje pro-apoptotskega gena *BAX* v celicah HepG2 se je po izpostavitvi največji testirani koncentraciji 4,8-DiMeIQx ($200 \mu\text{M}$), MeIQx ali IQ ($250 \mu\text{M}$) statistično značilno zmanjšalo za več kot 1,5-krat (Preglednica 11). PhIP pri vseh testiranih koncentracijah ni povzročil sprememb v izražanju *BAX*. Izražanje anti-apoptotskega gena *BCL-2* je bilo statistično značilno povečano v celicah izpostavljenim $200 \mu\text{M}$ PhIP – 2-krat večje izražanje v primerjavi s kontrolno skupino celic. Prav tako je MeIQx (100 in $250 \mu\text{M}$) povečal izražanje *BCL-2* za 1,4-krat oz. 1,7-kraz v primerjavi s kontrolno skupino celic in $100 \mu\text{M}$ 4,8-DiMeIQx za 1,5-krat. IQ je vplival na izražanje *BCL-2* v celicah izpostavljenim $50 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$ koncentracijama, in sicer je bilo izražanje *BCL-2* $1,2 \pm 0,04$ oz. $2,3 \pm 0,3$ (Preglednica 11). Razmerje med izražanjem *BAX* in *BCL-2* je bilo pri večini testiranih koncentracijah HAA manjše od 1. Ugotovljeno je bilo, da je razmerje med izražanjem *BAX/BCL-2* indikator notranje poti apoptoze. Razmerje *BAX/BCL-2* manjše od 1 nakazuje na zaviranje notranje poti apoptoze (Green in Evan, 2002; Danial in Korsmeyer, 2004). Količina proteina *BCL-2* se je v celicah HepG2 povečala po izpostavitvi $100 \mu\text{M}$ PhIP, 4,8-DiMeIQx in IQ ter najbolj v celicah izpostavljenim $100 \mu\text{M}$ MeIQx (Slika 29). PhIP je v celicah HepG2 povzročil statistično značilno povečanje izražanje *CASP3* pri največji testirani koncentraciji ($200 \mu\text{M}$), tj. 1,3-krat večje izražanje v primerjavi s kontrolno skupino celic, medtem ko je MeIQx pri največjih testiranih koncentracijah ($100 \mu\text{M}$ in $250 \mu\text{M}$) statistično značilno zmanjšal izražanje *CASP3*, in sicer za 1,3-krat manj v primerjavi s kontrolno skupino celic (Preglednica 11). Podobno je IQ pri največjih testiranih koncentracijah ($100 \mu\text{M}$ in $250 \mu\text{M}$) povzročil statistično značilno zmanjšanje izražanja *CASP7* za 1,3-krat oz. 1,4-krat, izražanje *CASP3* pa je bilo pod vplivom 25 in $50 \mu\text{M}$ IQ zmanjšano 1,3-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic. Ostali testirani HAA (PhIP, 4,8-DiMeIQx in MeIQx) niso povzročili sprememb v izažanju *CASP7* v celicah HepG2.

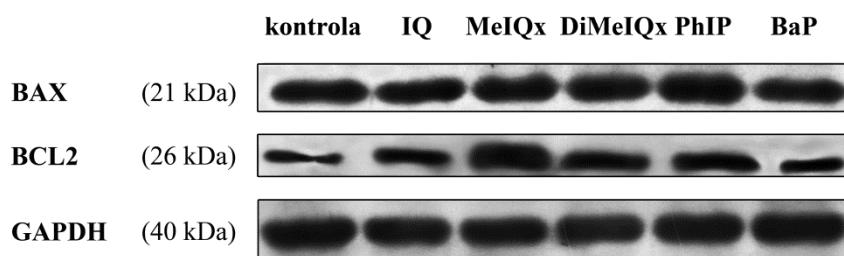
Preglednica 11: Vpliv HAA na spremembe izražanja genov vpletenih v apoptozo celic HepG2.

Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 µM PhIP in 4,8-DiMeIQx ter 25–250 µM MeIQx in IQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 11: Modulation of mRNA expression of selected genes involved in apoptosis of HepG2 cells after exposure to HAA. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 25–200 µM PhIP and 4,8-DiMeIQx or 25–250 µM MeIQx and IQ. BaP (30 µM) was used as a positive control.

HAA (µM)	CASP3	CASP7	BAX	BCL-2	BAX/BCL-2
PhIP					
25	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,80
50	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,4	0,75
100	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,04	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,7	0,64
200	1,3 ± 0,1*	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,5*	0,53
4,8-DiMeIQx					
25	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,79
50	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,3	0,55
100	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2*	0,57
200	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1*	0,7 ± 0,2*	0,92
MeIQx					
25	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,02	1,12
50	0,9 ± 0,04	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,01	0,83
100	<i>0,8 ± 0,03*</i>	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,01*	1,7 ± 0,2*	0,71
250	<i>0,8 ± 0,1*</i>	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,1*	1,4 ± 0,02*	0,37
IQ					
25	<i>0,8 ± 0,1*</i>	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,02	0,9 ± 0,2	1,14
50	<i>0,8 ± 0,1*</i>	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,04*	0,81
100	<i>0,8 ± 0,3</i>	<i>0,8 ± 0,1*</i>	1,2 ± 0,2	2,3 ± 0,3*	0,53
250	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2*	0,5 ± 0,1*	0,8 ± 0,2	0,66
BaP					
30	2,1 ± 0,1*	2,9 ± 0,2*	1,8 ± 0,2*	/	

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD. Razlik v izražanju genov med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p < 0,05$). (/) pod mejo zaznave.



Slika 30: Izražanje proteinov BAX in BCL-2 v celicah HepG2 po izpostavitvi HAA določena s prenosom Western. Celice smo izpostavili PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ v 100 µM koncentraciji. Po 24 h izpostavitve smo iz celic izolirali proteine in z metodo prenosa Western preverili prisotnost BAX in BCL-2. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP. GAPDH je kontrola nanosa vzorcev proteinov.

Figure 30: Western blot of BAX and BCL-2 in HepG2 cells after exposure to HAA. The cells were exposed to 100 µM PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx or IQ for 24 h. Then the proteins were isolated and detected using Western blot. BaP (30 µM) was used as a positive control. GAPDH was used as loading control.

EPM iz skorje govejega mesa je v izpostavljenih celicah statistično značilno povečal izražanje *BAX* za 1,3-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic. Izražanje *BCL-2* v celicah HepG2 je bilo po izpostavitvi EPM iz skorje govejega mesa statistično značilno manjše za 1,4-krat v primerjavi s kontrolno skupino celic (Preglednica 12). Pri izpostavitvi celic hkratnemu delovanju 1,21 µM PhIP in 1,04 µM MeIQx, tj. v koncentracijah, ki smo jih določili v EPM iz skorje govejega mesa, smo opazili statistično značilno 1,4-kratno zmanjšanje izražanja *BAX*. EPM iz skorje prašičjega mesa ni vplival na spremembe v izražanju *BAX* in *BCL-2*. Prav tako nismo zaznali sprememb v izražanju obeh genov v celicah izpostavljenim hkratnemu vplivu PhIP in MeIQx v koncentracijah, ki smo jih določili v EPM iz skorje prašičjega mesa.

Preglednica 12: Vpliv ekstraktov pečenega govejega in prašičjega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja **BAX** in **BCL-2** v celicah HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol.% EPM iz sredice in skorje mesa ter različnim kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 12: Modulation of mRNA expression of BAX and BCL-2 in HepG2 cells after exposure to grilled meat extracts from beef and pork and combinations of HAA. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. BaP (30 µM) was used as a positive control.

	BAX	BCL-2	BAX/BCL-2
EPM govejega mesa			
1 vol.% sredica	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1
1 vol.% skorja (2,35 µM konc. HAA)	1,3 ± 0,02*	0,7 ± 0,1*	1,86
PhIP (1,21 µM)	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,00
MeIQx (1,04 µM)	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,75
PhIP+MeIQx (1,21 + 1,04 µM)	0,7 ± 0,1*	0,8 ± 0,2	0,88
EPM prašičjega mesa			
1 vol.% sredica	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,90
1 vol.% skorja (3,77 µM konc. HAA)	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,20
PhIP (1,71 µM)	1,3 ± 0,5	0,7 ± 0,2*	1,86
MeIQx (1,91 µM)	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,1*	2,00
PhIP+MeIQx (1,71 + 1,91 µM)	1,2 ± 0,6	0,7 ± 0,3	1,71
BaP (30 µM)	1,9 ± 0,6*	/	

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD. Razlik v izražanju genov med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, p<0,05). (/) pod mejo zaznave.

Preglednica 13: Vpliv ekstrakta pečenega piščančjega mesa ter kombinacij HAA na spremembe izražanja genov vpletenih v apoptozo celic HepG2. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol.% EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa ter različnim kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 µM BaP.

Table 13: Modulation of mRNA expression of selected genes involved in apoptosis of HepG2 cells after exposure to grilled meat extract from chicken meat and combinations of HAA. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of chicken meat and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. BaP (30 µM) was used as a positive control.

	CASP3	CASP7	BAX	BCL-2	BAX/BCL-2
EPM piščanca					
1 vol.% sredica	1,1 ± 0,04	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,43
1 vol.% skorja (6,4 µM konc. HAA)	1,1 ± 0,03	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,01	1,25
PhIP (2,88 µM)	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,00
MeIQx (3,15 µM)	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,4	0,6 ± 0,03*	1,72
DiMeIQx (0,37 µM)	1,04 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,00
PhIP+MeIQx (2,88 + 3,15 µM)	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1*	2,00
PhIP+DiMeIQx (2,88 + 0,37 µM)	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,2*	0,67
MeIQx+DiMeIQx (3,15 + 0,37 µM)	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3*	0,67
PhIP+MeIQx+DiMeIQx (2,88 + 3,15 + 0,37 µM)	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,4	2,3 ± 0,5*	0,43
BaP (30 µM)	1,4 ± 0,2	3,3 ± 0,6*	2,6 ± 1,5*	/	

Izražanje mRNA genov smo določali z metodo qRT-PCR. Rezultati relativnega izražanja mRNA so normalizirani na kontrolo topila ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in prikazani kot povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD. Razlik v izražanju genov med negativno kontrolo in kontrolo topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnnett post test, $p < 0,05$). (/) pod mejo zaznave.

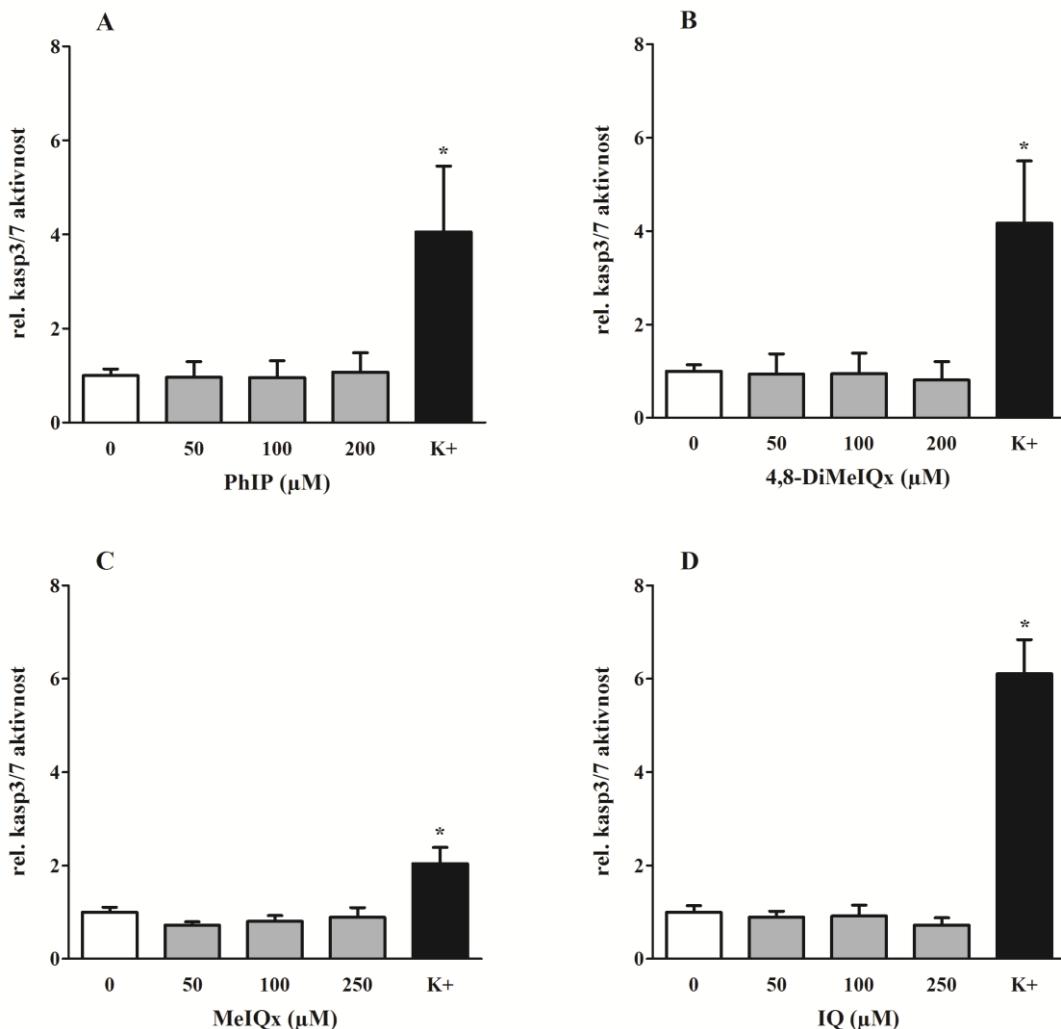
Ugotovili smo, da so vse kombinacije HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v EPM iz skorje piščančjega mesa ter so vsebovale tudi 4,8-DiMeIQx, povečale izražanje *BCL-2*, medtem ko v celicah izpostavljenih samo 4,8-DiMeIQx (0,37 µM) ali PhIP (2,88 µM) ni prišlo do sprememb v izražanju *BCL-2* (Preglednica 13). V izpostavljenih celicah je kombinacija 2,88 µM PhIP in 3,15 µM MeIQx 2-kratno zmanjšala izražanje *BCL-2*, 0,37 µM MeIQx pa je 1,7-kratno zmanjšal izražanje *BCL-2* v primerjavi s kontrolno skupino celic. Vpliva ekstrakta iz piščančjega mesa na spremembe izražanja genov vpletenih v apoptozo (*CASP3*, *CASP7*, *BAX* in *BCL-2*) celic HepG2 nismo zaznali. Na

izražanje *CASP3* in *CASP7* tudi niso vplivali posamezni HAA in njihove kombinacije v koncentracijah, ki smo jih določili v EPM iz skorje piščančjega mesa.

4.5.4 Aktivnost kspaz 3 in 7

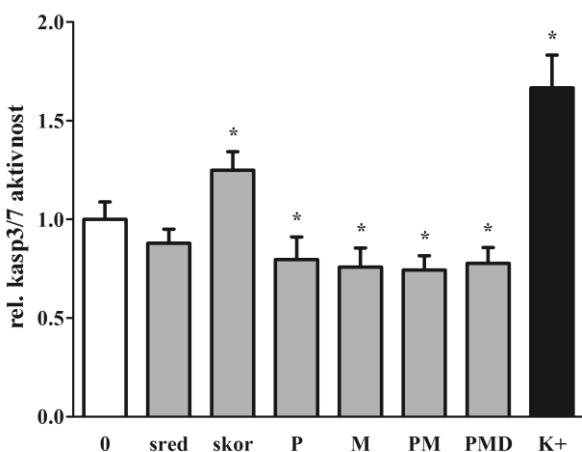
Aktivnost kspaz 3/7 v celicah HepG2 smo merili po 24 h izpostavitvi celic različnim koncentracijam HAA (25–250 µM) in 1 vol. % EPM piščanca, kot je opisano v poglavju 3.2.6.4. HAA v testiranih koncentracijah niso povzročili statistično značilne povečane ali zmanjšane aktivnosti kspaz 3/7 (Slika 30).

EPM iz skorje piščančjega mesa (1 vol. %) je statistično značilno povečal aktivnost kspaz 3/7 v izpostavljenih celicah HepG2 (1,25-kratno povečanje aktivnosti kspaz 3/7 v primerjavi s kontrolno skupino celic) (Slika 31). Nasprotno pa so kombinacije različnih HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v EPM piščanca (2,88 µM PhIP; 3,15 µM MeIQx; 0,37 µM 4,8-DiMeIQx), statistično značilno zmanjšale aktivnost kspaz 3/7 (do 1,3-kratna zmanjšana aktivnost kspaz 3/7 v primerjavi s kontrolno skupino celic). Aktivnost kspaz 3/7 v celicah izpostavljenih 1 vol. % EPM iz skorje piščančjega mesa se je statistično značilno razlikovala od aktivnosti kspaz 3/7 v celicah izpostavljenih bodisi posameznim HAA (PhIP, MeIQx) bodisi njihovim kombinacijam (PhIP in MeIQx oz. PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx) (Slika 31). Tako je bila aktivnost kspaz 3/7 v celicah izpostavljenih EPM iz skorje piščančjega mesa za 1,6-krat večja kot aktivnost kspaz 3/7 v celicah pod vplivom kombinacije treh HAA (PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx).



Slika 31: Aktivnost kaspaz 3/7 v celicah HepG2 izpostavljenim HAA. Celice smo za 24 h izpostavili različnim koncentracijam HAA: 25–200 μM PhIP (A) in 4,8-DiMeIQx (B) ter 25–250 μM MeIQx (C) in IQ (D). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 1 μM staurosporin (STS). Prikazano je povprečje relativnih vrednosti aktivnosti kaspaz 3 in 7 v dveh neodvisnih ponovitev poskusa (8 paralelk) \pm SD. Razlik v aktivnosti kaspaz 3/7 med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Figure 31: Caspase 3/7 activity in HepG2 cells exposed to HAA. The cells were exposed for 24 h to different concentrations of HAA: 25–200 μM PhIP and 4,8-DiMeIQx (A) or 25–250 μM MeIQx and IQ (B). STS (1 μM) was used as a positive control. Results are presented as average relative value of caspase 3/7 activity of two independent experiments (8 replicates) \pm SD. No statistical significant difference in caspase 3/7 activity was detected between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, $p<0.05$).



Slika 32: Aktivnost kaspaz 3/7 v celicah HepG2 izpostavljenim ekstraktu pečenega piščančjega mesa. Celice smo za 24 h izpostavili 1 vol.% EPM iz sredice in skorje piščančjega mesa ter kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih določili v 1 vol.% EPM (Preglednica 1). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 1 μ M staurosporin (STS). Prikazano je povprečje relativnih vrednosti aktivnosti kaspaz 3 in 7 dveh ponovitev poskusa (8 paralelk) \pm SD. Razlik v aktivnosti kaspaz 3/7 med celicami negativne kontrole in kontrole topila ni bilo. (*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (ANOVA, Dunnett post test, $p<0,05$).

Legenda grafa: sred ... 1 vol.% EPM sredice; skor ... 1 vol.% EPM skorje (ekvivalent 6,4 μ M HAA); P ... 2,88 μ M PhIP; M ... 3,15 μ M MeIQx; MP ... kombinacija 2,88 μ M PhIP in 3,15 μ M MeIQx; PMD ... kombinacija 0,37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3,15 μ M MeIQx in 2,88 μ M PhIP

Figure 32: Caspase 3/7 activity in HepG2 cells exposed to grilled meat extract of chicken meat and combinations of HAA. The cells were exposed for 24 h to 1 vol.% GME from core and crust of chicken meat and combinations of HAA in concentrations that appeared in GME. STS (1 μ M) was used as a positive control. Results are presented as average relative value of caspase 3/7 activity of two independent experiments (8 replicates) \pm SD. No statistical significant difference in caspase 3/7 activity was detected between vehicle control and non-treated cells. The asterisk (*) denotes a significant difference between HAA treated cells and the vehicle control (1-way ANOVA; Dunnett's test, $p<0.05$).

Graph legend: sred ... 1 vol.% GME core; skor ... 1 vol.% GME crust (equivalent 6.4 μ M HAA); P ... 2.88 μ M PhIP; M ... 3.15 μ M MeIQx; MP ... combination of 2.88 μ M PhIP and 3.15 μ M MeIQx; PMD ... combination of 0.37 μ M 4,8-DiMeIQx, 3.15 μ M MeIQx and 2.88 μ M PhIP

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Heterociklični aromatski amini (HAA) so skupina mutagenov in karcinogenov, ki nastanejo pri pečenju beljakovinsko bogatih živil, predvsem mesa. Preden se HAA lahko vežejo na DNA ter povzročijo poškodbe DNA se morajo metabolno aktivirati. Genotoksično delovanje HAA so dokazali tako v bakterijskih in sesalskih *in vitro* testnih sistemih, kot tudi *in vivo* poskusih na laboratorijskih živalih. HAA povzročajo nastanek tumorjev v različnih organih, predvsem pa v debelem črevesu in jetrih (Kato in sod., 1988; Ohgaki in sod., 1991; Turesky, 2010). Kljub temu, da je mutageni in genotoksični potencial posameznih HAA dobro raziskan, pa je malo znanega o mehanizmih rakotvornega delovanja HAA in njihovih zmeseh, katerim so ljudje dejansko izpostavljeni pri uživanju termično obdelanega mesa. Pri temperaturah običajnih za pripravo mesa (do 300 °C) se tvori skupina HAA imenovana aminoimidazoazareni (AIA), v katero spadajo PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ, ki jih najpogosteje najdemo v pečenem mesu (Salmon in sod., 2006; Polak in sod., 2009b). Zato smo jih izbrali, kot modelne HAA v naši raziskavi vpliva HAA in EPM na procese nastanka in razvoja raka.

