

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Nina BIZJAK

**CITOTOKSIČNO IN GENOTOKSIČNO DELOVANJE
MODELNIH MUTAGENOV NA CELIČNO LINIJO
HepG2-p21-dsRED**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Nina BIZJAK

**CITOTOKSIČNO IN GENOTOKSIČNO DELOVANJE MODELNIH
MUTAGENOV NA CELIČNO LINIJO HepG2-p21-dsRED**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECT OF MODEL MUTAGENS
ON CELL LINE HepG2-p21-dsRED**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, v laboratorijih Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka

Študijska komisija oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Metko Filipič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Mihael J. Toman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Doc. dr. Metka Filipič
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka

Članica: Prof. dr. Damjana Drobne
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 6.9.2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina Bizjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 577.2:542:616(043.2)=163.6
KG HepG2 celice/ biosenzorski sistem/ protein DsRED/ promotor p21/ citotoksičnost/ genotoksičnost/ MTS test/ izražanje poročevalskega proteina/ test komet
AV BIZJAK, Nina
SA FILIPIČ, Metka (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN CITOTOKSIČNO IN GENOTOKSIČNO DELOVANJE MODELNIH MUTAGENOV NA CELIČNO LINIJO HepG2-p21-dsRED
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 63 str., 1 pregl., 19 sl., 114 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Vsakodnevno smo izpostavljeni mnogim dejavnikom, ki povzročajo poškodbe DNA, s potencialnim mutagenim učinkom, ki lahko vodi v nastanek rakastih obolenj. Takšne dejavnike je potrebno prepoznati in oceniti, kakšno tveganje za človekovo zdravje predstavljajo. V zadnjem času je v razvoju veliko različnih testov genotoksičnosti, katerih namen je zaznati čim širši spekter genotoksičnih snovi. V diplomski nalogi smo preverjali učinkovitost novega biosenzorskega testnega sistema za enostavno in hitro zaznavanje genotoksičnih snovi, ki temelji na liniji človeških celic.
Metabolno aktivne celice človeškega hepatoma HepG2 transfecirane s plazmidom, ki kodira za protein DsRED pod kontrolo promotorja *p21* (HepG2-p21-dsRED), smo izpostavili različnim koncentracijam genotoksičnih snovi z znanimi mehanizmi delovanja (posredno delujoča snov benzo(a)piren (BaP), alkilirajoča dejavnika metil metan sulfonat (MMS) in cisplatin (CP), citostatik (VNB) ter gama žarki, kot fizikalni genotoksični dejavnik). Preživetje celic po tretiranju z mutageni smo določili z MTS testom. Genotoksično delovanje mutagenov smo testirali z meritvijo povečanja jakosti fluorescence zaradi povečanega izražanja poročevalskega proteina DsRED pod vplivom promotorja *p21* in s testom komet.
MTS test je pokazal od doze in časa odvisno citotoksično delovanje vseh testiranih mutagenov. BaP je povzročil značilno povečanje produkcije DsRED, ki je bilo odvisno od doze, po 24- in 48-urni izpostavitvi koncentraciji 1 μ M. Značilno povečanje fluorescence smo opazili po 24 urah inkubacije z 10 μ g/ml MMS in po 48 urah inkubacije z 5 μ g/ml MMS. CP in VNB sta povzročila značilno povečanje izražanja DsRED že po 24-urni inkubaciji z najnižjo testirano koncentracijo kemikalije (0.4125 μ g/ml oziroma 0.05 μ g/ml). S testom komet smo po tretiranju z BaP in MMS zaznali značilno povečanje poškodb DNA pri enakih koncentracijah kot povečanje izražanja poročevalskega proteina DsRED. Po obsevanju z gama žarki smo zaznali značilno povečanje prelomov DNA pri dozah nad 2 Gy, značilno povečanje izražanja DsRED pa le pri 6 Gy 48 ur po obsevanju. CP in VNB nista povzročila izrazitega povečanja prelomov DNA, kar je skladno z njunima mehanizmoma delovanja.