5.1.1 Toksično in genotoksično delovanje HAA in EPM

5.1.1.1 Vpliv HAA in EPM na nastanek povratnih mutacij v *S. typhimurium*

Poškodbe DNA vodijo v mutacije, ki lahko sprožijo nastanek tumorja oz. rakastega obolenja bodisi z inaktivacijo tumorsupresorskih genov bodisi z aktivacijo onkogenov. Tako je poškodba DNA začetni in ključni dogodek karcinogeneze. Večji kot je obseg poškodb DNA, večja je verjetnost za nastanek mutacij. Mutagenost in genotoksično delovanje posameznih HAA in EPM smo raziskovali z različnimi metodami oz. testi za ugotavljanje genotoksičnosti snovi.

Mutageni potencial posameznih HAA in EPM smo ugotavljali s testom povratnih mutacij (Ames test) na sevu bakterije *Salmonella typhimurium* TA98 z dodatkom eksogene metabolne aktivacije (S9 mikrosomalna frakcija homogenata podganjih jeter).

Najnižje število revertant v primerjavi s kontrolo smo določili pri PhIP, medtem ko so 4,8-DiMeIQx, IQ in MeIQx povzročili statistično značilno povečanje števila revertant v primerjavi s kontrolo že pri 1000-krat manjših testiranih koncentracijah. Rezultati se skladajo z mnogimi raziskavami na bakterijskih testnih sistemih, kjer imidazokinoksalini, kot sta 4,8-DiMeIQx in MeIQx ter imidazokinolini (IQ, MeIQ) kažejo večji mutageni potencial kot PhIP, ki je imidazopiridin (Felton in Knize, 1991; Knasmuller in sod., 1999; Sugimura in sod., 2004). Pri testih povratnih mutacij z bakterijskimi sevi *Salmonelle* se za metabolno aktivacijo indirektnih mutagenov največkrat uporablja S9 mikrosomalna frakcija iz podganjih jeter. Ker gre za mešanico različnih encimov I. stopnje metabolizma (encimi citokrom P450), pride do različnih kemijskih reakcij. Tako poteče aktivacija HAA in nastanek mutagenih N-hidrokxi-HAA metabolitov, hkrati pa pride do detoksifikacije določenega dela HAA molekul z oksidacijo aromatskih obročev ali metilnih funkcionalnih skupin. Metaboliti HAA vstopijo v bakterijske celice, kjer v citoplazmi poteče *O*-acetilacija hidroksilaminskih metabolitov HAA v N-acetoksi-HAA. Reakcijo katalizira acetil-koencim A in acetiltransferaze (Saito in sod., 1985). N-acetoksi-HAA metaboliti so zelo reaktivni. Pride do odcepitve acetoksi skupine in tvorbe arilnitrenijevega iona. Le-ta pa se kovalentno veže na DNA ter povzorči prelome oz. delecije baznih parov. Na mutageni potencial AIA vpliva njihova kemijska struktura. Večjo mutagenost naj bi imeli AIA, ki imajo večje število aromatskih obročev oz. večje število zlitih aromatskih obročev ter posledično večji aromatski π -elektronski sistem. Večji kot je le-ta, bolj so metaboliti AIA oz. arilnitrenijev ion stabilni (Hatch in sod., 1991). Večje število aromatskih obročev oz. večje število zlitih aromatskih obročev ter prisotnost dušikovih atomov v tretjem aromatskem obroču naj bi omogočalo lažjo interkalacijo (vrinjenje) AIA metabolitov v dvojno vijačnico DNA in s tem njihovo lažjo vezavo na DNA. Prav tako naj bi dušikovi atomi tretjega aromatskega obroča zavirali njegovo oksidacijo (Hatch in sod., 1991). Vezana metilna funkcionalna skupina na prvi dušikov atom imidazolskega obroča, kot je pri PhIP, zmanjša mutagenost HAA, ker destabilizira proste elektrone v

aromatskih obročih (Vance in Levin, 1984). Vezana metilna skupina na C4 atom molekul HAA, kot je pri 4,8-DiMeIQx, pa močno poveča njihovo mutagenost. Tudi vezane metilne skupine na ostalih atomih aromatskih obročev naj bi stabilizirale nastale metabolite AIA ter preprečevale oz. sterično zakrivale mesta na molekuli, kjer lahko pride do oksidacij in s tem detoksifikacije AIA (Vance in Levin, 1984; Hatch in sod., 1991; Hatch in sod., 1996; Hatch in sod., 2001). Razlike v mutagenosti posameznih HAA v naši raziskavi, kjer je bil v Amesovem testu 4,8-DiMeIQx najbolj in PhIP najmanj aktiven, so tako po vsej verjetnosti posledica razlik v kemijski strukturi.

Mutagenost ekstraktov iz različnih vrst mesa je odvisna od vsebnosti HAA v ekstraktu. Višja kot je temperatura in daljši kot je čas pečenja, večji naj bi bil mutageni potencial ekstrakta v bakterijskih testnih sistemih, saj z višanjem temperature in podaljševanjem časa pečenja nastaja več HAA (Barrington in sod., 1990; Berg in sod., 1990; Tikkanen in sod., 1996; Knize in sod., 1997a, 1997b; Salmon in sod., 1997). Pri testiranju EPM smo največji mutageni potencial določili pri EPM iz skorje piščančjega mesa, ki je vseboval največ HAA, najmanjšega pa pri EPM iz skorje govejega mesa z najmanjšo vsebnostjo HAA. Pričakovali smo, da EPM iz sredic, v katerih nismo zaznali HAA (spodnja meja zaznavnosti je bila 1 ng/ml) ne bodo povzročili povečanega števila revertant v Ames testu. Nasprotno sta največji testirani koncentraciji (1 in 0,5 vol.%) tako EPM iz sredice prašičjega kot iz piščančjega mesa statistično značilno povečali število revertant v primerjavi s kontrolo. EPM iz sredice piščančjega mesa je delovala mutageno. V Ames testu se snov ocenjuje kot mutagena, če pri vsaj eni testirani koncentraciji povzroči vsaj 2-kratno povečanje števila revertant v primerjavi s kontrolo in če je povečanje števila revertant od doze odvisno. Pozitiven rezultat EPM iz sredic prašičjega in piščančjega mesa kaže na nastanek majhne količine HAA (pod mejo zaznavnosti) v sredici oz. njihovo prehajanje iz skorje v sredico. Meja med skorjo in sredico je težko določljiva, saj se količina HAA zmanjšuje od površine proti notranjosti mesa. Za skorjo smo določili površinsko plast mesa debeline 2 mm. Pri pripravi EPM smo meso pekli do središčne temperature 80 °C. HAA lahko nastajajo tudi pri temperaturah nižjih od 100 °C. Dokazali so jih v ribjem mesu dimljenem pri 80–85 °C (Kato in sod., 1986; Kikugawa in sod., 1986; Johansson in Jägerstad, 1994) ter v modelnih sistemih (Manabe in sod., 1992; Manabe in sod., 1993a). Zaradi velike

mutagenost HAA in visoke občutljivosti seva *S. typhimurium* TA98 za HAA smo tako dobili pozitiven rezultat testiranja EPM sredic iz prašičjega in piščančjega mesa.

Amesov test je med najbolj uporabljenimi metodami za določanje genotoksičnosti snovi. Kljub njegovi enostavni uporabi, pa ima nekaj pomanjkljivosti. Bakterijske (prokariontske) celice se močno razlikujejo od evkariontskih. Bakterijske celice imajo celično steno, ki otežuje prehod večjih molekul v celico, ki pa je v primeru seva *S. typhimurium* TA98 zaradi mutacije razrahljana. Bakterije nimajo jedra in s tem slabše zaščiteno DNA, imajo slabše razvite popravljalne mehanizme DNA oz. so le-ti mutirani, kot je to v primeru seva *S. typhimurium* TA98, ter imajo manjši nabor encimov, ki metabolizirajo oz. aktivirajo indirektne mutagene (Turesky, 2010). Zato se pri Ames testu za tovrstne mutagene uporablja eksogena metabolna aktivacija, za katero se največkrat uporablja že omenjena S9 mikrosomalna frakcija homogenata podganjih jeter. Le-ta vsebuje samo encime I. stopnje metabolizma ksenobiotikov. Številni indirektni mutageni oz. karcinogeni (prokarcinogeni), med katere spadajo HAA, pa za genotoksično delovanje potrebujejo tudi aktivacijo z encimi II. stopnje metabolizma. Zato smo za raziskovanje mehanizmov toksičnega in genotoksičnega delovanja ter vpliva HAA na druge celične procese izbrali celično linijo človeškega hepatoma (HepG2).

5.1.1.2 Genotoksično delovanje HAA in EPM v celicah HepG2

Celice HepG2 so ena izmed redkih celičnih linij, ki izražajo encime I. stopnje, kot sta CYP1A1 in CYP1A2, in II. stopnje (UGTs, NATs, GSTs) metabolizma. Te encime izražajo konstitutivno ter jih inducirajo podobni dejavniki kot v človeških hepatocitih (Wilkening in Bader, 2003; Wilkening in sod., 2003; Hewitt in Hewitt, 2004; Westerink in Schoonen, 2007). Raziskave so potrdile, da so celice HepG2 zelo dober *in vitro* model za identifikacijo genotoksičnih snovi. Testni sistem s celicami HepG2 je še posebej primeren za zaznavanje prehranskih genotoksinov, ko-genotoksinov in antigenotoksinov (Natarajan in Darroudi, 1991; Knasmuller in sod., 1998; Valentini-

Severin in sod., 2003; Knasmuller in sod., 2004). Obstoj razlik v metabolizmu HAA med glodavci in človekom so dokazali tako *in vitro* kot *in vivo* (Turesky, 2005).

Citotoksičnost HAA in EPM smo določali z MTS oz. MTT testom po 24 h izpostavitvi celic HepG2. Preživetje celic se je zmanjšalo le pri izpostavljenosti posameznim HAA v koncentracijah višjih od 250 µM. V številnih raziskavah so dokazali, da HAA v koncentracijah nižjih od 250 µM ne vplivajo na preživetje in morfološke spremembe celic HepG2 do 48 h izpostavitve. Podobno so ugotovili tudi za druge celične linije, kot so linija človeškega hepatoma HepaRG, linija humanega adenokarcinoma dojke MCF7 in adenokarcinoma prostate LNCaP (Nelson in sod., 2001; Hummerich in sod., 2004; Immonen in sod., 2009; Dumont in sod., 2010a; Haza in Morales, 2010).

Genotoksično delovanje HAA in EPM v celicah HepG2 smo najprej preverili z alkalno različico testa komet, ki omogoča zaznavanje dvo- in enoverižnih prelomov DNA, prelome, ki so posledica alkalno labilnih mest in prelome, ki nastanejo kot vmesna stopnja pri popravljanju poškodb DNA (izrezovanje baz in nukleotidov) ter so prehodnega značaja (Singh in sod., 1988; Collins in sod., 1997; Tice in sod., 2000). V primerjavi z Ames testom, kjer smo mutacije zaznali že pri nanogramskih koncentracijah tako posameznih HAA kot EPM, so bile za opazne učinke HAA v HepG2 celicah potrebne vsaj nekaj 10 mikrogramske koncentracije HAA. V celicah HepG2 so HAA povzročili podobno povečanje poškodb DNA, razen v celicah izpostavljenim 4,8-DiMeIQx nismo zaznali poškodb DNA. Nižja biološka aktivnost HAA v *in vitro* sesalskih testnih sistemih v primerjavi z bakterijskimi izvira iz razlik v metabolizmu HAA in popravljanju poškodb DNA. HAA v sesalskih celicah povzročajo zamenjavo baznih parov, redko pa pride do delecij in posledično premika bralnega okvirja kot v bakterijah (Schut in Snyderwine, 1999; Turesky, 2010). V *in vitro* raziskavah z različnimi metabolno aktivnimi humanimi celičnimi linijami obstajajo nasprotujoči rezultati o poškodbah (prelomih) DNA, ki naj bi jih povzročali HAA. V raziskavi Wilkeninga in sod. (2003) PhIP v koncentracijah do 300 µM ni povzročil poškodb DNA v celicah HepG2 po 24 h izpostavitvi, medtem ko so jih zaznali v primarnih humanih hepatocitih. PhIP v primerljivih koncentracijah tudi po 48 h izpostavitve ni povzročil poškodb DNA v celicah primarnega hepatocelularnega

karcinoma (HCC2) in HepG2 (Winter in sod., 2008). Nasprotno pa sta Haza in Morales (2010) zaznala od doze odvisno povečanje poškodb DNA v celicah HepG2 po 24 h izpostavitvi do 300 µM koncentracijam PhIP, 4,8-DiMeIQx in MeIQx, pri čemer je 4,8-DiMeIQx povzročil največ poškodb DNA, PhIP pa najmanj. Prav tako so Viegas in sod. (2012) potrdili povečanje poškodb DNA v celicah HepG2 izpostavljenim 24 h 250 µM koncentracijama PhIP in MeIQx. Tudi v metabolno aktivni celični liniji človeškega hepatoma HepaRG je PhIP po 24 h izpostavitve povzročil od doze odvisno povečanje poškodb DNA pri koncentracijah višjih od 50 µM, medtem ko MeIQx in IQ v koncentracijah do 1 mM nista povzročila nastanek prelomov (Dumont in sod., 2010a; Le Hegarat in sod., 2010). Ekstrakti pečenega mesa niso povzročili povečanja poškodb DNA v celicah HepG2 pri izbranih pogojih testiranja. Malo je znanega o genotoksičnem delovanju kompleksnih mešanic HAA v *in vitro* celičnih modelih. Kombinacija PhIP in MeIQx v ekvimolarnih koncentracijah (do 100 µM) po 24 h izpostavitve ni povzročila povečanja poškodb DNA v celicah HepaRG (Dumont in sod., 2010a).

V zadnjem času se kot nova metoda za ugotavljanje genotoksičnosti snovi uporablja določanje fosforiliranih histonov H2AX (t.i. γH2AX), ki se kopičijo na mestih dvoverižnih prelomov DNA (DSB, iz ang. double strand breaks) (Watters in sod., 2009; Smart in sod., 2011; Audebert in sod., 2012). Ugotovili smo, da je največ DSB v celicah HepG2 povzročil PhIP. IQ je povzročil statistično značilno povečanje DSB v primerjavi s kontrolno skupino celic le pri največji testirani koncentraciji (250 µM), medtem ko 4,8-DiMeIQx pri 250 µM koncentraciji ni povečal nastanka DSB. MeIQx ni vplival na povečanje DSB v celicah HepG2. Podobno, kot smo izmerili od doze odvisno povečanje DSB v celicah HepG2 izpostavljenim PhIP, so Jamin in sod. (2013) določili od doze odvisno povečanje DSB v celični liniji mišjih črevesnih celic Apc izpostavljenim 24 h PhIP v koncentracijah 1–100 µM.

Klastogeni učinek HAA je poznan iz *in vivo*, pa tudi iz *in vitro* raziskav na različnih celičnih modelih (Holme in sod., 1987; Thompson in sod., 1987; Aeschbacher in Turesky, 1991; Buonarati in sod., 1991). Klastogene učinke HAA in EPM smo preverjali s testom mikrojeder, s katerim zaznavamo poškodbe kromosomov, kot so prelomi in izgube kromosomov zaradi neločevanja pri celični delitvi, ki se kažejo kot

mikrojedra in nukleoplazemski mostički. Zaznavamo lahko tudi pomnožitve genov – jedrni brsti (Fenech, 2000; El-Zein in sod., 2006). Noben izmed posameznih proučevanih HAA ni povzročil poškodb kromosomov, ki smo jih merili, kljub temu, da so PhIP, IQ in 4,8-DiMeIQx povzročili povečanje DSB v izpostavljenih celicah HepG2. Izmed EPM, pa je le EPM iz skorje piščančjega mesa pri dveh največjih testiranih koncentracijah (0,2 in 1 vol.%) povzročil statistično značilno povečanje števila celic z mikrojedri. Podobno kot pri raziskavah s testom komet, se tudi pri testu mikrojeder v celicah HepG2 in drugih humanih celičnih linijah pojavljajo nasprotujoči rezultati. Tako Katic in sod. (2010) poročajo, da PhIP, v prisotnosti S9 mikrosomalne frakcije podganjih jeter, pri koncentraciji 2,5 µM poveča število nastalih mikrojeder v perifernih humanih limfocitih. V celicah HepG2 so Majer in sod. (2004) zaznali od doze odvisno povečanje števila mikrojeder po 24 h izpostavitvi 25–600 µM koncentracijam PhIP. Prav tako so PhIP, MeIQx in IQ v koncentracijah 25–900 µM povzročili od doze odvisno povečanje števila mikrojeder v celicah HepG2 že po 1 h izpostavitve (Knasmuller in sod., 1999). Podobno so omenjeni HAA po 24 h izpostavitve povzročili povečano število mikrojeder v metabolno aktivnih transfeciranih celicah človeškega limfoma (MCL-5), ki izražajo nekatere encime citokrom P450, med njimi CYP1A1 in CYP1A2 (Pfau in sod., 1999). Nasprotno pa so PhIP, MeIQx in IQ povzročili prelome DNA, ne pa tudi nastanek mikrojeder v celicah HepG2 in HepaRG (Le Hegarat in sod., 2010; Viegas in sod., 2012).

5.1.2 Vpliv HAA na izražanje genov, ki kodirajo metabolne encime celic HepG2

Razlike med humanimi celičnimi linijami v poškodbah DNA, ki jih povzročijo HAA, so posledica razlik v izražanju in aktivnosti encimov udeleženih pri aktivaciji in detoksifikaciji HAA v različnih celičnih tipih ter različni občutljivosti celic. Doostdar in sod. (1988) so odkrili, da je v celicah HepG2 izražanje oz. aktivnost nekaterih metabolnih encimov (npr. UGTs in GSTs) odvisna od sestave celičnega gojišča. Aktivnost encimov v celicah HepG2 je odvisna tudi od dolžine gojenja, tj. pasaže celic (Wilkening in Bader, 2003). William medium E, ki smo ga uporabili za gojenje celic HepG2, je primerno gojišče, ki omogoča optimalno izražanje njihovih metabolnih

encimov. Celice uporabljene v poskusih, pa niso presegle 10. pasaže. Odziv celic na genotoksični stres HAA je v veliki meri odvisen od razmerja med metabolno aktivacijo in detoksifikacijo HAA ter sposobnostjo popravljanja poškodb DNA (Airoldi in sod., 2004). Kot smo že omenili morajo biti HAA metabolno aktivirani, da lahko povzročijo poškodbe DNA. Zato smo v celicah HepG2 po izpostavitvi HAA preverili izražanje genov, ki kodirajo ključne encime udeležene v metabolizmu HAA. V prvi stopnji metabolne aktivacije HAA pri ljudeh poteče hidroksilacija amino funkcionalne skupine, katero katalizirajo encimi citokrom P450 1A, v jetrih predvsem CYP1A1 in CYP1A2. Nastanejo reaktivni *N*-hidroksi-HAA metaboliti, ki se lahko vežejo na DNA (Crofts in sod., 1998; Schut in Snyderwine, 1999; Turesky in sod., 1999; Nebert in sod., 2004). Vsi proučevani HAA so v celicah HepG2 od doze odvisno povečali izražanje genov *CYP1A1* in *CYP1A2*. Največje izražanje *CYP1A1* je povzročil 4,8-DiMeIQx, sledil je MeIQx in IQ ter PhIP. Največje izražanje *CYP1A2* pa je povzročil IQ, nato oba imidazokinoksalina in PhIP. Izražanje obeh genov je najverjetneje sprožila vezava HAA na AhR receptorje (iz ang. aryl hydrocarbon receptor), kar so potrdili tudi v celicah humanega hepatoma HepaRG (Dumont in sod., 2010b). V drugi stopnji metabolizma oz. aktivacije HAA poteče *O*-acetilacija ali sulfatacija oz. sulfonacija *N*-hidroksi-HAA metabolitov. Nastanejo zelo reaktivni bodisi *N*-acetoksi-HAA produkti bodisi sulfatni oz. sulfoniloksi estri HAA. Reakciji katalizirajo *N*-acetiltransferaze oz. sulfotransferaze, v humanih jetrih predvsem NAT2 in SULT1A1 (Turesky in sod., 1991; Schut in Snyderwine, 1999; Hein, 2002). V celicah HepG2 proučevani HAA niso povzročili sprememb v izražanju *NAT2*, razen PhIP je pri največji testirani koncentraciji (200 µM) povzročil 2-kratno povečanje izražanja *NAT2*, ki pa ni bilo statistično značilno. Nasprotno pa je IQ statistično značilno zmanjšal izražanje *NAT2* pri koncentracijah večjih od 25 µM. Izražanje gena, ki kodira encim SULT1A1, nismo zaznali pri uporabljenih eksperimentalnih pogojih. Poškodbe DNA, ki smo jih zaznali s testom komet in merjenjem fosforiliranih histonov H2AX, ne pa tudi s testom mikrojeder, po izpostavitvi celic HepG2 HAA nakazujejo, da so večino poškodb povzročili *N*-hidroksi-HAA metaboliti, ki se lahko vežejo na DNA. Odsotnost izražanja encimov NAT2 in SULT1A1, ki sta ključna encima pri nastanku arilnitrenijevih ionov, bi lahko bil vzrok za relativno malo izmerjenih poškodb DNA in za negativne rezultate testa mikrojeder. V raziskavah na genetsko spremenjenih celičnih linijah ovarijskih celic hrčka (UV5-

CHO), ki nimajo popravljalnih mehanizmov za zamenjavo nukleotidov in poleg humanih encimov citokrom P450 izražajo tudi humana NAT2 in SULT1A1, so ugotovili, da se število DNA aduktov in mutagenost HAA močno poveča v celicah transfeciranih z omenjenima encimoma II. stopnje metabolizma (Wu in sod., 1997; Wu in sod., 2000; Metry in sod., 2007; Bendaly in sod., 2009; Metry in sod., 2010). Na obseg poškodb DNA vplivajo tudi metabolne poti, ki vodijo v detoksifikacijo HAA. Vezava glukuronske kisline na amino skupino HAA ali na dušikov atom imidazolskega obroča *N*-hidroksi-HAA metabolitov je glavna pot detoksifikacije HAA, (glukuronidacija) katalizira pa jo družina UDP-glukuronoziltransferaz 1A (UGT1A) (Alexander in sod., 1991; Styczynski in sod., 1993; Kaderlik in sod., 1994b; Green in Tephly, 1998; Kulp in sod., 2000; Malfatti in Felton, 2001). UGT1A1 naj bi bil glavni encim glukuronidacije v jetrih ljudi (Turesky in Le Marchand, 2011). Vsi proučevani HAA so v celicah HepG2 statistično značilno od doze odvisno povečali izražanje *UGT1A1*. Največje izražanje *UGT1A1* je povzročil 4,8-DiMeIQx, nato IQ in MeIQx, najmanjše povečanje izražanja *UGT1A1* pa smo zaznali pod vplivom PhIP. Izražanje *UGT1A1* je koreliralo z izražanjem s *CYP*. Tako je detoksifikacija HAA v celicah HepG2 tudi vzrok za relativno malo izmerjenih poškodb DNA. Malfatti in sod. (2005) so dokazali, da so genetsko spremenjene celice CHO, ki izražajo humani CYP1A2 in UGT1A1 bolj odporne na citotoksično in mutagено delovanje PhIP. Razmerje med metabolno aktivacijo in detoksifikacijo HAA je v našem primeru najverjetnejše v prid slednje. Metabolna aktivacija PhIP s CYP1A2 v primarnih humanih hepatocitih naj bi predisponirala *N*-hidroksi-PhIP za glukuronidacijo (Yueh in sod., 2001). Langouët in sod. (2002) so odkrili, da se 80% vsega PhIP v izpostavljenih humanih hepatocitih pretvori v netoksične metabolite glukuronidacije, 12% pa v 4'-HO-PhIP (2-amino-4'-hidroksi-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin). PhIP se lahko metabolizira v netoksični produkt s hidroksilacijo C4 atoma, ki pa jo pri ljudeh naj ne bi katalizirali encimi citokrom P450. Dokazali so, da kljub izpostavitvi humanih hepatocitov furafilinu – inhibitorju CYP1A2, ni prišlo do zmanjšanega nastanka 4'-HO-PhIP. V poskusih s humanimi jetrnimi mikrosomi z dodatkom NADPH, kot donorja elektronov za CYP, ni nastajal 4'-HO-PhIP (Langouët in sod., 2002; Turesky in sod., 1998; Turesky in sod. 2002). Poleg glukuronidacije *N*-hidroksi-MeIQx je glavna pot detoksifikacije MeIQx pri ljudeh nastanek karboksilne kisline (IQx-8-COOH), ki v izpostavljenih humanih

hepatocitih lahko predstavlja tudi do 43% začetne doze MeIQx. Nastanek IQx-8-COOH katalizira CYP1A2 (Turesky in sod., 1991; Langouët in sod., 2001). Metabolizem IQ in 4,8-DiMeIQx je slabo poznан. Njuna struktturna podobnost z MeIQx nakazuje, da IQ in 4,8-DiMeIQx verjetno tvorita podobne metabolite. Detoksifikacija je bila najverjetnejše glavna metabolna pot proučevanih HAA v celicah HepG2, zato ne preseneča majhna razlika v poškodbah DNA med PhIP, MeIQx in IQ. Zanimivo je, da 4,8-DiMeIQx, ki je imel največji mutageni potencial v Amesovem testu in je povzročil največje izražanje *CYP1A1*, ni povzročil poškodb DNA v celicah HepG2. *N*-hidroksi-DiMeIQx je zelo nestabilen in se slabo veže na DNA, medtem ko je *N*-acetoksi-DiMeIQx močan mutagen (Frandsen in sod., 1994a, 1994b). Vezava ligandov na AhR receptorje sproži izražanje genov, ki kodirajo encim CYP1A1 ter v manjši meri CYP1A2 in UGT1A1 (Lin in Lu, 1998; Whitlock, 1999; Yueh in sod., 2003; Tompkins in Wallace, 2007). Afiniteta posameznih HAA do AhR receptorja je slabo poznana. Kleman in sod. (1992) so odkrili, da večjo afiniteto do AhR receptorjev izkazujejo HAA, ki imajo vezani metilni funkcionalni skupini na C4 in C8 mesti aromatskih obročev. Tako strukturo ima 4,8-DiMeIQx. Visoka afiniteta 4,8-DiMeIQx do AhR receptorjev je možna razlagata močno povečanega izražanja *CYP1A1* ter tudi največjega izražanja *UGT1A1* v primerjavi z ostalimi proučevanimi HAA. Izražanje *CYP1A1* pod vplivom 4,8-DiMeIQ je primerljiva z izražanjem, ki ga je povzročil BaP. Slednji je znan po veliki afiniteti do AhR receptorja (Kleman in sod., 1992). Izražanje encimov citokrom P450, med njimi tudi družine CYP1A, se sproži tudi preko drugih receptorjev (Tompkins in Wallace, 2007). BaP je povzročil tudi do 2-kratno povečanje prelomov DNA in mikrojeder v celicah HepG2, kar potrjuje, da je bila aktivnost encimov citokrom P450 pri izvedenih poskusih ohranjena. Sklepamo, da je malo zaznanih poškodb DNA v celicah HepG2 izpostavljenim HAA posledica odsotnosti izražanja *NAT2* in *SULT1A1* in detoksifikacija HAA. Izmed možnih poti detoksifikacije HAA je tudi konjugacija njihovih reaktivnih metabolitov z glutationom bodisi spontano bodisi reakcijo katalizirajo glutation S-transferaze (GSTs) (Coles in sod., 1990). Izražanje gena, ki kodira encim GSTA1, je bilo v celicah HepG2 izpostavljenim HAA zmanjšano, še posebej pod vplivom 4,8-DiMeIQx in MeIQx. Proučevani HAA, razen *N*-acetoksi-PhIP, naj ne bi bili substrati humanih GSTs (Lin in sod., 1994). V *in vivo* raziskavi je akutna

izpostavitev podgan IQ povzročila 81% zmanjšanje izražanja *GSTA1* v jetrih (McPherson in sod., 2001).

EPM in kombinacije HAA v koncentracijah, ki se pojavljajo v ekstraktih, so podobno kot posamezni HAA najbolj povečali izražanje genov, ki kodirajo encima CYP1A1 in CYP1A2. Stopnja izražanja obeh genov, ki so jo povzročili EPM skorje je primerljiva z izražanjem, ki so ga povzročili posamezni HAA, kljub temu, da je bila koncentracija HAA v EPM za faktor 10 in več manjša od testiranih koncentracij HAA. Podobno smo opazili pri izražanju genov, ki kodirata encima UGT1A1 in GST1A. To kaže na izrazit sinergistični učinek zmesi HAA, ki nastane pri pečenju mesa. Sinergistični učinek na izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2* so opazili tudi v celicah HepaRG izpostavljenim ekvimolarnima koncentracijama PhIP in MeIQx (Dumont in sod., 2010a). Vendar pa za razliko od posameznih HAA nismo zaznali poškodb DNA v celicah HepG2 po izpostavitvi EPM. Le EPM skorje piščanca je povzročil nastanek mikrojeder pri največjih testiranih koncentracijah (0,2 in 1 vol.%). Poleg že opisane detoksifikacije je izmed možnih razlogov nezaznavanja poškodb DNA tudi majhna količina HAA v ekstraktih. Posledično je nastalo majhno število HAA-DNA aduktov in s tem prelomov DNA, ki jih testa genotoksičnosti nista zaznala ali pa so nastale DNA adukte celice HepG2 popravile, kot je opisano v nadaljevanju v poglavju 5.1.2. Nastanek mikrojeder, ki jih je povzročil EPM iz skorje piščančjega mesa, kaže na možno prisotnost neidentificiranih HAA (pod mejo zaznavnosti) v ekstraktu. Lahko, da je količina HAA v EPM piščanca zadostovala za spremembo na ravni kromosomov (nastanek mikrojeder) ter je prišlo do sinergističnega učinka posameznih HAA. V celični liniji pljučnih fibroblastov hrčka (V79) izpostavljenim kombinacijam dveh HAA (PhIP, IQ ali IQx) v ekvimolarnima koncentracijama so opazili aditiven učinek pri nastanku mikrojeder (Perez in sod., 2002). V *in vivo* raziskavah, kjer so podgane izpostavili mešanici HAA so opazili njihov sinergistični učinek pri nastanku predrakovih sprememb v jetrih, ki vodijo v nastanek hepatokarcinoma (Hasegawa in sod., 1991; Ito in sod., 1991; Hasegawa in sod., 1994a, 1994b; Hasegawa in sod., 1996). Mikrojedra so lahko posledica *N*-acetoksi-HAA metabolitov, ki se vežejo z DNA ter posledično povzročijo prelome DNA. *N*-acetoksi-HAA metaboliti nastanejo v II. stopnji metabolizma HAA, reakcijo pa katalizirajo *N*-acetiltransferaze. V celicah HepG2

izpostavljenim EPM iz skorje piščančjega mesa smo izmerili 2-kratno povečanje izražanja *NAT2* v primerjavi s kontrolno skupino celic, vendar povečanje ni bilo statistično značilno. Podobno povečanje izražanja *NAT2* smo določili tudi v celicah izpostavljenim posameznim in kombinacijam HAA, ki so bile določene v EPM piščanca. EPM iz skorje govejega mesa je povzročil statistično značilno povečanje izražanja *NAT2* v izpostavljenih celicah HepG2. Kljub zaznanemu povečanju izražanja *NAT2* pa nismo opazili klastogenih učinkov HAA oz. poškodb DNA v celicah, ki bi bile posledica *N*-acetoksi-HAA oz. njihove vezave na DNA in tvorjenja HAA-DNA aduktov. Iz *in vitro/in vivo* in epidemioloških raziskav je poznano, da na aktivnost encimov ter posledično stopnjo metabolizma HAA vpliva polimorfizem genov, ki kodirajo metabolne encime. Ugotovili so, da so ljudje, ki imajo zmanjšano aktivnost *NAT2* encima (»počasni acetilatorji«), manj dovetni za nastanek raka v različnih organih, kot so npr. rak debelega črevesa, mehurja, pljuč ali dojke (Hein in sod., 2000; Hein, 2002; Hein in sod., 2002). Costa in sod. (2005) so odkrili, da je pri moških z genotipom »počasne« acetilacije (*NAT*6/NAT*6*) manjša verjetnost nastaka raka prostate. Pri ljudjeh oz. v celicah z genotipom »hitre« acetilacije so HAA hitreje aktivirani v reaktivne metabolite, ki povzročajo poškodbe DNA, v primerjavi z genotipom »počasne« acetilacije (Minchin in sod., 1993; Nagao in Sugimura, 1993). Celice HepG2 so heterozigotne z aleloma *NAT2*5B* in *NAT*6A*. Genotipe z omenjenima aleloma povezujejo z zmanjšano aktivnostjo encima *NAT2* oz. s »počasno« acetilacijo (Knasmuller in sod., 1999; Hein in sod., 2000; Hein, 2002; Loktionov in sod., 2002). Zmanjšana aktivnost *NAT2* je tudi možen vzrok, da nismo zaznali poškodb DNA oz. klastogenih učinkov v celicah HepG2 izpostavljenim HAA oz. EPM. V genetsko spremenjenih ovarijskih celicah hrčka (UV5-CHO), ki izražajo humani *NAT2*5B*, so PhIP, MeIQx in IQ povzročili manjše število DNA aduktov kot v celicah UV5-CHO, ki izražajo humani *NAT2*4* (Bendaly in sod., 2007; Metry in sod., 2007, 2010). Alel *NAT2*4* povezujeo s »hitro« acetilacijo (Alaejos in sod., 2008; Turesky, 2010; Turesky in Le Marchand, 2011). Podobno so Stones in sod. (1998) odkrili, da je v primarnih humanih epitelnih celicah (HMEC) izpostavljenim PhIP, MeIQx in IQ število HAA-DNA aduktov odvisno od genotipa donorjev. Celice HMEC z genotipom »hitre« acetilacije so imele več HAA-DNA aduktov.

Izpostavitev celic HepG2 kombinacijam HAA, ki smo jih pripravili v enakih koncentracijah in razmerjih, kot so bile izmerjene v EPM, daje vpogled v medsebojne interakcije posameznih HAA ter njihov vpliv na izražanje genov, ki kodirajo encime udeležene v metabolizmu HAA. Kombinacija vseh treh HAA, ki smo jih izmerili v EPM iz skorje piščančjega mesa (PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx) je povečala izražanje *CYP1A1* in *UGT1A1* v enaki meri kot EPM iz skorje piščančjega mesa, medtem ko je bilo povečanje izražanja *CYP1A2* in *GSTA1* v celicah pod vplivom kombinacije treh proučevanih HAA skoraj 2-krat oz. 1,5-krat večje v primerjavi s celicami izpostavljenimi EPM piščanca. Vzrok za razliko v izražanju *CYP1A2* in *GSTA1* je težko določljiv. Možno je, da gre za antagonističen vpliv neidentificirani HAA (pod mejo zazanavnosti) v EPM piščanca na izražanje *CYP1A2* in *GSTA1*. Kot smo ugotovili že pri proučevanju posameznih HAA v koncentracijah od 25 do 250 µM, smo tudi pri pripravljenih posameznih HAA in njihovih kombinacijah v koncentracijah kot smo jih določili v EPM opazili, da je PhIP povzročil manjše izražanje *CYP1A1*, *CYP1A2* in *UGT1A1* v izpostavljenih celicah v primerjavi z MeIQx in 4,8-DiMeIQx. Zanimivo je, da kombinacija PhIP in MeIQx v enakih koncentracijah, kot sta bila izmerjena v EPM iz skorje prašičjega in piščančjega mesa, ne kaže aditivnega oz. sinergističnega učinka na izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2*. Pri kombinaciji PhIP in MeIQx v enakih koncentracijah, kot sta bila izmerjena v EPM iz skorje govejega mesa, pa sinergistični učinek opazimo. Razlika bi lahko bila posledica različnega deleža oz. koncentracij MeIQx in PhIP v kombinaciji oz. EPM. PhIP smo pripravili slabih 10% več kot MeIQx, enako kot je bilo njuno razmerje v EPM govedine, medtem ko je bila razlika v deležu med PhIP in MeIQx v ostalih EPM komaj 2%. MeIQx sproži večje izražanje obeh genov v primerjavi s PhIP, kar smo dokazali že pri proučevanju posameznih HAA v koncentracijah od 25 do 250 µM. Zato se učinek PhIP pozna le pri kombinaciji pripravljeni na podlagi izmerjenih koncentracij HAA v EPM govedine, v katerem je bila količina PhIP večja. Vpliv posameznih HAA v ekstraktu na izražanje genov najbolje vidimo na primeru EPM piščanca. 4,8-DiMeIQx je podobno kot pri proučevanju posameznih HAA najbolj povečal izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2*. Izražanje obeh genov je primerljivo z izražanjem pod vplivom MeIQx, katerega je bilo v EPM piščanca 8-krat več. V kombinacijah kjer je prisoten 4,8-DiMeIQx je bilo izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2* večje od kombinacije PhIP in MeIQx. V kombinacijah dveh HAA, kjer je prisoten 4,8-

DiMeIQx smo zaznali aditiven oz. sinergistični učinek na izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2*, razen pri izražanju *CYP1A1* v celicah HepG2 pod vplivom 4,8-DiMeIQx v primerjavi s kombinacijo PhIP in 4,8-DiMeIQx ni bilo statistično značilne razlike. Pri kombinaciji PhIP in MeIQx se zdi, da PhIP nima vpliva na izražanje obeh genov I. stopnje metabolizma. V kombinaciji PhIP s 4,8-DiMeIQx pa pride do sinergističnega učinka. PhIP tudi izrazito poveča sinergistični učinek vseh treh HAA na izražanje citokromov P450. Nasprotno pa PhIP ni povzročil sprememb v izražanju *UGT1A1* v koncentraciji, ki smo jo izmerili v EPM piščanca ter ni vplival na izražanje *UGT1A1* v celicah HepG2 izpostavljenim različnim kombinacijam HAA, kar lahko pomeni, da se je večji delež PhIP v ekstraktu biotrasnformiral po poti detoksifikacije, ki jo ne katalizirajo encimi citokrom P450, kot je že bilo opisano. Posledično niso nastajali *N*-hidroksi-PhIP metaboliti, ki bi povzročili izražanje *UGT1A1*.

Test komet in test mikrojeder, ki sta bila uporabljeni pri določanju genotoksičnega potenciala HAA in EPM v celicah HepG2, sta zelo občutljivi metodi za določanje poškodb DNA. Kljub povečanemu izražanju genov, ki kodirata encima CYP1A1 in CYP1A2 ter sta ključna encima bioaktivacije HAA, smo zaznali relativno malo poškodb DNA v HAA izpostavljenim celicam. Metaboliti, ki nastanejo pri aktivaciji HAA, tvorijo DNA adukte z vezavo na C8 mesto deoksigvanozina (Schut in Snyderwine, 1999). DNA adukti, ki jih tvorijo HAA, se odstranjujejo z izrezovanjem nukleotidov (iz ang. NER – nucleotide excision repair) (Turesky, 2010; Turesky in Le Marchand, 2011). Malo zaznanih poškodb DNA, ki so jih povzročili HAA oz. EPM, je poleg omenjenega metabolizma tudi posledica popravljalnih mehanizmov DNA v celicah. S testom komet zaznavamo tudi prelome, ki so vmesna stopnja pri izrezovanju baz in nukleotidov ter so prehodnega značaja (Singh in sod., 1988; Tice in sod., 2000). Tako je del zaznanih poškodb DNA s testom komet v HAA izpostavljenih celicah posledica popravljalnih mehanizmov. V celicah človeškega limfoma (MCL-5) izpostavljenim aminokarbolinom in trem aminoimidazoazarenom (PhIP, 4,8-DiMeIQx in MeIQx) so odkrili, da se detekcija prelomov DNA s testom komet poveča ob uporabi inhibitorjev DNA popravljanih mehanizmov, kot sta citozin arabinozid (AraC) in hidroksikarbamid (hidroksiurea – HU). AraC in HU sta inhibitorja DNA polimeraze in ribonukleotid reduktaze, ki sodeluje pri pretvorbi ribonukleotidov v

deoksiribonukleotide. Prepoznavanje in izrezovanje DNA aduktov ob pristonosti inhibitorjev poteče, medtem ko se polimerizacija DNA ustavi (Martin in sod., 1999). Fan in sod. (1995) so pokazali, da so bili DNA adukti, ki jih tvorita PhIP in IQ v izpostavljenih primarnih humanih epitelnih celicah (HMEC) uspešno odstranjeni. V 24 h so celice HMEC odstranile od 60 do 80% DNA aduktov. 4,8-DiMeIQx ni povzročil prelomov DNA v celicah HepG2 po 24 h izpostavitve. 4,8-DiMeIQx-DNA adukti se ali ne popravljajo ali pa se zelo hitro popravljajo. V obeh primerih jih ne moremo zaznati s testom komet.

5.1.3 Vpliv HAA in EPM na celični cikel in njegovo regulacijo

Genotoksični stres v celicah spoži signalne poti, ki povzročijo zaustavitev celičnega cikla in popravljanje poškodb DNA ali pa senesceno oz. apoptozo (Zhou in Elledge, 2000; Harper in Elledge, 2007). Glavno vlogo v celičnem odzivu na poškodbe DNA ima transkripcijski faktor TP53 oz. P53, ki posredno ali neposredno regulira izražanje številnih genov sodelujočih v odgovoru celice na genotoksični stres (Amundson in sod., 1998; Vogelstein in sod., 2000; Ellinger-Ziegelbauer in sod., 2004). Izmed s P53 neposredno reguliranih genov smo določali izražanje treh: E3 ubikvitin ligaze (*MDM2*), inhibitorja od ciklina odvisnih kinaz (*CDKN1A*) in *GADD45α* (iz ang. growth arrest and DNA damage inducible protein). Znano je, da se ti geni diferencialno izražajo le v celicah izpostavljenim genotoksičnim karcinogenom, zato so zanesljiv marker genotoksičnega stresa (Ellinger-Ziegelbauer in sod., 2004; Ellinger-Ziegelbauer in sod., 2005). HAA in EPM niso povečali izražanja *MDM2* in *P53* v celicah HepG2 po 24 h izpostavitve. 4,8-DiMeIQx je statistično značilno zmanjšal izražanje *P53*, a povečal izražanje *MDM2*. IQ pa je statistično značilno zmanjšal izražanje *MDM2*. Izražanje *MDM2* je negativno koreliralo z izražanjem *P53* v celicah HepG2 izpostavljenim HAA, kar je skladno z njegovo funkcijo. MDM2 skupaj s P53 tvori negativno povratno zanko. P53 se ob povečani količini v celici veže na promotor gena *MDM2* ter sproži njegovo prepisovanje. MDM2 pa prepreči transkripcijsko dejavnost P53 ter pospeši njegov transport iz jedra in razgradnjo na proteosomu (Roth in sod., 1998; Harris in Levine, 2005). Čeprav nismo zaznali sprememb v izražanju *P53* na transkripcijskem nivoju,

smo določili povečanje količine proteina P53 in njegovih posttranslacijskih sprememb v celicah HepG2 po izpostavitvi vsem proučevanim HAA (PhIP, 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ). To ni nenavadno, saj je znano, da se P53 poveča ob stresu celice, kljub nespremenjenemu izražanju gena, ki ga kodira. Količina P53 se poveča zaradi ustavitev njegove razgradnje, reguliran pa je tudi na translacijskem nivoju. P53 se aktivira s fosforilacijo, reakcijo pa katalizirajo od poškodb DNA odvisne kinaze. Aktivnost P53 regulirajo tudi številne posttranslacijske modifikacijame (Even in Miller, 1996; Lakin in Jackson, 1999; Ponnuswamy in Fahraeus, 2012). HAA so v celicah HepG2 povečali izražanje *CDKN1A*, najbolj 4,8-DiMeIQx, nato MeIQx in IQ ter najmanj PhIP. Povečano izražanje *CDKN1A* so povzročili tudi EPM iz skorje prašičjega in piščančjega mesa ter kombinaciji imidazokinoksalinov ter imidazokinoksalinov in PhIP v koncentracijah kot so bile izmerjene v EPM piščanca. Ugotovimo lahko, da kombinacije HAA, ki se pojavljalo v EPM povzročijo sinergistični učinek na izražanje *CDKN1A* kot posamezni HAA. EPM govedine je vseboval najmanj HAA ter ni povzročil poškodb DNA. Zato je razumljivo, da sprememb v izražanju *CDKN1A* nismo zaznali. Izražanje *GADD45α* je izraziteje povečal le MeIQx. *CDKN1A* ustavi prehod iz G1 v S fazo celičnega cikla, tako da inhibira D tip ciklinov (El-Deiry in sod., 1993; Waldman in sod., 1995). *GADD45α* kontrolira prehod iz G2 v M fazo celičnega cikla. Veže se na CDC2 (od ciklina odvsino kinazo) in jo inaktivira kar povzroči ustavitev cikla (Hollander in sod., 1993; Wang in sod., 1999). Izražanje *CDKN1A* je dobro koreliralo z izražanjem *CYP1A1*, kar nakazuje na genotoksični stres v celicah HepG2 povzročen s HAA in EPM. Prav tako smo določili povečano izražanje CDKN1A na proteinskem nivoju. Povečano izražanje gena in proteina CDKN1A v celicah HepG2 pod vplivom HAA kaže na aktivnost P53. Slednji neposredno regulira izražanje *CDKN1A* z vezavo na njegov promotor ter posledično vpliva na količino nastalega proteina. Povečanje izražanja proteinov P53 in CDKN1A so odkrili tudi po 24 h izpostavitvi metabolno aktiviranemu PhIP v humanih limfoblastoidnih TK6 celicah in v celicah humanega adenokarcinoma dojke (MCF10A) (Duc in Leong-Morgenthaler, 2001; Creton in sod., 2005; Gooderham in sod., 2007). V *in vivo* dolgodobnem poskusu na podganah izpostavljenim IQ so v jetrih podgan ugotovili povečano izražanje *CDKN1A* in *GADD45α* ter nespremenjeno izražanje *P53* (Wei in sod., 2011). Izražanje *CDKN1A* in *GADD45α* v izpostavljenih celicah HepG2 potrjuje, da so HAA povzročili poškodbe

DNA, na katere so se celice odzvale z zaustavitvijo celičnega cikla in aktivacijo popravljalnih mehanizmov DNA. V zadnjih letih je vse več dokazov, da CDKN1A ni vpleten samo v regulacijo celičnega cikla, ampak neposredno regulira tudi mehanizme popravljanja poškodb DNA, predvsem popravljanje z izrezovanjem nukleotidov in baz (Cazzalini in sod., 2010).

Izražanje genov oz. proteinov, ki se odzovejo na poškodbe DNA (P53 in CDKN1A), je, kot smo ugotovili, povezano s spremembami celičnega cikla celic HepG2 pod vplivom HAA. Po 24 in 36 h izpostavitve celic HepG2 IQ in PhIP se je delež celic v G1 fazi celičnega cikla zmanjševal, delež celic v S fazi pa povečeval od doze odvisno. EPM iz skorje piščančjega mesa je povečal delež celic v S fazi po 36 h izpostavitve. Nasprotno pa sta 4,8-DiMeIQx in MeIQx pri največjih testiranih koncentracijah (100 in 200 oz. 250 µM) povečala delež celic v G0/G1 fazi. Malo je znanega o vplivu HAA na celični cikel. Podobno kot smo opazili v celicah HepG2, metabolno aktiviran PhIP tudi v celicah TK6 in MCF10A poveča delež celic v S fazi celičnega cikla (Zhu in sod., 2000; Gooderham in sod., 2002; Gooderham in sod., 2007). PhIP povzroča zaustavitev celičnega cikla celic MCF10A v G1 fazi po 24 h izpostavitve, kot so opazili Creton in sod. (2005). Ne vemo, zakaj pride pod vplivom HAA do aktivacije različnih kontrolnih točk ter posledično zaustavitev celičnega cikla v različnih fazah. Zaustavitev celičnega cikla v G1 naj bi bila posledica enoverižnih prelomov DNA, zaustavitev v S fazi pa posledica dvojerižnih prelomov DNA (Sasaki, 2003; Sancar in sod., 2004). Dokazali smo, da PhIP in IQ v celicah HepG2 povzročata DSB in ustavljata celični cikel v S fazi. Prav tako je 1 vol. % EPM iz skorje piščančjega mesa ustavil celični cikel celic v S fazi po 36 h izpostavitvi in povzročil nastanek mikrojeder, ki so posledica DSB. Nasprotno pa sta 4,8-DiMeIQx in MeIQx pri največji testirani koncentraciji (200 oz. 250 µM) ustavila celični cikel v G1 fazi in nista povzročila DSB. Na celični cikel naj bi vplival tudi AhR receptor. 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD), ki je med najbolj znanimi AhR ligandi, ustavlja celični cikel v G1 fazi izpostavljenih celic podganjega hepatoma 5L, medtem ko TCDD ne vpliva na celični cikel omenjenih celic z okvarjenim AhR receptorjem (Göttlicher in sod., 1990; Wiebel in sod., 1991). Podobno so odkrili Abdelrahim in sod. (2003) od AhR receptorja odvisno zaustavitev celičnega cikla v G1 fazi v celicah HepG2. AhR receptor naj bi deloval preko kontrole

transkripcije ciklinov, od ciklinov odvisnih kinaz ali od ciklinov odvisnih fosfataz oz. naj bi blo njegovo delovanje bolj indirektno preko kontrole transkripcije rastnih faktorje. Omenjeni regulaciji celičnega cikla pa naj bi bili neodvisni od DNA poškodb (Marlowe in Puga, 2005). Kot je bilo že omenjeno imata oba testirana imidazokinoksalina veliko afiniteto do AhR receptorja, kar nakazuje tudi zelo povečano izražanje *CYP1A1* in *CYP1A2*. Zato je verjetno, da je povečan delež celic v G1 fazi celičnega cikla, ki smo ga opazili pri celicah HepG2 izpostavljenim 4,8-DiMeIQx in MeIQx, posledica vpliva aktiviranega AhR receptorja. Pri koncentracijah manjših od 100 µM PhIP, 4,8-DiMeIQx in MeIQx niso povzročili zaustavitev celičnega cikla celic HepG2. PhIP v majhnih koncentracijah ne povzroča zaustavitev celičnega cikla TK6 celic (Creton in sod., 2005). Prav tako nismo izmerili sprememb celičnega cikla celic HepG2 izpostavljenim različnim kombinacijam HAA, ki smo jih izmerili v EPM piščanca. Pri vseh testiranih HAA je po 36 h opazen trend zmanjšanja vpliva na celični cikel celic HepG2, ki je pri PhIP povsem izginil. To nakazuje na uspešno popravljanje poškodb DNA povzročenih s HAA, kar je skladno z relativno malo zaznanimi poškodbami DNA. Zhu in sod. (2000) so v celicah TK6 opazili dva mehanizma delovanja PhIP na celični cikel: pri krajši izpostavitvi pride do prehodne zaustavitev celičnega cikla v S fazi, pri podaljšani izpostavitvi pa do zaustavitev celičnega cikla in apoptoze celic, kar naj bi bilo povezano z večjim obsegom poškodb DNA pri daljši izpostavitvi. V celicah HepG2 izpostavljenim EPM iz skorje piščančjega mesa je prišlo do zaustavitev celičnega cikla v S fazi šele po 36 h. Ker je koncentracija izmerjenih HAA v EPM piščanca 4-krat manjša kot najmanjša testirana koncentracija posameznega HAA (25 µM), je verjetno obseg nastalih poškodb DNA, povzročenih z EPM piščanca, dosegel prag pri katerem je prišlo do zaustavitev celičnega cikla šele po 24 h. Zanimivo je, da kombinacija treh HAA v koncentraciji, ki smo jo izmerili v EPM piščanca, ni povzročila sprememb v celičnem ciklu celic HepG2, čeprav je bilo izražanje gena *CDKN1A* pod vplivom te kombinacije bolj povečano, kakor pri izpostavitvi celic EPM iz skorje piščančjega mesa. Lahko, da gre za sinergistične učinke vseh HAA na celični cikel celic HepG2, tako zaznanih in tistih pod mejo zaznavnosti.

Zaustavitev celičnega cikla omogoča celicam popravljanje poškodovane DNA. Vendar popravljanje ni popolno oz. lahko pride do napak ter mutacij ter posledično do

adaptacije na poškodbe DNA (Sandell in Zakian, 1993; Roberts in sod., 2001; Creton in sod., 2005). Tako celice s poškodovano DNA nadaljujejo rast, kar privede do fiksacije mutacij.

5.1.4 Vpliv HAA in EPM na programirano celično smrt

Poškodbe DNA najprej povzročijo ustavitev celičnega cikla in zagon popravljalnih mehanizmov DNA. Obsežne oz. nepopravljive poškodbe DNA pa sprožijo proces programirane celične smrti ali apoptoze. Nepravilno delovanje mehanizmov, ki vodijo celice v apoptozo ter posledično izognitev poškodovanih celic apoptizi je med glavnimi značilnostmi nastanka tumorjev (Hanahan in Weinberg, 2000). Poškodbe DNA največkrat sprožijo notranjo oz. intrinzično pot apoptoze, ki jo regulirajo številni proteini iz družine BCL-2 (Korsmeyer, 1999). Po poškodbah DNA se aktivira prva skupina pro-apoptotskih proteinov (npr. BID, BIM, PUMA, ...), ki razgradijo anti-apoptotske proteine, kot so BCL-2, BCL-X_L, BCL-w, ... (Kaufmann in Hengartner, 2001; Haupt in sod., 2003). Anti-apoptotski proteini z zaviranjem regulirajo drugo skupino pro-apoptotskih proteinov, kot sta BAX in BAK (Green in Evan, 2002). Oba proteina se vežeta v zunanjo mitohondrijsko membrano ter tvorita pore, ki povečajo njeno prepustnost. Začne se sproščanje citokroma c v citosol, ki deluje kot aktivator nadaljnih mehanizmov apoptoze (Goping in sod., 1998; Antonsson in sod., 2000). Transkripcijski faktor P53 neposredno regulira izražanje genov oz. proteinov vključenih v apoptizo kot sta BAX in BCL-2 (Haupt in sod., 2003). Kot že omenjeno HAA v izpostavljenih celicah HepG2 niso povzročili povečanega izražanja gena, ki kodira P53, pač pa smo dokazali povečanje količine P53. Sprememb v izražanju pro-apoptotskega gena *BAX* v izpostavljenih celicah HepG2 ni bilo, pri največjih testiranih koncentracijah 4,8-DiMeIQx, MeIQx in IQ je izražanje *BAX* celo statistično značilno upadlo. Nasprotno pa se je pri večjih testiranih koncentracijah HAA izražanje anti-apoptotskega *BCL-2* v celicah HepG2 povečalo. Prav tako smo zaznali povečanje količine proteina *BCL-2* v izpostavljenih celicah, medtem ko je količina BAX v primerjavi s kontrolno skupino celic ostala nespremenjena. V *in vivo* raziskavi so v tumorjih debelega črevesa podgan izpostavljenim IQ odkrili povečano izražanje proteina *BCL-2* in znižano

izražanje proteina BAX ter inhibicijo programirane celične smrti (Hayashi in sod., 1996). Podobno razliko v izražanju BCL-2 in BAX so odkrili tudi Venugopal in sod. (1999) v celicah MCF10A izpostavljenim 24 h PhIP in N-hidroksi-HAA, ki sta v majhnih koncentracijah ($100 \mu\text{M}$ oz. $1\text{--}5 \mu\text{M}$) inhibirala apoptozo celic MCF10A. Ugotovljeno je bilo, da je razmerje med izražanjem *BAX/BCL-2* indikator notranje poti apoptoze (Green in Evan, 2002; Danial in Korsmeyer, 2004). Razmerje med izražanjem *BAX* in *BCL-2* se je pri testiranih HAA od doze odvisno zniževalo in bilo pri večini testiranih koncentracijah manjše od 1, kar kaže na zaviranje notranje poti apoptoze. Z izpostavitvijo celic HepG2 EPM smo dobili nasprotajoče rezultate. EPM iz skorje prašičjega in piščančjega mesa nista povzročila sprememb v izražanju *BAX* in *BCL-2*, medtem ko je EPM iz skorje govejega mesa statistično značilno povečal izražanje *BAX* in zmanjšal izražanje *BCL-2* ter povečal njuno razmerje v prid apoptoze. Zanimivo je, da sta PhIP in MeIQx v koncentracijah, ki smo jih izmerili v EPM, ter njuna kombinacija zmanjšali izražanje *BCL-2* v izpostavljenih celicah HepG2, na izražanje *BAX* pa nista vplivala. V kombinacijah s 4,8-DiMeIQx sta oba povečala izražanje *BCL-2* ob nespremenjenem izražanju *BAX*. Kombinacija vseh treh HAA v koncentracijah, ki so bile izmerjene v EPM piščanca, je za več kot 2-krat povečala izražanje *BCL-2*. To nakazuje, da so bile v EPM govedine neidentificirane snovi, ki lahko vplivajo na mehanizem programirane celične smrti.

Po 24 h izpostavitvi celic HepG2 HAA, EPM iz skorje piščančjega mesa in kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih izmerili v EPM piščanca, nismo zaznali povečanega števila zgodnje apoptotskih celic. Večja prepustnost zunanje mitohondrijske membrane naj bi bil tudi zgodnji znak notranje poti apoptoze (Danial in Korsmeyer, 2004). EPM piščanca in kombinacije HAA v koncentracijah, ki smo jih izmerili v njem, niso povzročili sprememb v potencialu zunanje mitohondrijske membrane 24 h izpostavljenih celic HepG2. Posamezni HAA pa so povzročili hiperpolarizacijo zunanje mitohondrijske membrane celic HepG2. Odkrili so, da je hiperpolarizacija lahko zgodnji znak različnih apoptotskih poti (Nagy in sod., 2007), vendar pa je proces reverzibilen in naj ne bi bil povezan izključno z apoptozo (Perl in sod., 2004). Liang in sod. (1999) trdijo, da naj bi bila hiperpolarizacija zunanje mitohondrijske membrane povezana z inhibicijo apoptoze pri humanih astrocitih.

Hiperpolarizacija zunanje mitohondrijske membrane preprečuje uhajanje kalcijevih kationov v citosol, s tem pa omogoči homeostazo kalcija v celici in prepreči od kalcija odvisno apoptozo. Povišana koncentracija kalcijevih kationov v citosolu aktivira kalpaine. Gre za družino cisteinskih proteaz, ki povzročajo celično smrt s cepitvijo proteinov citoskeleta (Ding in sod., 2002; Mathiasen in Jäättelä, 2002; Iijima, 2006).

Aktivirana kaspazna kaskada ima dominantno vlogo v procesu apoptoze (Hanahan in Weinberg, 2000; Hengartner, 2000). Pri notranji poti apoptoze pride, po destabilizaciji zunanje mitohondrijske membrane, povzročene z BAX, do sproščanja apoptogenih proteinov iz mitohondrijskega medmembranskega prostora. To so citokrom c, apoptozo-inducirajoči faktorji, ki zavirajo inhibitorje kaspaz, ter nekatere prokaspaze. Citokrom c se veže na Apaf-1. Nastali kompleks pa na prokaspaze, ki se pri tem aktivirajo. Med njimi je efektorska kaspaza 9, ki nadalje aktivira kaspazi 3 in 7. Kaspaze so cisteinske proteaze, ki cepijo številne proteine, kar vodi v za apoptozo značilne biokemijske in morfološke spremembe celic (Green in Evan, 2002; Orrenius, 2004). V celicah HepG2 izpostavljenim HAA in EPM piščanca smo določali izražanje genov, ki kodirata kaspazo 3 in 7. Izražanje *CASP3* in *CASP7* ni bilo spremenjeno. MeIQx in IQ sta celo nekoliko zmanjšala izražanje genov, ki kodirata obe kaspazi. V celicah HepG2 izpostavljenim posameznim HAA tudi nismo določili nobene aktivnosti omenjenih kaspaz. Aktivnost kaspaz je bila v celicah izpostavljenim različnim kombinacijam HAA v koncentracijah, ki smo jih izmerili v EPM piščanca, v primerjavi s kontrolno skupino celic zmanjšana. Aktivnost kaspaze 3 niso opazili tudi v celicah humanega hepatoma HepaRG, ki so bile izpostavljene PhIP in MeIQx v koncentracijah nižjih od 250 µM (Dumont in sod., 2010a). Nasprotno pa je le EPM iz skorje piščančjega mesa povečal aktivnost kaspaz 3 in 7. Vzrok za to lahko iščemo v sinergizmu vseh HAA v ekstraktu (zaznanih in nezaznanih). Kljub temu se število pozno apoptotskih in nekrotičnih celic, ki smo jih določili s pomočjo pretočne citometrije, po izpostavitvi EPM iz skorje piščančjega mesa ni povečalo. Prav tako posamezni HAA in njihove kombinacije niso vplivale na povečanje števila pozno apoptotskih in nekrotičnih celic HepG2. Hashimoto in sod. (2001) so odkrili, da Trp-P-1 povzroča morfološke spremembe značilne za apoptozo v podganjih monocitih že pri 1 nM koncentraciji. Trp-P-1 je aminokarbolin oz. pirolizni HAA in v normalnih razmerah priprave mesa redko nastaja. V

izpostavljenih podganjih hepatocitih Trp-P-1 povzroči morfološke spremembe značilne za apoptozo, medtem ko jih aminoimidazoazarena, kot sta PhIP in IQ ne, kljub temu, da so vsi trije HAA močni mutageni tako v *in vitro* kot v *in vivo* modelih (Ashida in sod., 1998). Ugotovili so, da metabolno aktiviran Trp-1-P (*N*-hidroksi-Trp-1-P) ne povzroča morfoloških sprememb značilnih za apoptozo v izpostavljenih primarnih podganjih hepatocitih (Shiotani in sod., 2001). Trp-1-P naj ne bi potreboval metabolne aktivacije za sprožitev apoptoze. Zanjo naj bi bile odgovorne reaktivne kisikove zvrsti, ki jih tvori Trp-1-P. Le-te pa aktivirajo iniciatorsko kaspazo 8 ter posledično efektorske kaspaze 3, 6 in 7 (Hashimoto in sod., 2001).

Z metodami, ki smo jih uporabili za ugotavljanje mehanizmov programirane celične smrti ne moremo neposredno ugotoviti ali HAA povzročajo apoptozo v celicah HepG2. Glede na dobljene rezultate pa lahko sklepamo, da HAA zavirajo notranjo (intrinzično) pot apoptoze v celicah HepG2.

5.2 SKLEPI

Na osnovi dobljenih rezultatov sklepamo, da se HAA v celicah HepG2 presnavljajo in povzročajo prelome DNA, vplivajo na celični cikel in zavirajo apoptozo. Poškodbe DNA in spremembe v delovanju mehanizmov celične rasti oz. smrti povečajo tveganje za zdravje ljudi ter lahko vodijo v nastanek oz. razvoj raka. V naslednjih točkah so povzete glavne ugotovitve:

- Največjo vsebnost HAA smo določili v EPM iz piščančjega, nato iz prašičjega in govejega mesa. Največjo koncentracijo v EPM iz piščančjega in prašičjega mesa je imel MeIQx, nato PhIP in 4,8-DiMeIQx, v EPM iz govejega mesa pa PhIP, nato MeIQx in 4,8-DiMeIQx.

- Potrdili smo hipotezo, da je mutagena aktivnost EPM v primerjavi s posameznimi HAA v bakterijskem testnem sistemu s *S. typhimurium* različna:
 - Največji mutageni potencial smo določili 4,8-DiMeIQx, nato IQ, MeIQx in PhIP, kar je posledica razlik v kemijski strukturi. Med EPM je bil najbolj mutagen EPM iz piščančjega in prašičjega ter najmanj iz govejega mesa.
 - Mutagena aktivnost EPM je odvisna od vsebnosti HAA v njem.
 - Mutagena aktivnost EPM je manjša od posameznih HAA, kar je najverjetneje posledica antagonistčnih reakcij med HAA v ekstraktu.
- Deloma smo potrdili hipotezo, da HAA in EPM v izpostavljenih celicah HepG2 povzročijo prelome DNA in nastanek mikrojeder:
 - V celicah HepG2 so vsi HAA, razen 4,8-DiMeIQx, povzročili verižne prelome DNA. Dvojerižne prelome DNA, določene indirektno preko fosforiliranih histonov H2AX, so povzročili PhIP ter v manjši meri IQ in 4,8-DiMeIQx. HAA v celicah niso povzročili kromosomskih preureditev. EPM v celicah HepG2 niso povzročili verižnih prelomov DNA, razen EPM piščanca je povzročil nastanek mikrojeder.
- Potrdili smo hipotezo, da HAA in EPM v celicah HepG2 povzročijo spremembe izražanja genov, ki so vpleteni v metabolizem HAA:
 - HAA in EPM v celicah HepG2 inducirajo izražanje metabolnih genov I. in II. stopnje metaboliza: *CYP1A1*, *CYP1A2* in *UGT1A1*, zmanjšajo pa izražanje *GSTA1*. Izražanje *CYP1A1* v celicah HepG2 je najbolj povečal 4,8-DiMeIQx, nato MeIQx in IQ, najmanj pa PhIP. Izražanje *CYP1A2* pa je bilo najbolj povečano pod vplivom IQ, nato 4,8-DiMeIQx, MeIQx ter PhIP. Izražanje *UGT1A1* je koreliralo z izražanjem *CYP1A1* in *CYP1A2*. Stopnja izražanja genov *CYP1A1*, *CYP1A2* in *UGT1A1*, ki so jo povzročili EPM je primerljiva z

izražanjem, ki so ga povzročili posamezni HAA, kar nakazuje na sinergistični učinek zmesi HAA. Ugotovili smo, da pri kombinacijah HAA s 4,8-DiMeIQx pride od sinergističnega učinka na izražanje genov, ki kodirata CYP1A1 in CYP1A2.

- Potrdili smo hipotezi, da HAA in EPM v celicah HepG2 povzročijo spremembe izražanja genov, ki se odzovejo na poškodbe DNA, in vplivajo na celični cikel HepG2 celic:
 - HAA niso vplivali na izražanje gena *P53*. Pod vplivom HAA se je pa povečala količina proteina P53 v izpostavljenih celicah. Izražanje *MDM2* je negativno koreliralo z izražanjem *P53* v celicah HepG2 izpostavljenim HAA, kar je skladno z njegovo funkcijo, saj MDM2 skupaj s P53 tvori negativno povratno zanko.
 - HAA so v celicah HepG2 povečali izražanje *CDKN1A*, najbolj 4,8-DiMeIQx, nato MeIQx in IQ ter najmanj PhIP. Povečano izražanje *CDKN1A* so povzročili tudi EPM iz prašičjega in piščančjega mesa ter kombinacije HAA, kar nakazuje na sinergistični učinek večih HAA na izražanje *CDKN1A*. Izražanje *CDKN1A* je koreliralo z izražanjem *CYP1A1*, kar dokazuje genotoksični stres v celicah HepG2 povzročen s HAA in EPM. Določili smo tudi povečano izražanje CDKN1A na proteinском nivoju, kar pomeni, da je bil P53 v celicah HepG2 transkripcijsko aktiven in je reguliral izražanje *CDKN1A*.
 - Povečano izražanje *CDKN1A* in *GADD45α* v izpostavljenih celicah HepG2 potrjuje, da so HAA povzročili poškodbe DNA, na katere so se celice odzvale z zaustavitvijo celičnega cikla.
 - PhIP, IQ in EPM piščanca povzročijo zaustavitev celičnega cikla celic HepG2 v S fazici, 4,8-DiMeIQx in MeIQx pa v G₀/G₁ fazici.

- Pri vseh testiranih HAA je po 36 h opazen trend zmanjševanja vpliva na celični cikel celic HepG2, ki je pri PhIP povsem izginil. To nakazuje bodisi na uspešno popravljanje poškodb DNA bodisi na zaviranje apoptoze.
- Deloma smo potrdili hipotezo, da HAA in EPM povzročijo spremembe izražanja genov, ki so vpleteni v procese apoptoze:
- HAA niso povečali izražanja BAX v celicah HepG2 tako na transkripcijskem kot tudi na proteinskem nivoju. Nasprotno pa so HAA povečali izražanje BCL-2. Razmerje med izražanjem *BAX* in *BCL-2* je bilo pri testiranih HAA manjše od 1, kar kaže na zaviranje notranje (intrinzične) poti apoptoze. EPM iz prasičjega in piščančjega mesa nista povzročila sprememb v izražanju *BAX* in *BCL-2*, medtem ko je EPM iz govejega mesa povečal izražanje *BAX* in zmanjšal izražanje *BCL-2*. Kombinacija vseh treh HAA v koncentracijah, ki smo jih izmerili v EPM iz skorje piščančjega mesa, je za več kot 2-krat povečala izražanje *BCL-2*.
 - HAA in EPM niso povzročili sprememb v izražanju *CASP3* in *CASP7* v celicah HepG2
- Ovrgli smo hipotezo, da HAA in EPM povzročajo apoptozo celic HepG2:
- HAA v HepG2 celicah niso vplivali na aktivnost CASP3/7. EPM piščanca je povečal aktivnost CASP3/7, na katero najverjetneje vpliva sinergizem vseh HAA v ekstraktu (detektiranih in nedetektiranih).
 - Depolarizacija zunanje mitohondrijske membrane, permeabilizacije plazmaleme in povečana aktivnost CASP3/7 so zgodnji znaki apoptoze. Po izpostavitvi celic HepG2 HAA in EPM piščanca nismo zaznali povečanega števila zgodnje in pozno apoptotskih ter nekrotičnih celic. Prav tako EPM piščanca in različne kombinacije HAA niso vplivali na membranski potencial

zunanje mitohondrijske membrane. Posamezni HAA so v izpostavljenih celicah HepG2 povzročili hiperpolarizacijo zunanje mitohondrijske membrane.

- Dobljeni rezultati potrjujejo hipotezo, da izpostavljenost celic HepG2 EPM povzroči drugačen celični odziv kot izpostavljenost posameznim HAA.

Celice HepG2 so se izkazale kot primeren celični model za študij mehanizmov delovanja HAA na celične procese. HAA se v celicah HepG2 presnavljajo in povzročajo prelome DNA, vplivajo na celični cikel in zavirajo notranjo (intrinzično) pot apoptoze. Zaustavitev celičnega cikla omogoča celicam popravljanje poškodovane DNA. V primeru, da so poškodbe DNA preobsežne oz. jih celice niso sposobne popraviti, se aktivirajo mehanizmi programirane celične smrti – apoptoze. Zaviranje procesov apoptoze lahko povzroči, da celice s poškodovano DNA nadaljujejo z delitvijo, kar privede do fiksacij mutacij. Mutacije so predpogoji, ki skupaj z odsotnostjo mehanizmov apoptoze, vodijo v nastanek rakavih obolenj. Znano je, da genotoksične snovi nimajo praga delovanja. Kronična izpostavljenost majhnim koncentracijam HAA privede do kopičenja mutacij. Zmesi HAA, ki se tvorijo pri pečenju mesa in katerim smo ljudje dejansko izpostavljeni, predstavljajo nevarnost za zdravje ljudi. Na rakotvorni potencial zmesi HAA, kljub majhni vsebnosti HAA v njih in relativno majhni mutagenosti, vendar sinergističnemu učinku na izražanje genov, ni možno sklepati zgolj na osnovi mutagenosti posameznega HAA, ker lahko tako precenjujemo ali podcenjujemo tveganje pri izpostavljenosti zmesi HAA v pečenem mesu. Poškodbe DNA, ki jih povzročajo HAA, njihov vpliv na celični cikel in na procese programirane celične smrti so verjetni mehanizmi rakotvornega delovanja HAA. Naši rezultati poudarjajo potrebo po nadaljnjih raziskavah potencialnih dolgodobnih posledic izpostavljenosti HAA in njihovim zmesem, ki nastajajo pri pečenju mesa.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Sodoben način življenja ogroža zdravje ljudi. Število umrlih za posledicami raka iz leta v leto narašča. Rakava obolenja so v veliki meri tudi posledica prehrane. Epidemiološke raziskave kažejo na povezavo med prekomernim uživanjem pečenega mesa in nastankom tumorjev v različnih tkivih oz. organih, predvsem v prebavilih. Pri pečenju mesa nastajajo številne snovi, ki so genotoksične in potenciano rakotvorne. Mednje spadajo heterociklični aromatski amini (HAA), ki so znani mutageni v *in vitro* bakterijskih in sesalskih celičnih testnih sistemih ter tudi v *in vivo* poskusih na laboratorijskih živalih. HAA so prokarcinogeni, ki za svoje delovanje potrebujejo aktivacijo z metabolnimi encimi. Bioaktivacijo HAA katalizirajo encimi I. stopnje metabolizma iz družine citokrom P450 in II. stopnje metabolizma – acetiltransferaze in sulfotransferaze. Nastanejo reaktivni metaboliti (*N*-hidroksi- ali *N*-acetoksi-HAA ter sulfatni in sulfoniloksi estri), ki se vežejo na DNA in tvorijo DNA adukte. Slednji povzročajo mutacije, kot so delecije in premik bralnega okvirja ali zamenjava baznih parov med podvojevanjem oz. popravljanjem poškodb DNA.

V doktorskem delu smo določali mehanizme toksičnega in genotoksičnega ter potencialno rakotvornega delovanja štirih HAA in njihovih kombinacij ter ekstraktov pečenega mesa (EPM): 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP), 2-amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]kinoksalina (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalina (MeIQx) in 2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-f]kinolina (IQ) ter EPM, ki smo jih pripravili iz govejega, prašičjega in piščančjega mesa ter v njih določili vsebnost posameznih HAA. Vpliv HAA in EPM na molekularne procese nastanka in razvoja raka smo ugotavljali s pomočjo bakterij *Salmonella typhimurium* (Ames test) in celičnega modela človeškega hepatoma HepG2.

Količino HAA v ekstraktih iz skorje in sredice pečenega mesa smo določali s pomočjo tekočinske kromatografije sklopljene z masnim spektrometrom (LC/MS). Največjo vsebnost HAA smo izmerili v EPM iz skorje piščančjega (140,24 µg/ml), nato v EPM iz

skorje prašičjega (82,54 µg/ml) najmanjšo pa v EPM iz skorje govejega (51,61 µg/ml) mesa. V EPM iz skorij smo določili tri HAA: MeIQx (največji delež izmed HAA v EPM iz piščančjega in prašičjega mesa), PhIP (največji delež izmed HAA v EPM iz govejega mesa), najmanj pa je bilo 4,8-DiMeIQx. V EPM iz sredic mesa HAA nismo zasledili.

Mutagenost posameznih HAA in EPM smo preverili z bakterijskem testom povratnih mutacij (Ames test) s sevom *S. typhimurium* TA98, s katerim zaznavamo premike bralnega okvirja. Največji mutageni potencial je imel 4,8-DiMeIQx, nato IQ, MeIQx in PhIP, kar je posledica razlik v kemijski strukturi. Med EPM pa je bil najbolj mutagen EPM iz piščančjega in prašičjega ter najmanj EPM iz govejega mesa. Izkazalo se je, da je mutagena aktivnost EPM manjša od pričakovane na osnovi mutagenosti posameznih HAA. Najverjetnejši razlog za ugotovljene razlike v mutagenem potencialu posameznih HAA in EPM izmerjenih s pomočjo Ames testa so antagonistične reakcije med posameznimi HAA v EPM, tako zaznanih kot nezaznanih (pod mejo detekcije) HAA. V primerjavi z bakterijami, genotoksičnost HAA in EPM v celicah HepG2 ni bila tako izrazita. S testom komet smo določali nastanek eno- in dvooverižnih prelomov DNA. Dvooverižne prelome DNA smo določali indirektno z merjenjem fosforiliranih histonov H2AX s pretočno citometrijo. S testom mikrojeder pa kromosomske preuređivite (nastanek mikrojeder, jedrnih brstov in nukleoplazmatskih mostičkov). Po 24 h izpostavitve celic smo zaznali povečanje poškodb DNA pri vseh testiranih HAA, razen v celicah izpostavljenim 4,8-DiMeIQx. PhIP v celicah HepG2 povzroča dvooverižne prelome DNA, v manjši meri tudi IQ in 4,8-DiMeIQx, medtem ko jih MeIQx ne. EPM niso povzročili verižnih prelomov DNA merjenih s testom komet. Le EPM piščanca je povzročil nastanek mikrojeder, medtem ko jih v celicah izpostavljenim posameznim HAA nismo zaznali. Ugotovili smo, da o genotoksičnem potencialu zmesi HAA, katerim smo izpostavljeni pri uživanju pečenega mesa, ni možno sklepati zgolj na osnovi genotoksičnega potenciala posameznega HAA.

Z metodo qRT-PCR in prenosa po Westernu smo spremljali izražanje genov, ki kodirajo encime vpletene v metabolizem HAA, in genov, ki se odzovejo na poškodbe DNA. HAA in EPM ter kombinacije HAA, ki se pojavljajo v EPM, v celicah HepG2 inducirajo izražanje metabolnih genov I., kot sta *CYP1A1* in *CYP1A2* ter II. stopnje

metabolizma kot sta *UGT1A1* in *GSTA1*, čigar izražanje pa je bilo zmanjšano. Spremembe v izražaju genov, ki kodirajo *NAT2* in *SULT1A1* nismo zaznali. Največje izražanje citokromov P450 so v celicah HepG2 povzročili imidazokinoksalina (4,8-DiMeIQx in MeIQx) in IQ, najmanjše pa PhIP. Stopnja izražanja metabolnih genov, ki so jo povzročili EPM in kombinacija treh HAA je primerljiva z izražanjem, ki so ga povzročili posamezni HAA, kar nakazuje na sinergistični učinek zmesi HAA. V kombinacijah HAA kjer je bil prisoten 4,8-DiMeIQx je le-ta povzročil aditiven oz. sinergističen učinek izražanja *CYP1A1* in *CYP1A2*. Izražanje *P53*, *CDKN1A* in *GADD45α*, ki se odzovejo na poškodbe DNA, je bilo v izpostavljenih celicah HepG2 tako na transkripcijskem kot tudi na proteinskem nivoju povečano. Hkrati smo opazili, z uporabo pretočne citometrije, da HAA in EPM piščanca povzročijo zaustavitev celičnega cikla po 24 h izpostavitvi celic. Po 36 h pa se njihov vpliv na celični cikel zmanjša. Izražanje izbranih genov potrjuje, da se HAA v celicah HepG2 presnavljajo in povzročajo poškodbe DNA, na katere so se celice odzvale z zaustavitvijo celičnega cikla in aktivacijo popravljalnih mehanizmov DNA. Malo zaznanih poškodb DNA je tako najverjetnejše posledica detoksifikacije HAA in poprave poškodb DNA v celicah.

Vpliv HAA in njihovih kombinacij ter EPM piščanca na procese programirane celične smrti smo ugotavljali z merjenjem sprememb v izražanju genov vpletenih v apoptozo (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3* in *CASP7*). Izražanje *CASP3* in *CASP7* v celicah izpostavljenim HAA, njihovim kombinacijam in EPM ni bilo spremenjeno. Prav tako je bila aktivnost omenjenih efektorskih kspaz povečana le pri celicah izpostavljenim EPM iz skorje piščančjega mesa, medtem ko pri izpostavitvi celic kombinaciji treh HAA pripravljenih v koncentracijah, ki smo jih izmerili v EPM piščanca, do povečanja kspazne aktivnosti ni prišlo. Na kspazno aktivnost celic izpostavljenih EPM iz skorje piščančjega mesa najverjetnejše vpliva sinergizem vseh HAA v ekstraktu, zaznanih in nezaznanih. Z merjenjem sprememb v prepustnosti zunanje mitohondrijske membrane in izgube asimetrije plazmaleme, ki sta zgodnja znaka sprožitve apoptotskih poti, smo ugotovili, da noben izmed testiranih HAA, njihovih kombinacij in EPM piščanca, ni povzročil sprememb v plazmalemi, posamezni HAA pa so povzročili hiperpolarizacijo zunanje mitohondrijske membrane. Prav tako HAA in EPM niso povečali izražanja pro-apoptoskega *BAX* v celicah HepG2 tako na transkripcijskem kot tudi na proteinskem

nivoju. Nasprotno pa so HAA in EPM povečali izražanje anti-apoptotskega BCL-2. Razmerje med izražanjem BAX in BCL-2 se uporablja kot indikator notranje (intrinzične) poti apoptoze. Izkazalo se je, da je to razmerje v celicah izpostavljenim HAA in njihovim kombinacijam ter EPM v povprečju manjše od 1, kar nakazuje na zaviranje apoptoze. Na osnovi dobljenih rezultatov sklepamo, da HAA zavirajo notranjo pot apoptoze. Poškodbe DNA, ki jih povzročajo HAA, njihov vpliv na celični cikel in na procese programirane celične smrti so verjetni mehanizmi rakotvornega delovanja HAA.

6.2 SUMMARY

The modern way of life threatens the human health. The number of deaths caused by cancer is increasing year after year. The development of cancer is in many cases influenced by the diet. Epidemiological studies have suggested a link between excessive intake of well-done meat and tumour formation in different tissues and organs, especially in the digestive system. During the cooking of meat numerous of substances form some of them with genotoxic and carcinogenic potential. Among them are heterocyclic aromatic amines (HAA), which are known mutagens in *in vitro* bacterial and mammalian cell test systems, as well as in *in vivo* experiments on laboratory animals. HAA are procarcinogens that require activation by metabolic enzymes. Bioactivation of HAA is catalyzed by enzymes of the I. phase of the metabolism such as the family of cytochrome P450 1A and II. phase of metabolism – acetyltransferases and sulfotransferases. Activation of HAA compounds results in reactive metabolites (*N*-hydroxy- or *N*-acetoxy-HAA and sulfate and sulfonyloxy esters) that bind to DNA forming DNA adducts. These cause mutations such as frameshift mutations or base-pair substitutions during the replication or repairing of DNA damage.

In the doctoral dissertation we determined the mechanisms of toxic and potentially genotoxic and carcinogenic activity of four HAA, their combinations and extracts of grilled meat (GME): 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,8-

dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and GME, which were prepared from beef, pork and chicken and analyzed for the content of HAA. The impact of HAA and GME on the molecular processes in cancer development was determined using *Salmonella typhimurium* (Ames test) and human hepatoma cells (HepG2).

The amount of HAA in the extracts from the crust and core of the grilled meat was determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). The highest concentration of HAA was measured in the chicken GME (140.24 µg/ml), followed by pork GME (82.54 µg/ml), while the lowest concentration was detected in beef GME (51.61 µg/ml). In the GME only three HAA were determined: MeIQx had the largest portion of the HAA in chicken and pork GME, while PhIP had the largest portion of the HAA in beef GME. The least of all had 4,8-DiMeIQx.

Mutagenicity of individual HAA and GME was tested using the bacterial reverse mutation assay (Ames test) with strain TA98 *S. typhimurium* that is used for assessment of frameshift mutations. The highest mutagenic potential had 4,8-DiMeIQx, then IQ, MeIQx and PhIP, due to differences in their chemical structure. Among GME chicken and pork were the most mutagenic and beef the least. It turned out that the mutagenic activity of GME was lower than expected on the basis of individual HAA mutagenicity. Most likely the observed differences in the mutagenic potential of individual HAA and GME measured by the Ames test were due to antagonistic reactions between different HAAs in the GME. Compared to bacteria, genotoxicity of HAA and GME in HepG2 cells was not so pronounced. The formation of DNA single- and double-strand breaks was determined using the comet assay. With H2AX foci analysis (analysis of phosphorylated histone H2AX by flow cytometry) formation of DNA double-strand breaks was determined and with micronucleus assay chromosomal aberrations (formation of micronuclei, nuclear buds and nucleoplasmic bridges) induced by HAA were investigated. Increase in DNA damage in HepG2 cells was observed after 24 h of exposure for all tested HAA, except in the cells exposed to 4,8-DiMeIQx. PhIP in HepG2 cells caused DNA double-strand breaks and to a lesser extent IQ and 4,8-DiMeIQx, while MeIQx did not induce formation of DNA double-strand breaks. GME

did not cause DNA strand breaks. Only chicken GME gave a rise to number of micronuclei, whereas in cells exposed to individual HAA no chromosomal aberrations were detected. We found out that the genotoxic potential of HAA mixtures in grilled meat that people are exposed to cannot be determined solely on the basis of genotoxic potential of individual HAA.

Using the qRT-PCR and Western blotting methods we monitored the expression of genes which encode enzymes involved in the metabolism of HAA and genes that respond to DNA damage. Separate HAA, GME and combinations of HAA occurring in the GME induced the expression of genes encoding enzymes of I. phase of metabolism, such as *CYP1A1* and *CYP1A2*, and II. phase of metabolism, such as *UGT1A1* and *GSTA1*, whose expression was reduced. Changes in expression of genes encoding *NAT2* and *SULT1A1* were not detected. The highest expression rate of cytochrome P450 in HepG2 cells was caused by imidazoquinoxalines (4,8-DiMeIQx and MeIQx) and IQ. Level of expression of metabolic genes induced by GME and combination of three HAA is comparable to the expression induced by each individual HAA, suggesting a synergistic effect of the mixtures of HAA. In combinations of HAA where 4,8-DiMeIQx was present we observed an additive or synergistic effect on expression of *CYP1A1* and *CYP1A2*. Expressions of *P53*, *CDKN1A* and *GADD45α*, which respond to DNA damage, increased in exposed HepG2 cells both at the transcriptional and at the protein level. Flow cytometry results showed that HAA in chicken GME cause cell-cycle arrest 24 h after cells exposure. After 36 h their effects on the cell-cycle decreased. The expression of selected genes confirms that the HAA are metabolised in HepG2 cells and cause DNA damage to which the cells respond by stopping the cell-cycle and possibly activate DNA repair mechanisms. Small amount of detected DNA damage is likely to be due to detoxification of HAA and DNA repair in cells.

Impact of HAA, their combinations and chicken GME on processes of programmed cell death was assessed by measuring changes in the expression of genes involved in apoptosis (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3* and *CASP7*). Gene expressions of *CASP3* and *CASP7* in cells exposed to HAA, their combination or GME had not been changed. Furthermore caspase activity was increased only in cells exposed to chicken GME, while in cells

exposed to a combination of three HAA prepared in concentrations as measured in the chicken GME, the increase in caspase activity did not occur. The caspase activity in cells exposed to chicken GME was most likely affected by the synergism of HAA in the extract – the detected and undetected HAA. By measuring changes in the permeability of outer mitochondrial membrane and the loss of plasma membrane asymmetry, which are early signs of activated apoptotic pathway, we found that none of the tested HAA, their combinations or chicken GME caused changes in the plasma membrane and that each of HAA caused hyperpolarization of the mitochondrial outer membrane. HAA and GME also did not increase expression of pro-apoptotic gene *BAX* in HepG2 cells, not at the transcriptional or protein level. In contrast, the HAA and GME increased expression of anti-apoptotic *BCL-2*. The ratio between the expression of *BAX* and *BCL-2* is used as an indicator of the intrinsic apoptotic pathway. It has been shown that this ratio in the cells exposed to HAA, their combinations and GME was on average less than 1, which is a sign of apoptosis suppression. Based on the results obtained we suggest that HAA inhibit the intrinsic apoptotic pathway. DNA damage caused by the HAA, their effect on the cell-cycle and mechanisms of programmed cell death are probable mechanisms of their carcinogenic activity.

7 VIRI

- Abdelrahim M., Smith R., Safe S. 2003. Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. *Molecular Pharmacology*, 63, 6: 1373-1381
- Abdulkarim B.G., Smith J.S. 1998. Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 11: 4680-4687
- Abraham M.C., Shaham S. 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biology*, 14, 4: 184-193
- Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B.B. 1979. Controlled synthesis of Hbsag in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282, 5739: 615-616
- Aeschbacher H.-U., Turesky R.J. 1991. Mammalian cell mutagenicity and metabolism of heterocyclic aromatic amines. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259: 235-250
- Agents classified by the *IARC monographs*, volumen 1-107. 2012. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (10. apr. 2013)
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (25. apr. 2013)
- Airoldi L., Magagnotti C., Pastorelli R., Fanelli R. 2004. Enzyme polymorphisms influencing the metabolism of heterocyclic aromatic amines. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 175-181
- Alaejos M.S., Pino V., Afonso A.M. 2008. Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: Influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. A review. *Food Research International*, 41, 4: 327-340
- Alexander J., Wallin H., Rossland O.J., Solberg K.E., Holme J.A., Becher G., Andersson R., Grivas S. 1991. Formation of a glutathione conjugate and a semistable transportable glucuronide conjugate of N2-oxidized species of 2-amino-1-methyl-6phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in rat liver. *Carcinogenesis*, 12, 12: 2239-2245
- Amundson S.A., Myers T.G., Fornace A.J. Jr. 1998. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene*, 17, 25: 3287-3299
- Anand P., Kunnumakara A.K., Sundaram C., Harikumar K.B., Tharakan S.T., Lai O.S., Sung B., Aggarwal B.B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25, 9: 2097-2116
- Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J.C. 2000. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochemical Journal*, 15: 271-278
- Arnoldi A., Arnoldi C., Baldi O., Ghizzoni C. 1990. Effects of lipids in the Maillard reaction. The Maillard Reaction. Advances in Life Science. P. A. Finot, H. U. Aeschbacher, R. F. Hurrell and R. Liardon. Basel, Birkhäuser Verlag: 133-138.
- Arvidsson P., Van Boekel M.A.J.S., Skog K., Jägerstad M. 1997. Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *Journal of Food Science*, 62, 5: 911-916
- Ashida H., Shiotani B., Adachi H., Hashimoto T., Kanazawa K., Danno G. 1998. Tryptophan pyrolysis products, Trp-P-1 and Trp-P-2 induce apoptosis in primary cultured rat hepatocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 11: 2283-2287
- Audebert M., Zeman F., Beaudoin R., Perry A., Cravedi J.P. 2012. Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 260, 1: 58-64
- Barrington P.J., Baker R.S.U., Truswell A.S., Bonin A.M., Ryan A.J., Paulin A.P. 1990. Mutagenicity of basic fractions derived from lamb and beef cooked by common household methods. *Food and Chemical Toxicology*, 28, 3: 141-146
- Bendaly J., Zhao S., Neale J.R., Metry K.J., Doll M.A., States J.C., Pierce W.M., Hein D.W. 2007. 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline-induced DNA adduct formation and mutagenesis

- in DNA repair-deficient chinese hamster ovary cells expressing human cytochrome P4501A1 and rapid or slow acetylator N-acetyltransferase 2. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16, 7: 1503-1509
- Bendaly J., Metry K.J., Doll M.A., Jiang G., States J.C., Smith N.B., Neale J.R., Holloman J. L., Pierce W.M., Hein D.W. 2009. Role of human CYP1A1 and NAT2 in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mutagenicity and DNA adducts. *Xenobiotica*, 39, 5: 399-406
- Benigni R., Bossa C. 2011. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. *Chemical Reviews*, 111, 4: 2507-2536
- Berg I., Övervik E., Gustafsson J.Å. 1990. Effect of cooking time on mutagen formation in smoke, crust and pan residue from pan-broiled pork. *Food and Chemical Toxicology*, 28, 6: 421-426
- Bergman K. 1985. Autoradiographic distribution of ¹⁴C-labeled 3H-imidazo[4,5-f]quinoline-2-amines in mice. *Cancer Research*, 45, 3: 1351-1356
- Bolognani F., Rumney C.J. in Rowland I.R. 1997. Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 6: 535-545
- Boobis A.R., Lynch A.M., Murray S., de la Torre R., Solans A., Farré M., Segura J., Gooderham N.J., Davies D.S. 1994. CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens their major route of metabolism in humans. *Cancer Research*, 54, 1: 89-94
- Breneman J.W., Briner J.F., Ramsey M.J., Director A., Tucker J.D. 1996. Cytogenetic results from a chronic feeding study of MeIQx in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 8: 717-724
- Bressac B., Galvin K.M., Liang T.J., Isselbacher K.J., Wands J.R., Ozturk M. 1990. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular-carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 5: 1973-1977
- Brittebo E.B., Karlsson A.Å., Skog K.I., Jägerstad I.M. 1994. Transfer of the food mutagen PhIP to foetuses and newborn mice following maternal exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 8: 717-726
- Broyde S., Wang L., Zhang L., Rechkoblit O., Geacintov N.E., Patel D.J. 2007. DNA adduct structure-function relationships: Comparing solution with polymerase structures. *Chemical research in toxicology*, 21, 1: 45-52
- Buonarati M.H., Tucker J.D., Minkler J.L., Wu R.W., Thompson L.H., Felton J.S. 1991. Metabolic activation and cytogenetic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP) in Chinese hamster ovary cells expressing murine cytochrome P450 IA2. *Mutagenesis*, 6, 4: 253-259
- Butler L.M., Duguay Y., Millikan R.C., Sinha R., Gagné J.-F., Sandler R.S., Guillemette C. 2005. Joint effects between UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 genotype and dietary carcinogen exposure on risk of colon cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14, 7: 1626-1632
- Cazzalini O., Scovassi A.I., Savio M., Stivala L.A., Prosperi E. 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704, 1-3: 12-20
- Chen C., Pearson A.M., Gray J.I. 1992. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43, 3: 177-183
- Cheng K.W., Chen F., Wang M. 2006. Heterocyclic amines: chemistry and health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 12: 1150-1170
- Choi J.-Y., Stover J.S., Angel K.C., Chowdhury G., Rizzo C.J., Guengerich F.P. 2006. Biochemical basis of genotoxicity of heterocyclic arylamine food mutagens: Human DNA polymerase η selectively produces a two-base deletion in copying the N2-guanyl adduct of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-

- f]quinoline but not the C8 adduct at the Narl G3 site. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 35: 25297-25306
- Coles B., Ketterer B., Hinson J.A. 1990. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 1: 47-70
- Coles B., Nowell S.A., MacLeod S.L., Sweeney C., Lang N.P., Kadlubar F.F. 2001. The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482, 1-2: 3-10
- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375, 2: 183-193
- Constable A., Varga N., Josephy P.D., Guy P., Turesky R. J. 1999. Evaluation of Escherichia coli DJ4309 expressing human P450 1A2 in mutagenicity testing of complex food mixtures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 442, 2: 79-87
- Cooper G.M., Hausman R.E. 2009. The cell: a molecular approach. Washington D.C., Sinauer Associates, Inc.: 765 str.
- Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. 1993. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical and biophysical research communications*, 197, 1: 40-45
- Costa S., Pinto D., Morais A., Vasconcelos A., Oliveira J., Lopes C., Medeiros R. 2005. Acetylation genotype and the genetic susceptibility to prostate cancer in a southern European population. *The Prostate*, 64, 3: 246-252
- Creton S., Zhu H., Gooderham N.J. 2005. A mechanistic basis for the role of cycle arrest in the genetic toxicology of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Toxicological Sciences*, 84, 2: 335-343
- Crofts F.G., Sutter T.R., Strickland P.T. 1998. Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis*, 19, 11: 1969-1973
- Danial N.N., Korsmeyer S.J. 2004. Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116, 2: 205-219
- Deitz A.C., Zheng W., Leff M.A., Gross M., Wen W.-Q., Doll M.A., Xiao G.H., Folsom A.R., Hein D. W. 2000. N-Acetyltransferase-2 genetic polymorphism, well-done meat intake, and breast cancer risk among postmenopausal women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9, 9: 905-910
- Delaney J.C., Essigmann J.M. 2007. Biological properties of single chemical-DNA adducts: A twenty year perspective. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1: 232-252
- Ding W.-X., Shen H.-M., Ong C.-N. 2002. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291, 2: 321-331
- Dingley K.H., Curtis K.D., Nowell S., Felton J.S., Lang N.P., Turteltaub K.W. 1999. DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8, 6: 507-512
- Doll R. 1992. The lessons of life: Keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Research*, 52, 7 Supplement: 2024s-2029s
- Doostdar H., Duthie S.J., Burke M.D., Melvin W.T., Grant M.H. 1988. The influence of culture-medium composition on drug-metabolizing enzyme-activities of the human-liver derived HepG2 cell-line. *Febs Letters*, 241, 1-2: 15-18

- Dragsted L.O., Frandsen H., Reistad R., Alexander J., Larsen J.C. 1995. DNA-binding and disposition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat. *Carcinogenesis*, 16, 11: 2785-2793
- Dreosti I.E. 1998. Nutrition, cancer and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 1: 371-377
- Duc R., Leong-Morgenthaler P.M. 2001. Heterocyclic amine induced apoptotic response in the human lymphoblastoid cell line TK6 is linked to mismatch repair status. *Mutation Research-DNA Repair*, 486, 2: 155-164
- Duc R., Leong-Morgenthaler P.M. 2004. Role of p53 and mismatch repair in PhIP-induced perturbations of the cell cycle. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 802, 1: 183-187
- Dumont J., Jossé R., Lambert C., Anthérieu S., Le Hegarat L., Aninat C., Robin M.-A., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A. 2010a. Differential toxicity of heterocyclic aromatic amines and their mixture in metabolically competent HepaRG cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245, 2: 256-263
- Dumont J., Josse R., Lambert C., Anthérieu S., Laurent V., Loyer P., Robin M.A., Guillouzo A. 2010b. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249, 1: 91-100
- Edenharder R., Worf-Wandelburg A., Decker M., Platt K. L. 1999. Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 444, 1: 235-248
- El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 4: 817-825
- El-Zein R.A., Schabath M.B., Etzel C.J., Lopez M.S., Franklin J.D., Spitz M.R. 2006. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Research*, 66, 12: 6449-6456
- Ellinger-Ziegelbauer H., Stuart B., Wahle B., Bommann W., Ahr H.-J. 2004. Characteristic expression profiles induced by genotoxic carcinogens in rat liver. *Toxicological Sciences*, 77, 1: 19-34
- Ellinger-Ziegelbauer H., Stuart B., Wahle B., Bommann W., Ahr H.J. 2005. Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 575, 1-2: 61-84
- Ewen M.E., Miller S.J. 1996. p53 and translational control. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1242, 3: 181-184
- Fan L.J., Schut H.A.J., Snyderwine E.G. 1995. Cytotoxicity, DNA adduct formation and DNA-repair induced by 2-hydroxyamino-3methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, 16, 4: 775-779
- Felton J.S., Knize M.G. 1991. Occurrence, identification, and bacterial mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259, 3-4: 205-217
- Felton J.S., Fultz E., Dolbeare F.A., Knize M.G. 1994. Effect of microwave pretreatment on heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 10: 897-903
- Felton J.S., Malfatti M.A., Knize M.G., Salmon C.P., Hopmans E.C., Wu R. W. 1997. Health risks of heterocyclic amines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376, 1-2: 37-41

- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285, 1: 35-44
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 1-2: 81-95
- Frandsen H., Grivas S., Turesky R.J., Andersson R., Dragsted L. O., Larsen J.C. 1994a. Formation of DNA adducts by the food mutagen 2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo [4,8-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) *in vitro* and *in vivo*. Identification of a N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-4,8-DiMeIQx adduct. *Carcinogenesis*, 15, 11: 2553-2558
- Frandsen H., Nielsen P.A., Grivas S., Larsen J.C. 1994b. Microsomal metabolism of the food mutagen 2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]-quinoxaline to mutagenic metabolites. *Mutagenesis*, 9, 1: 59-65
- Furihata C., Matsushima T. 1986. Mutagens and carcinogens in foods. *Annual Review of Nutrition*, 6: 67-94
- Globocan 2008. 2008. World Health Organization (oktober 2012)
<http://globocan.iarc.fr/> (7. jan. 2013)
- Gooderham N.J., Murray S., Lynch A.M., Yadollahi-Farsani M., Zhao K., Boobis A.R., Davies D.S. 2001. Food-derived heterocyclic amine mutagens: Variable metabolism and significance to humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 4: 529-534
- Gooderham N.J., Zhu H., Lauber S., Boyce A., Creton S. 2002. Molecular and genetic toxicology of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Mutatation Research*, 506-507: 91-99
- Gooderham N.J., Creton S., Lauber S.N., Zhu H. 2007. Mechanisms of action of the carcinogenic heterocyclic amine PhIP. *Toxicology Letters*, 168, 3: 269-277
- Goping I.S., Gross A., Lavoie J.N., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K., Korsmeyer S.J., Shore G.C. 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 143, 1: 207-215
- Göttlicher M., Cikryt P., Wiebel F.J. 1990. Inhibition of growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 5L rat hepatoma cells is associated with the presence of Ah receptor. *Carcinogenesis*, 11:2205-2210
- Green M.D., Tephly T.R. 1998. Glucuronidation of amine substrates by purified and expressed UDP-glucuronosyltransferase proteins: 1996 ASPET *N*-glucuronidation of xenobiotics symposium. *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 9: 860-867
- Green D.R., Evan G.I. 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell*, 1, 1: 19-30
- Gu D., McNaughton L., LeMaster D., Lake B.G., Gooderham N.J., Kadlubar F.F., Turesky R.J. 2010. A comprehensive approach to the profiling of the cooked meat carcinogens 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, and their metabolites in human urine. *Chemical Research in Toxicology*, 23, 4: 788-801
- Guengerich F.P., Turvy C.G. 1991. Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256, 3: 1189-1194
- Gupta S., Agrawal A., Agrawal S., Su H., Gollapudi S. 2006. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immunity & Ageing*, 3, 1: 5
- Hammons G.J., Milton D., Stepps K., Guengerich F.P., Tukey R.H., Kadlubar F.F. 1997. Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis*, 18, 4: 851-854
- Hanahan D., Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 1: 57-70
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 5: 646-674
- Harper J.W., Elledge S.J. 2007. The DNA damage response: Ten years after. *Molecular Cell*, 28, 5: 739-745

- Harris S.L., Levine A.J. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24, 17: 2899-2908
- Hasegawa R., Shirai T., Hakoi K., Takaba K., Iwasaki S., Hoshiya T., Ito N., Nagao M. in Takashi T. 1991. Synergistic enhancement of glutathione S-transferase placental form-positive hepatic foci development in diethylnitrosamine-treated rats by combined administration of five heterocyclic amines at low doses. *Cancer Science*, 82, 12: 1378-1384
- Hasegawa R., Tanaka H., Tamano S., Shirai T., Nagao M., Sugimura T., Ito N. 1994a. Synergistic enhancement of small and large intestinal carcinogenesis by combined treatment of rats with five heterocyclic amines in a medium-term multi-organ bioassay. *Carcinogenesis*, 15, 11: 2567-2573
- Hasegawa R., Miyata E., Futakuchi M., Hagiwara A., Nagao M., Sugimura T., Ito N. 1994b. Synergistic enhancement of hepatic foci development by combined treatment of rats with 10 heterocyclic amines at low doses. *Carcinogenesis*, 15, 5: 1037-1041
- Hasegawa R., Kimura J., Yaono M., Takahashi S., Kato T., Futakuchi M., Fukutake M., Fukutome K., Wakabayashi K., Sugimura T., Ito N., Shirai T. 1995. Increased risk of mammary carcinoma development following transplacental and trans-breast milk exposure to a food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), in Sprague-Dawley rats. *Cancer Research*, 55, 19: 4333-4338
- Hasegawa R., Kato T., Hirose M., Takahashi S., Shirai T., Ito N. 1996. Enhancement of hepatocarcinogenesis by combined administration of food-derived heterocyclic amines at low doses in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 11-12: 1097-1101
- Hashimoto T., Ashida H., Sano T., Furuyashiki T., Shiotani B., Kanazawa K., Danno G.-i. 2000. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) induces apoptosis in rat splenocytes and thymocytes by different mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 457, 1-2: 57-67
- Hashimoto T., Ashida H., Sano T., Furuyashiki T., Hatanaka Y., Minato K.-i., Mizuno M., Nomura K., Kumatori A., Kanazawa K., Danno G.-i. 2001. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) induces caspase-dependent apoptosis in mononuclear cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1539, 1-2: 44-57
- Hatch F.T. 1986. A current genotoxicity database for heterocyclic thermic food mutagens. I. Genetically relevant endpoints. *Environmental Health Perspectives*, 67: 93-103
- Hatch F.T., Knize M.G., Felton J.S., Morgan R.W. 1991. Quantitative structure-activity relationships of heterocyclic amine mutagens formed during the cooking of food. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17, 1: 4-19
- Hatch F.T., Colvin M.E., Seidl E.T. 1996. Structural and quantum chemical factors affecting mutagenic potency of aminoimidazo-azaarenes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27, 4: 314-330
- Hatch F.T., Knize M.G., Colvin M.E. 2001. Extended quantitative structure-activity relationships for 80 aromatic and heterocyclic amines: Structural, electronic, and hydrophobic factors affecting mutagenic potency. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38, 4: 268-291
- Hatch F.T., Knize M.G., Healy S.K., Slezak T., Felton J.S. 1988. Cooked-food mutagen reference list and index. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 12: 1-85
- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science*, 116, 20: 4077-4085
- Hayashi R., Luk H., Horio D., Dashwood R. 1996. Inhibition of apoptosis in colon tumors induced in the rat by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Cancer Research*, 56, 19: 4307-4310
- Haza A.I., Morales P. 2010. Effects of (+)-catechin and (-)-epicatechin on heterocyclic amines-induced oxidative DNA damage. *Journal of Applied Toxicology*, 31, 1: 53-62
- Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb S.J., Xiao G.H., Devanaboyina U.-S., Nangju N.A., Feng Y. 2000. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9, 1: 29-42

- Hein D.W. 2002. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506–507, 0: 65-77
- Hein D.W., Leff M.A., Ishibe N., Sinha R., Frazier H.A., Doll M.A., Xiao G.H., Weinrich M.C., Caporaso N.E. 2002. Association of prostate cancer with rapid *N*-acetyltransferase 1 (NAT1*10) in combination with slow *N*-acetyltransferase 2 acetylator genotypes in a pilot case-control study. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40, 3: 161-167
- Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 6805: 770-776
- Hewitt N.J., Hewitt P. 2004. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica*, 34, 3: 243-256
- Hoffmann G.R., Fuchs R.P.P. 1997. Mechanisms of frameshift mutations: Insight from aromatic amines. *Chemical Research in Toxicology*, 10, 4: 347-359
- Hollander M.C., Alamo I., Jackman J., Wang M.G., McBride O.W., Fornace A.J. Jr. 1993. Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 32: 24385-24393
- Holme J.A., Hongslo J.K., Søerlund E., Brunborg G., Christensen T., Alexander J., Dybing E. 1987. Comparative genotoxic effects of IQ and MeIQ in *Salmonella typhimurium* and cultured mammalian cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 187, 4: 181-190
- Holtz E. V. A., SkjÖLdebrand C., JÄgerstad M., Reuterswärd A. L. in Isberg P.-E. 1985. Effect of recipes on crust formation and mutagenicity in meat products during baking. *International Journal of Food Science & Technology*, 20, 1: 57-66
- Horváthová E., Slameňová D., Hlinčíková L., Mandal T.K., Gábelová A., Collins A. R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research/DNA Repair*, 409, 3: 163-171
- Hreljac I. 2009. Genotoksično, kogenotoksično in potencialno rakotvorno delovanje modelnih organofosfornih pesticidov. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani: 113 str.
- Hummerich J., Zohm C. in Pfau W. 2004. Modulation of cytochrome P450 1A1 by food-derived heterocyclic aromatic amines. *Toxicology*, 199, 2-3: 231-240
- Iida A., Saito S., Sekine A., Harigae S., Osawa S., Mishima C., Kondo K., Kitamura Y., Nakamura Y. 2001. Catalog of 46 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1) gene. *Journal of Human Genetics*, 46, 10: 590-594
- Iijima T. 2006. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neuroscience Research*, 55, 3: 234-243
- Immonen E., Serpi R., Vahakangas K., Myllynen P. 2009. Responses of PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) in MCF-7 cells are culture condition dependent. *Chemico-Biological Interactions*, 182, 1: 73-83
- IARC. 1993a. PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine). V: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances - food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Vol 56. Lyon, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: 229-242
- IARC. 1993b. MeIQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline). V: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances - food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Vol 56. Lyon, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: 211-228
- IARC. 1993c. IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline). V: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances - food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Vol 56. Lyon, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: 165-195.

- Ito N., Hasegawa R., Shirai T., Fukushima S., Hakoi K., Takaba K., Iwasaki S., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T. 1991. Enhancement of GST-P positive liver cell foci development by combined treatment of rats with five heterocyclic amines at low doses. *Carcinogenesis*, 12, 5: 767-772
- Jackson L.S., Hargraves W.A. 1995. Effects of time and temperature on the formation of MeIQx and DiMeIQx in a model system containing threonine, glucose, and creatine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 6: 1678-1684
- Jägerstad M., Skog K., Arvidsson P., Solyakov A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 207, 6: 419-427
- Jägerstad M., Skog K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*, 574: 156-172
- Johansson M., Skog K., Jägerstad M. 1993. Effects of edible oils and fatty acids on the formation of mutagenic heterocyclic amines in a model system. *Carcinogenesis*, 14, 1: 89-94
- Johansson M. 1995. Influence of lipids, and pro- and antioxidants on the yield of carcinogenic heterocyclic amines in cooked foods and model systems. Doctoral dissertation, Lund University.
- Johansson M.A.E., Jägerstad M. 1994. Occurrence of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in meat and fish products, including pan residues, prepared under domestic conditions. *Carcinogenesis*, 15, 8: 1511-1518
- Johansson M.A.E., Fay L.B., Gross G.A., Olsson K., Jägerstad M. 1995a. Influence of amino acids on the formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in a model system. *Carcinogenesis*, 16, 10: 2553-2560
- Johansson M.A.E., Fredholm L., Bjerne I., Jägerstad M. 1995b. Influence of frying fat on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 12: 993-1004
- Kaderlik K.R., Mulder G.J., Shaddock J.G., Casciano D.A., Teitel C.H., Kadlubar F.F. 1994a. Effect of glutathione depletion and inhibition of glucuronidation and sulfation on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) metabolism, PhIP-DNA adduct formation and unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 15, 8: 1711-1716
- Kaderlik K.R., Mulder G.J., Turesky R.J., Lang N.P., Teitel C.H., Chiarelli M.P., Kadlubar F.F. 1994b. Glucuronidation of *N*-hydroxy heterocyclic amines by human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 15, 8: 1695-1701
- Katic J., Cemeli E., Baumgartner A., Laubenthal J., Bassano I., Stølevik S.B., Granum B., Namork E., Nygaard U.C., Løvik M., Leeuwen D.V., Loock K.V., Anderson D., Fučić A., Decordier I. 2010. Evaluation of the genotoxicity of 10 selected dietary/environmental compounds with the in vitro micronucleus cytokinesis-block assay in an interlaboratory comparison. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 10: 2612-2623
- Kato T., Kikugawa K., Hayatsu H. 1986. Occurrence of the mutagens, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-MeIQx) in some Japanese smoked, dried fish products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 5: 810-814
- Kato T., Ohgaki H., Hasegawa H., Sato S., Takayama S., Sugimura T. 1988. Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Carcinogenesis* 9, 1: 71-73
- Kaufmann S.H., Hengartner M.O. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 11, 12: 526-534
- Kerdar R.S., Dehner D., Wild D. 1993. Reactivity and genotoxicity of arylnitrenium ions in bacterial and mammalian cells. *Toxicology Letters*, 67, 1-3: 73-85
- Khosravi-Far R. 2004. Death receptor signals to the mitochondria. *Cancer Biology & Therapy*, 3, 11: 1051-1057

- Kikugawa K., Kato T., Hayatsu H. 1986. The presence of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in smoked dry bonito (katsuobushi). Japanese Journal of Cancer Research, 77, 2: 99-102
- Kikugawa K. 1999. Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants. Cancer Letters, 143, 2: 123-126
- Kikugawa K. 2004. Prevention of mutagen formation in heated meats and model systems. Mutagenesis, 19, 6: 431-439
- King R.J.B., Robins M.W. (2006). Cancer Biology. Essex, Pearson Education.
- Kleman M.I., Övervik E., Mason G.G.F., Gustafsson J.-Å. 1992. In vitro activation of the dioxin receptor to a DNA-binding form by food-borne heterocyclic amines. Carcinogenesis, 13, 9: 1619-1624
- Knasmuller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A.T. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutat Res, 402, 1-2: 185-202
- Knasmuller S., Schwab C.E., Land S.J., Wang C.Y., Sanyal R., Kundi M., Parzefall W., Darroudi F. 1999. Genotoxic effects of heterocyclic aromatic amines in human derived hepatoma (HepG2) cells. Mutagenesis, 14, 6: 533-540
- Knasmuller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W.W., Hoelzl C., Bichler J., Majer B.J. 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. Toxicology, 198, 1-3: 315-328
- Knize M.G., Andresen B.D., Healy S.K., Shen N.H., Lewis P.R., Bjeldanes L.F., Hatch F.T., Felton J.S. 1985. Effects of temperature, patty thickness and fat content on the production of mutagens in fried ground beef. Food and Chemical Toxicology, 23, 12: 1035-1040
- Knize M.G., Salmon C.P., Hopmans E.C., Felton J.S. 1997. Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 763, 1-2: 179-185
- Knize M.G., Salmon C.P., Mehta S.S., Felton J.S. 1997. Analysis of cooked muscle meats for heterocyclic aromatic amine carcinogens. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 376, 1-2: 129-134
- Koch W.H., Wu R.W., Cebula T.A., Felton J.S. 1998. Specificity of base substitution mutations induced by the dietary carcinogens 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in *Salmonella*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 31, 4: 327-332
- Koopman G., Reutelingsperger C., Kuijten G., Keehnen R., Pals S., van Oers M. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, 84, 5: 1415-1420
- Korsmeyer S.J. 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cancer Research, 59, 7 Supplement: 1693s-1700s
- Kuehl P., Zhang J., Lin Y., Lamba J., Assem M., Schuetz J., Watkins P.B., Daly A., Wrighton S.A., Hall S.D., Maurel P., Relling M., Brimer C., Yasuda K., Venkataraman R., Strom S., Thummel K., Boguski M.S., Schuetz E. 2001. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. Nature Genetics, 27, 4: 383-391
- Kulp K.S., Knize M.G., Malfatti M.A., Salmon C.P., Felton J.S. 2000. Identification of urine metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans. Carcinogenesis, 21, 11: 2065-2072
- Kulp K.S., Fortson S.L., Knize M.G., Felton J.S. 2003. An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. Food and Chemical Toxicology, 41, 12: 1701-1710

- Lakin N.D., Jackson S.P. 1999. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 18, 53: 7644-7655
- Lakshmi V.M., Hsu F.F., Zenser T.V. 2002. Nitrosation and nitration of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by reactive nitrogen oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 8: 1059-1068
- Lane D.P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 6381: 15-16
- Langouët S., Welti D.H., Kerriguy N., Fay L.B., Huynh-Ba T., Markovic J., Guengerich F.P., Guillouzo A., Turesky R.J. 2001. Metabolism of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in human hepatocytes: 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline-8-carboxylic acid is a major detoxication pathway catalyzed by cytochrome P450 1A2. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 2: 211-221
- Langouët S., Paehler A., Welti D.H., Kerriguy N., Guillouzo A., Turesky R.J. 2002. Differential metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rat and human hepatocytes. *Carcinogenesis*, 23, 1: 115-122
- Le Hegarat L., Dumont J., Josse R., Huet S., Lanceleur R., Mourot A., Poul J.M., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A., Fessard V. 2010. Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, 25, 6: 555-60
- Le Marchand L., Hankin J.H., Pierce L.M., Sinha R., Nerurkar P.V., Franke A.A., Wilkens L.R., Kolonel L.N., Donlon T., Seifried A., Custer L.J., Lum-Jones A., Chang W. 2002. Well-done red meat, metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutation Research*, 506-507: 205-214
- Lee H., Lin M.-Y., Lin S.T. 1994. Characterization of the mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline prepared from a 2-methylpyridine/creatinine/acetylformaldehyde model system. *Mutagenesis*, 9, 2: 157-162
- Lee J.-H., Paull T.T. 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308, 5721: 551-554
- Leong-Morgenthaler P.M., Op Het Velt C., Jaccaud E., Turesky R.J. 1998. Mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in human lymphoblastoid cells. *Carcinogenesis*, 19, 10: 1749-1754
- Liang B.C., Miller L., Weller A. 1999. Ethyl-nitrosourea transformed astrocytes exhibit mitochondrial membrane hyperpolarization and constrained apoptosis. *Apoptosis*, 4, 2: 89-97
- Lightfoot T.J., Coxhead J.M., Cupid B.C., Nicholson S., Garner R.C. 2000. Analysis of DNA adducts by accelerator mass spectrometry in human breast tissue after administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and benzo[a]pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 472, 1-2: 119-127
- Lin D., Meyer D.J., Ketterer B., Lang N.P., Kadlubar F.F. 1994. Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Research*, 54, 18: 4920-4926
- Lin J., Lu A.H. 1998. Inhibition and Induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 35, 5: 361-390
- Loktionov A., Moore W., Spencer S.P., Vorster H., Nell T., O'Neill I.K., Bingham S.A., Cummings J.H. 2002. Differences in N-acetylation genotypes between Caucasians and Black South Africans: implications for cancer prevention. *Cancer Detection and Prevention*, 26, 1: 15-22
- Loretz L.J., Pariza M.W. 1984. Effect of glutathione levels, sulfate levels, and metabolic inhibitors on covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-acetylaminofluorene to cell macromolecules in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 5, 7: 895-899

- Luch A. 2005. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 5, 2: 113-125
- Maeda H., Sawa T., Akaike T. 1999. Free radical generation from heterocyclic amines by cytochrome b5 reductase in the presence of NADH. *Cancer Letters*, 143, 2: 117-121
- Majer B.J., Mersch-Sundermann V., Darroudi F., Laky B., de Wit K., Knasmuller S. 2004. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutation Research*, 551, 1-2: 153-166
- Malfatti M.A., Kulp K.S., Knize M.G., Davis C., Massengill J.P., Williams S., Nowell S., MacLeod S., Dingley K.H., Turteltaub K.W., Lang N.P., Felton J.S. 1999. The identification of [2-14C]2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine metabolites in humans. *Carcinogenesis*, 20, 4: 705-713
- Malfatti M.A., Shen N.H., Wu R.W., Turteltaub K.W., Felton J.S. 1995. A correlation of *Salmonella* mutagenicity with DNA adducts induced by the cooked-food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Mutagenesis*, 10, 5: 425-431
- Malfatti M.A., Felton J.S. 2001. N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis*, 22, 7: 1087-1093
- Malfatti M.A., Wu R.W., Felton J.S. 2005. The effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 expression on the mutagenicity and metabolism of the cooked-food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in CHO cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 570, 2: 205-214
- Manabe S., Kurihara N., Wada O., Tohyama K., Aramaki T. 1992. Formation of PhIP in a mixture of creatinine, phenylalanine and sugar or aldehyde by aqueous heating. *Carcinogenesis*, 13, 5: 827-830
- Manabe S., Kurihara N., Shibusaki T., Wada O., Ueki A., Suzuki H. 1993a. Nucleic acids induce the formation of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP) in a model system. *Carcinogenesis*, 14, 5: 903-906
- Manabe S., Suzuki H., Wada O., Ueki A. 1993b. Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in beer and wine. *Carcinogenesis*, 14, 5: 899-901
- Marez D., Legrand M., Sabbagh N., Lo Guidice J.M., Spire C., Lafitte J.J., Meyer U.A., Broly F. 1997. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics and Genomics*, 7, 3: 193-202
- Marlowe J.L., Puga A. 2005. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulations, toxicity, and tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96, 6: 1174-1184
- Maron D.M., Ames B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 3-4: 173-215
- Martin F.L., Cole K.J., Orme M.H., Grover P.L., Phillips D.H., Venitt S. 1999. The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL-5 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 445, 1: 21-43
- Mathiasen I.S., Jäättelä M. 2002. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 5: 212-220
- McPherson R.A.C., Tingle M.D., Ferguson L.R. 2001. Contrasting effects of acute and chronic dietary exposure to 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ) on xenobiotic metabolising enzymes in the male Fischer 344 Rat: implications for chemoprevention studies. *European Journal of Nutrition*, 40, 1: 39-47
- Metry K.J., Zhao S., Neale J.R., Doll M.A., States J.C., McGregor W.G., Pierce W.M., Hein D.W. 2007. 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine-induced DNA adducts and genotoxicity in

- Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing human CYP1A2 and rapid or slow acetylator *N*-acetyltransferase 2. Molecular Carcinogenesis, 46, 7: 553-563
- Metry K.J., Neale J.R., Doll M.A., Howarth A.L., States J.C., McGregor W.G., Pierce W.M., Hein D.W. 2010. Effect of rapid human *N*-acetyltransferase 2 haplotype on DNA damage and mutagenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 684, 1-2: 66-73
- Minchin R.F., Kadlubar F.F., Ilett K.F. 1993. Role of acetylation in colorectal cancer. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 290, 1: 35-42
- Morgenthaler P.-M.L., Holzhäuser D. 1995. Analysis of mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in human lymphoblastoid cells. Carcinogenesis, 16, 4: 713-718
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65, 1-2: 55-63
- Murata M., Kobayashi M., Kawanishi S. 1999. Mechanism of oxidative DNA damage induced by a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. Cancer Science, 90, 3: 268-275
- Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A, 207, 6: 477-480
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. Journal of Chromatography B, 802, 1: 3-10
- Nagao M., Honda M., Seino Y., Yahagi T., Sugimura T. 1977. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. Cancer Letters, 2, 4-5: 221-226
- Nagao M., Sugimura T. 1993. Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 290, 1: 43-51
- Nagao M., Ushijima T., Toyota M., Inoue R., Sugimura T. 1997. Genetic changes induced by heterocyclic amines. Mutat Res, 376, 1-2: 161-167
- Nagy G., Koncz A., Fernandez D., Perl A. 2007. Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation. Free Radical Biology and Medicine, 42, 11: 1625-1631
- Natarajan A.T., Darroudi F. 1991. Use of Human hepatoma cells for invitro metabolic-activation of chemical mutagens carcinogens. Mutagenesis, 6, 5: 399-403
- Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B., Gonzalez F.J. 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. Journal of Biological Chemistry, 279, 23: 23847-23850
- Nelson C.P., Kidd L.C.R., Sauvageot J., Isaacs W.B., De Marzo A.M., Groopman J.D., Nelson W.G., Kensler T.W. 2001. Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. Cancer Research, 61, 1: 103-109
- Ohgaki H., Takayama S., Sugimura T., 1991. Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. Mutation Research, 259, 3-4: 399-410
- Orrenius S. 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Toxicology Letters, 149, 1-3: 19-23
- Ostling O. in Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 123, 1: 291-298
- Ozawa S., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R. 1995. Formation of 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline- and 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-sulfamates by cDNA-expressed Mammalian Phenol Sulfotransferases. Cancer Science, 86, 3: 264-269

- Pais P., Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. 1999. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3: 1098-1108
- Palka K. 2004. Heat effects on meat. *Encyclopedia of meat science*. Oxford, Elsevier Ltd.
- Pearson A.M., Chen C., Gray J.I., Aust S.D. 1992. Mechanism(s) involved in meat mutagen formation and inhibition. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 2: 161-168
- Perez C., Lopez de Cerain A., Bello J. 2002. Induction of micronuclei in V79 cells after combined treatments with heterocyclic aromatic amines. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 10: 1463-1467
- Perl A., Gergely Jr. P., Nagy G., Koncz A., Banki K. 2004. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends in Immunology*, 25, 7: 360-367
- Petković J. 2011. Mehanizmi toksičnega in genotksičnega delovanja nanodelcev TiO₂. Doktorsko delo. Univerza v Ljubljani: 138 str.
- Pfau W., Martin F.L., Cole K.J., Venitt S., Phillips D.H., Grover P.L., Marquardt H. 1999. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20, 4: 545-551
- Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D. 2012. R Development Core Team (2012) nlme: Linear and nonlinear mixed effects models, R package version 3.1-103; Vienna, R Foundation for Statistical Computing.
- Polak T., Andrenšek S., Žlender B., Gašperlin L. 2009a. Effects of ageing and low internal temperature of grilling on the formation of heterocyclic amines in beef Longissimus dorsi muscle. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1: 256-264
- Polak T., Došler D., Žlender B., Gašperlin L. 2009b. Heterocyclic amines in aged and thermally treated pork longissimus dorsi muscle of normal and PSE quality. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 2: 504-513
- Ponnuswamy A., Fahraneus R. 2012. The regulation of p53 synthesis. *Klinická onkologie: casopis České a Slovenské onkologické společnosti*. 25, 2: 32-37
- R: A Language and environment for statistical computing. 2012. Vienna, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing
- Ramsey M.J., Nagao M., Inoue R., Fujita H., Matsushima T., Tucker J.D. 1998. Chromosome Aberrations induced in mice by chronic feeding of 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 6: 467-474
- Reed J.C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157, 5: 1415-1430
- Reers M., Smith T.W., Chen L.B. 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, 30, 18: 4480-4486
- Roberts R.A., James N.H., Cosulich S., Hasmall S.C., Orphanides G. 2001. Role of cytokines in non-genotoxic hepatocarcinogenesis: cause or effect? *Toxicology Letters*, 120, 1-3: 301-306
- Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. 1998. DNA Double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 10: 5858-5868
- Roth J., Dobbelstein M., Freedman D.A., Shenk T., Levine A.J. 1998. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *The EMBO Journal*, 17, 2: 554-564
- Saito K., Shinohara A., Kamataki T., Kato R. 1985. Metabolic activation of mutagenic N-hydroxyarylamines by O-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA98. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 239, 1: 286-295
- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 5: 433-441

- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S., Zhao B., Seow A. 2006. Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 4: 484-92
- Salvesen G.S., Dixit V.M. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 4: 443-446
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 1: 39-85
- Sandell L.L., Zakian V.A. 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell*, 75, 4: 729-739
- Saraste A. 1999. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*, 24, 3: 189-195
- Sasaki Y. 2003. Detection of the fate of DNA damage detected by the comet assay in HepG2. V: From hazard to risk, 33rd annual meeting of European Environmental Mutagen Society. Aberdeen, 24-28 avg. 2003. Collins A., Carere A., Adler I.-D., Jha A., Phillips D., Wild C., Jenkinson P., Ratcliffe B., Dunbar K. (ur.). UK Environmental Mutagen Society: 70-71
- Sato K., Akaike T., Kojima Y., Ando M., Nagao M., Maeda H. 1992. Evidence of direct generation of oxygen free radicals from heterocyclic amines by NADPH/cytochrome P-450 reductase *in vitro*. *Cancer Science*, 83, 11: 1204-1209
- Schut H.A., Snyderwine E.G. 1999. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20, 3: 353-368
- Sedelnikova O.A., Rogakou E.P., Panyutin I.G., Bonner W.M. 2002. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation research*, 158, 4: 486-92
- Shibamoto T., Bjeldanes L. 2009. Introduction to food toxicology. Burlington, Academic Press, Elsevier: 320 str.
- Shibutani S., Fernandes A., Suzuki N., Zhou L., Johnson F., Grollman A.P. 1999. Mutagenesis of the N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine DNA adduct in mammalian cells: Sequence context effects. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 39: 27433-27438
- Shimada T., Guengerich F.P. 1991. Activation of amino- α -carboline, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, and a copper phthalocyanine cellulose extract of cigarette smoke condensate by cytochrome P-450 enzymes in rat and human liver microsomes. *Cancer Research*, 51, 19: 5284-5291
- Shiotani B., Nonaka Y., Hashimoto T., Kihara K., Kanazawa K., Danno G.-I., Ashida H. 2001. DNA-damaging carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b]indole (Trp-P-1) induces apoptosis via caspase-9 in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 22, 5: 693-700
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 1: 184-191
- Sinha R., Knize M.G., Salmon C.P., Brown E.D., Rhodes D., Felton J.S., Levander O.A., Rothman N. 1998a. Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 4: 289-297
- Sinha R., Rothman N., Salmon C.P., Knize M.G., Brown E.D., Swanson C.A., Rhodes D., Rossi S., Felton J.S., Levander O.A. 1998b. Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 279-287
- Sjödin P.B., Nyman M.E., Nilsson L., Asp N.-G. L., Jägerstad M.I. 1985. Binding of 14C-labeled food mutagens (IQ, MeIQ, MeIQx) by dietary fiber *in vitro*. *Journal of Food Science*, 50, 6: 1680-1684
- Sjödin P., Wallin H., Alexander J., Jägerstad M. 1989. Disposition and metabolism of the food mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in rats. *Carcinogenesis*, 10, 7: 1269-1275

- Skog K., Jägerstad M., Laser Reuterswärd A. 1992. Inhibitory effect of carbohydrates on the formation of mutagens in fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 8: 681-688
- Skog K. 1993. Cooking procedures and food mutagens: A literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 9: 655-675
- Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., Jägerstad M. 1997. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 6: 555-565
- Skog K.I., Johansson M.A., Jagerstad M I. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 9-10: 879-896
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.-G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R., Martin S.J. 1999. Ordering the cytochrome c initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9 dependent manner. *The Journal of Cell Biology*, 144, 2: 281-292
- Smart D.J., Ahmed K.P., Harvey J.S., Lynch A.M. 2011. Genotoxicity screening via the gamma H2AX by flow assay. *Mutation Research*, 715, 1-2: 25-31
- Snyderwine E.G., Turesky R.J., Turteltaub K.W., Davis C.D., Sadrieh N., Schut H.A., Nagao M., Sugimura T., Thorgeirsson U.P., Adamson R.H., Thorgeirsson S.S. 1997. Metabolism of food-derived heterocyclic amines in nonhuman primates. *Mutation Research*, 376, 1-2: 203-210
- Spingarn N.E., Garvie-Gould C., Vuolo L.L., Weisburger J.H. 1981. Formation of mutagens in cooked foods. IV. Effect of fat content in fried beef patties. *Cancer Letters*, 12, 1-2: 93-97
- Stillwell W.G., Kidd L.C.R., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Sinha R. 1997. Urinary excretion of unmetabolized and phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans: Relationship to cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase activity. *Cancer Research*, 57, 16: 3457-3464
- Stone E.M., Williams J.A., Grover P.L., Gusterson B.A., Phillips D. H. 1998. Interindividual variation in the metabolic activation of heterocyclic amines and their N-hydroxy derivatives in primary cultures of human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, 19, 5: 873-879
- Styczynski P.B., Blackmon R.C., Groopman J.D., Kensler T.W. 1993. The direct glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human and rabbit liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 6, 6: 846-851
- Sugimura T., Nagao M., Kawachi T., Honda M., Yahagi Y., Seino S., Stao S., Matsukura M., Matsushima A., Shirai M., Sawamura M., Matsumoto H. 1977. Mutagens-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. V: Origin of human cancer. Hiatt C.H.H., Watson J.D., Winstein J.A. (eds.). Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory: 1561-1577.
- Sugimura T. 1986. Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan. *Science*, 233, 4761: 312-320
- Sugimura T. 1997. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research*, 376, 1-2: 211-219
- Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95: 290-299
- Sutandyo N. 2010. Nutritional carcinogenesis. *Nutritional Carcinogenesis*, 42, 1: 36-42
- Thompson L.H., Tucker J.D., Stewart S.A., Christensen M.L., Salazar E.P., Carrano A.V., Felton J.S. 1987. Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus Salmonella mutagenicity. *Mutagenesis*, 2, 6: 483-487
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 3: 206-221

- Tikkanen L.M., Latva-Kala K.J., Heiniö R.L. 1996. Effect of commercial marinades on the mutagenic activity, sensory quality and amount of heterocyclic amines in chicken grilled under different conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 8: 725-730
- Tjøtta K., Ingebrigtsen K., Aune T. 1992. Tissue distribution of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in two strains of male rats. *Carcinogenesis*, 13, 5: 779-782
- Tompkins L.M., Wallace A.D. 2007. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21, 4: 176-181
- Tsuda H., Sekine K., Uehara N., Takasuka N., Moore M.A., Konno Y., Nakashita K., Degawa M. 1999. Heterocyclic amine mixture carcinogenesis and its enhancement by caffeine in F344 rats. *Cancer Letters*, 143, 2: 229-234
- Tucker J.D., Carrano A.V., Allen N.A., Christensen M.L., Knize M.G., Strout C.L., Felton J.S. 1989. *In vivo* cytogenetic effects of cooked food mutagens. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 224, 1: 105-113
- Turbic A., Ahokas J.T. in Haskard C.A. 2002. Selective *in vitro* binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Additives and Contaminants*, 19, 2: 144-152
- Turesky R., Lang N.P., Butler M.A., Teitel C.H., Kadlubar F.F. 1991. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis*, 12, 10: 1839-1845
- Turesky R.J., Rossi S.C., Welti D.H., Lay J.O., Kadlubar F.F. 1992. Characterization of DNA adducts formed *in vitro* by reaction of *N*-hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and *N*-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline at the C-8 and N2 atoms of guanine. *Chemical Research in Toxicology*, 5, 4: 479-490
- Turesky R.J., Box R.M., Markovic J., Gremaud E., Snyderwine E.G. 1997. Formation and persistence of DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat and nonhuman primates. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376, 1-2: 235-241
- Turesky R.J., Constable A., Richoz J., Varga N., Markovic J., Martin M.V., Guengerich F.P. 1998a. Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chemical Research in Toxicology*, 11, 8: 925-936
- Turesky R.J., Garner R.C., Welti D.H., Richoz J., Leveson S.H., Dingley K.H., Turteltaub K.W., Fay L.B. 1998b. Metabolism of the food-borne mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans. *Chemical Research in Toxicology*, 11, 3: 217-225
- Turesky R.J., Constable A., Fay L.B., Guengerich F.P. 1999. Interspecies differences in metabolism of heterocyclic aromatic amines by rat and human P450 1A2. *Cancer Letters*, 143, 2: 109-112
- Turesky R.J., Vouros P. 2004. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 155-166
- Turesky R.J. 2005. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 2: 101-117
- Turesky R.J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168, 3: 219-227
- Turesky R.J. 2010. Heterocyclic aromatic amines. Potential human carcinogens. V: Advances in molecular toxicology. Volume 4. Fishbein J.C. (ed.), Amsterdam, Elsevier. 4: 37-83.
- Turesky R.J. in Le Marchand L. 2011. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: Lessons learned from aromatic amines. *Chemical Research in Toxicology*, 24, 8: 1169-1214
- Turteltaub K.W., Knize M.G., Healy S.K., Tucker J.D., Felton J.S. 1989. The metabolic disposition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the induced mouse. *Food and Chemical Toxicology*, 27, 10: 667-673

- Turteltaub K.W., Vogel J.S., Frantz C.E., Shen N. 1992. Fate and distribution of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in mice at a human dietary equivalent dose. *Cancer Research*, 52, 17: 4682-4687
- Valentin-Severin I., Le Hegarat L., Lhuquenot J.C., Le Bon A.M., Chagnon M.C. 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*, 536, 1-2: 79-90
- Vance V.A., Levin D.A. 1984. Structural features of nitroaromatics that determine mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 6: 767-811
- Venugopal M., Agarwal R., Callaway A., Schut H.A.J., Snyderwine E. . 1999. Inhibition of cell death in human mammary epithelial cells by the cooked meat-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 1: 203-207
- Viegas O., Žegura B., Pezdric M., Novak M., Ferreira I.M.P.L.V.O., Pinho O., Filipič M. 2012. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines MelQx and PhIP in bacteria and in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3-4: 949-955
- Vitaglione P., Fogliano V. 2004. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 189-199
- Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 6810: 307-310
- Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H., Sugimura T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Research*, 52, 7 Supplement: 2092s-2098s
- Wakabayashi K., Totsuka Y., Fukutome K., Oguri A., Ushiyama H., Sugimura T. 1997. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic beta-carbolines. *Mutation Research*, 376: 253-262
- Waldman T., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research*, 55, 22: 5187-5190
- Wallin H., Mikalsen A., Guengerich F.P., Ingelman-Sundberg M., Solberg K.E., Rossland O.J., Alexander J. 1989. Differential rates of metabolic activation and detoxication of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by different cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis*, 11, 3: 489-492
- Wang X.W., Zhan Q., Coursen J.D., Khan M.A., Kontny H.U., Yu L., Hollander M.C., O'Connor P.M., Fornace A.J. Jr., Harris C.C. 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7: 3706-3711
- Wang Y.Y., Vuolo L.L., Spingarn N.E., Weisburger J.H. 1982. Formation of mutagens in cooked foods V. The mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef. *Cancer Letters*, 16, 2: 179-189
- Watkins B.E., Esumi H., Wakabayashi K., Nagao M, Sugimura T. 1991. Fate and distribution of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) in rats. *Carcinogenesis*, 12, 6: 1073-1078
- Watters G.P., Smart D.J., Harvey J.S., Austin C.A. 2009. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutation Research*, 679, 1-2: 50-58
- Wei M., Wanibuchi H., Nakae D., Tsuda H., Takahashi S., Hirose M., Totsuka Y., Tatematsu M., Fukushima S. 2011. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21(Cip/WAF1). *Cancer Science*, 102, 1: 88-94
- Westerink W.M., Schoonen W.G. 2007. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology In Vitro*, 21, 8: 1592-1602

- Whitlock J.P. 1999. Induction of cytochrome P4501A1. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 39, 1: 103-125
- Wickham H. 2007. Reshaping data with the reshape package. Journal of Statistical Software, 21: 1-20
- Wickham H. 2009. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York, Springer NY: 213 str.
- Wiebel F.J., Klose U., Kiefer F. 1991. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in vitro: H4IIEC3-derived 5L hepatoma cells as a model system. Toxicology Letters, 55:161-169
- Wilkening S., Bader A. 2003. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17, 4: 207-213
- Wilkening S., Stahl F., Bader A. 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. Drug Metabolism and Disposition, 31, 8: 1035-1042
- Winter H.K., Ehrlich V.A., Grusch M., Lackner A., Schulte-Hermann R., Grasl-Kraupp B., Mikulits W., Knasmüller S. 2008. Use of four new human-derived liver-cell lines for the detection of genotoxic compounds in the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 657, 2: 133-139
- Wrangham R., Conklin-Brittain N. 2003. Cooking as a biological trait. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 136, 1: 35-46
- Wu R.W., Pantelakos F.N., Kadkhodayan S., Bolton-Grob R., McManus M.E., Felton J.S. 2000. Genetically modified Chinese hamster ovary cells for investigating sulfotransferase-mediated cytotoxicity and mutation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35, 1: 57-65
- Wu R.W., Tucker J.D., Sorensen K.J., Thompson L.H., Felton J. S. 1997. Differential effect of acetyltransferase expression on the genotoxicity of heterocyclic amines in CHO cells. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 390, 1-2: 93-103
- Yamazaki H., Inui Y., Wrighton S. A., Guengerich F.P., Shimada T. 1995. Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in Escherichia coli and by human liver microsomes. Carcinogenesis, 16, 9: 2167-2170
- Yueh M. F., Nguyen N., Famourzadeh M., Strassburg C.P., Oda Y., Guengerich F.P., Tukey R.H. 2001. The contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A9 on CYP1A2-mediated genotoxicity by aromatic and heterocyclic amines. Carcinogenesis, 22, 6: 943-950
- Yueh M.-F., Huang Y.-H., Hiller A., Chen S., Nguyen N., Tukey R.H. 2003. Involvement of the Xenobiotic Response Element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. Journal of Biological Chemistry, 278, 17: 15001-15006
- Zenser T. V., Lakshmi V. M., Schut H.A.J., Zhou H.-J., Josephy P.D. 2009. Activation of aminoimidazole carcinogens by nitrosation: Mutagenicity and nucleotide adducts. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 673, 2: 109-115
- Zhan Q. 2005. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 569, 1-2: 133-143
- Zheng W., Lee S.-A. 2009. Well-Done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk. Nutrition and Cancer, 61, 4: 437-446
- Zheng W., Xie D., Cerhan J. R., Sellers T. A., Wen W. in Folsom A. R. 2001. Sulfotransferase 1A1 polymorphism, endogenous estrogen exposure, well-done meat intake, and breast cancer risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 10, 2: 89-94
- Zhou B.-B.S., Elledge S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature, 408, 6811: 433-439
- Zhou B.B.S., Elledge S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature, 408, 6811: 433-439

- Zhu H., Boobis A.R., Gooderham N.J. 2000. The food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine activates S-phase checkpoint and apoptosis, and induces gene mutation in human lymphoblastoid TK6 cells. *Cancer Research*, 60, 5: 1283-1289
- Žegura B. 2004. Vloga reaktivnih kisikovih zvrsti pri genotoksičnem delovanju mikrocistinov. Doktorsko delo, Univerza v Ljubljani: 148 str.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Metki Filipič se zahvaljujem za usmerjanje pri delu in izdelavi doktorske disertacije. Predsedniku Komisije za zagovor prof. dr. Borisu Turku in članicama prof. dr. Lei Demšar in prof. dr. Mariji Sollner Dolenc se zahvaljujem za vse pripombe ter hiter pregled doktorske disertacije.

Posebna zahvala za vso pomoč, nasvete in podporo pri delu gre doc. dr. Bojani Žegura.

Hvala vsem sodelavcem: Ireni H., Anji P., Katji, Ani T., Saši, Urošu, Jani, Anji B., Ireni Z. in Borisu za debate o tem in onem. Alja hvala za pomoč in dobro voljo. Urška in Monika hvala, ker sta me prenašali ☺. Hvala Matjažu, Neži, Mateji, Olgi, Ani K., Karmen, Tini in Heleni za druženje in popestritev dnevov. Ani R. in Živi za ves smeh in ukraden čas.

Hvala Maji J., Maji S., Jasni, Marijeti, Ines in Urši za poslušanje.

Za pomoč pri izvedbi poskusov se zahvaljujem Ani Kopčavar in Tomažu Bercetu.

Ne nazadnje staršem in sestri, ki so me vzpodbujali in omogočili, da sem prišel tako daleč.

PRILOGA A
Kemikalije uporabljene v poskusih

Kemikalija	Proizvajalec, država	Kataloška številka
4,8-DiMeIQx	Toronto Research Chemicals, Kanada	A631000
Aceton	Sigma-Aldrich, Nemčija	650501
Bacto agar	Bio-Rad Labs, Nemčija	214010
Akrilamid:bisakrilamid, 40%	Bio-Rad Labs, Nemčija	161-0148
Akridin oranž	Sigma, ZDA	318337-16
APS (amonijev persulfat)	Sigma-Aldrich, Nemčija	A3678
Benzo(a)piren (BaP)	Sigma, ZDA	B-1760
Bradford reagent (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	Bio-Rad Labs, Nemčija	500-0006
Brij 35	Sigma-Aldrich, Nemčija	430AG-6
BSA (goveji serumski albumin)	Sigma-Aldrich, Nemčija	A9418
CaCl ₂	Merck, ZDA	1023780500
Citohalazin B	Sigma, ZDA	C-6762
D-Biotin	Merck, ZDA	2031-16M
DCFH-DA (2',7'-diklorofluorescin diacetat)	Invitrogen, Združeno kraljestvo	D399
DMSO	Sigma, ZDA	154938-1L
D-glukoza monohidrat	Sigma-Aldrich, Nemčija	16301
DTT (ditiotreitol)	Fermentas, Kanada	R0861
EDTA	Sigma, ZDA	E5134-500G
Etanol	Sigma, ZDA	32221
Etidijev bromid	Gibco BRL, Združeno kraljestvo	15585-011
Etopozid	Santa Cruz Biotechnology, ZDA	sc-3512A
FBS (serum govejega zarodka)	PAA, Avstrija	A15-104
Formaldehid	Sigma, ZDA	533998-500ML
Glicin	Sigma-Aldrich, Nemčija	G7126
Glikogen	Sigma, ZDA	6-8751
Glukoza-6-fosfat	Sigma, ZDA	G-7879
HCl	Merck, Nemčija	1.09063.1000
HEPES	Sigma-Aldrich, Nemčija	H4034
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem, ZDA	4368813
Izopropilalkohol	Sigma, ZDA	34965
IQ	Toronto Research Chemicals, Kanada	A616500
K ₂ HPO ₄	Merck, ZDA	1.04873.0250
KCl	Fluka, Nemčija	60130
Kloroform	Sigma, ZDA	366919-1L
L-glutamin	PAA, Avstrija	M11-010

se nadaljuje

nadaljevanje

Kemikalija	Proizvajalec, država	Kataloška številka
L-histidin	AppliChem, ZDA	A-1591
LMP agarosa	Invitrogen, Združeno kraljestvo	15517-022
MeIQx	Toronto Research Chemicals, Kanada	A606600
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Fulka, nemčija	63140
MTS	Promega, ZDA	G1111
MTT	Sigma, ZDA	M-5655
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Nemčija	S5761
Na ₂ HPO ₄	Fluka, Nemčija	71640
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck, Nemčija	1.06580.1000
NaCl	Merck, Nemčija	1.06404.100
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Nemčija	1.06346.0500
NaOH	Merck, Nemčija	1.06482.1000
NMP agarosa	Invitrogen, VB	16500-100
Nutrient Broth N°2 Oxoid	Oxoid, VB	CM0067
Ocetna kislina	Merck, Nemčija	607:002-00-6
PBS (10x)	PAA, Avstrija	H15-011
Penicilin/streptomicin	PAA, Avstrija	P11-010
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Nemčija	77170
PhIP	Toronto Research Chemicals, Kanada	A617000
PMFS (fenilmethylsulfonil fluorid)	Sigma-Aldrich, Nemčija	P7626
PMS (fenazin metasulfat)	Sigma-Aldrich, Nemčija	P9625-500MG
S9	Moltox, ZDA	11-01L.2
SDS	Promega, ZDA	H5113
TaqMan PCR Master mix	Applied Biosystem, ZDA	4304437
Temed	Sigma-Aldrich, Nemčija	T9281
Tripansko modrilo	Sigma, ZDA	T-8154
Tripsin	Sigma, ZDA	T-4174
Tris	Merck, Nemčija	1.08382.1000
Triton X-100	Fluka, Nemčija	93420
Trizol® Reagent	Invitrogen, Združeno kraljestvo	15596-018
Tween 20	Merck, ZDA	1.0928.0100
Williams medij	Sigma, ZDA	W1878

PRILOGA B

Sestava gojišč in raztopin v bakterijskem testu povratnih mutacij

Hranilno gojišče:

Sestavine	za 1 l
Nutrient Broth N°2 Oxoid	15 g
Destilirana voda	1000 ml

Plošče minimalnega glukoznega gojišča:

Sestavine	za 1 l
Agar	15 g
Destilirana voda	930 ml
50x VB sol	20 ml
40% glukoza	50 ml

50x VB sol (Vogel-Bonner medij):

Sestavine	za 1 l
Destilirana voda	670 ml
MgSO ₄	10 g
40% glukoza	50 ml
K ₂ HPO ₄	500 g
NaHNH ₄ PO ₄ x 4H ₂ O	175 g

4% S9 metabolna mešanica:

Sestavine	za 1 l
1 M KCl	33 µl
0,2 M MgCl ₂ x 6H ₂ O	32 µl
0,2 M Glc-6-P	25 µl
0,2 M NADP	20 µl
0,2 M NaHPO ₄	500 µl
Destilirana voda	270 µl
S9 homogenat	40 µl

Površinski agar:

Sestavine	za 1 l
Agar	6 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	1000 ml

Raztopina histidina in biotina:

Sestavine	za 50 ml
D-biotin (M=247,3)	61,8 mg
L-histidin (M=191,7)	48 mg
Destilirana voda	50 ml

PRILOGA C

Sestava gojišča za HepG2 celice in raztopin pri testu komet

Gojišče za HepG2 celice:

Sestavine	za 50 ml
Williams medij	41 ml
FBS, 1x	7,5 ml
L-glutamin, 100 mM	1 ml
penicilin/streptomicin, 100x	0,5 ml

Raztopina za liziranje celic (pH 7,5):

2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 100 mM Tris	za 1 l
NaCl	146,4 g
EDTA	37,2 g
Tris	1,21 g
Destilirana voda	0,5 g

Tripsin (0,1 %):

Sestavine	za 0,5 l
tripsin	0,5 g
EDTA	0,05 g
NaCl	4 g
KCl	0,2 g
D-glukoza monohidrat	0,5 g
NaHCO ₃	0,42 g
Destilirana voda	500 ml

Tik pred uporabo dodali 1 % Triton-X 100

Pufer za elektroforezo:

300 mM NaOH; 1 mM EDTA

Sestavine	za 1 l
10 M NaOH	30 ml
0,2 M EDTA	5 ml
Destilirana voda	965 ml

10 M NaOH in 0,2 M EDTA:

Sestavine	za 1 l
10 M NaOH	400 g
0,2 M EDTA	74,4 g
Destilirana voda	1000 ml

Raztopina za nevtralizacijo (pH 7,5):

0,4 M Tris

Sestavine	za 1 l
Tris	48,44 g
Destilirana voda	1000 ml

PRILOGA D

Sestava raztopin in pufrov pri pripravi proteinskih vzorcev in prenosu Western

Sestava homogenizacijskega pufta:

Tris (pH 6,9); 0,05% Brij 35;
0,5 mM DTE; 5 mM EDTA

Sestavine	za 0,2 l
Tris	1,21 g
30% Brij 35	0,33 ml
200 mM DTE	0,5 ml
EDTA	0,38 g

Tik pred uporabo dodali 0,5 mM PMFS v acetonu (končna koncentracija 0,5 mM) in Pepstatin A v DMSO (končna koncentracija 10 µM).

Sestava 12% separacijskega in koncentracijskega gela

Sestavine	za dva gela
<i>Separacijsku gel</i>	
Destilirana voda	4,5 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
40% akrilamid:bisakrilamid (29:1)	3 ml
10% SDS	100 µl
Temed	6,5 µl
10% APS	70 µl

Koncentracijski gel

Destilirana voda	2,6 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,95 ml
40% akrilamid:bisakrilamid (29:1)	350 µl
10% SDS	100 µl
Temed	3,4 µl
10% APS	40 µl

Sestava elektroforetskega pufra:

Sestavine	za 1 l
10x Tris/glicin (pH 8,3)	100 ml
10% SDS	10 ml
Destilirana voda	890 ml

10x Tris/glicin pripravimo z raztopljanjem 40 g Tris in 144 g glicina v 1 l destilirane vode.

Sestava pufra za prenos:

Sestavine	za 1 l
10x Tris/glicin (pH 8,3)	100 ml
Metanol	700 ml
Destilirana voda	890 ml

Sestava raztopine za blokiranje vezavnih mest:

Sestavine	za 1 l
5% blocking reagent	50 g
0,1% Tween 20	1 ml
1x PBS	949 ml