Rezultati diplomske naloge so pokazali, da je biosenzorski sistem, ki temelji na celični liniji HepG2-p21-dsRED, primerna metoda za hitro in učinkovito zaznavanje genotoksičnosti mutagenov z različnimi mehanizmi delovanja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC 577.2:542:616(043.2)=163.6
CX HepG2 cells/ biosensor system/ DsRED protein/ p21 promotor/ citotoxicity/ genotoxicity/ MTS assay/ reporter gene assay/ comet assay
AU BIZJAK, Nina
AA FILIPIČ, Metka (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2010
TI CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECT OF MODEL MUTAGENS ON CELL LINE HepG2-p21-dsRED
TD Graduation Thesis (University studies)
NO X, 63 p., 1 tab., 19 fig., 114 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In everyday life humans are exposed to many DNA damaging agents that are potential mutagens and can induce cancer development. Such agents should be identified and their effect on human health studied. Recently many new genotoxicity tests for the detection of wide range of genotoxic agents are being developed. In our research the effectiveness of a new human cell-based biosensor system for simple and fast detection of genotoxic agents was tested.
Metabolically active HepG2 human hepatoma cells transfected with plasmid encoding DsRED protein under the control of the *p21* promoter (HepG2-p21-dsRED) were exposed to different concentrations of genotoxic agents with known mechanisms of action (indirectly acting agent benzo(a)pyren (BaP), alkylating agent methylmethane sulphonate (MMS), bifunctional alkylating agent cisplatin (CP), spindle poison vinblastine (VNB) and gamma rays). MTS assay was used to determine the viability of treated cells. Genotoxic activity of mutagens was tested by measuring of the increase in fluorescence intensity due to p21 mediated DsRED reporter protein expression and by use of the comet assay.
MTS assay showed dose and time dependant cytotoxic effects of all tested mutagens. BaP induced significant increase in DsRED production which was dose-dependent at concentration 1 μM after 24 and 48 hours of exposure. Fluorescence intensity was significantly increased after treatment with 10 $\mu\text{g/ml}$ MMS after 24- and with 5 $\mu\text{g/ml}$ MMS after 48-hour exposure. CP and VNB induced significant increase in DsRED fluorescence at lowest tested concentrations (0.4125 $\mu\text{g/ml}$ and 0.05 $\mu\text{g/ml}$, respectively) already after 24 hours of exposure. With the comet assay we detected significant increase in DNA strand breaks after the treatment with BaP and MMS at the same doses as significant increase of DsRED fluorescence. Irradiation with gamma rays induced significant increase in DNA strand breaks at doses higher than 2 Gy, whereas significant increase in DsRED fluorescence was detected only at 6 Gy 48 hours after the irradiation. Treatment of cells with CP and VNB didn't result in significant increase in DNA strand breaks, which is in line with the mechanism of action of these two genotoxicants.
The results of our research showed that biosensor system based on cell line HepG2-p21-dsRED can be used for fast and effective detection of genotoxic mutagens with different mechanisms of action.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNE HIPOTEZE.....	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 METODE ZA UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI.....	4
2.2 POROČEVALSKI TESTNI SISTEMI ZA DOLOČANJE GENOTOKSIČNOSTI.....	5
2.2.1 Testi na bakterijah.....	6
2.2.2 Testi na celicah kvasovk.....	7
2.2.3 Testi na sesalčjih celicah.....	8
2.3 IZBRANI MODELNI MUTAGENI.....	10
2.3.1 Policiklični aromatski ogljikovodiki.....	10
2.3.1.1 Benzo(a)piren (BaP).....	10
2.3.2 Alkilirajoče snovi.....	11
2.3.2.1 Metil metan sulfonat (MMS).....	12
2.3.2.2 Cisplatin (CP).....	12
2.3.3 Vinca alkaloidi.....	13
2.3.3.1 Vinblastin (VNB).....	14
2.3.4 Visokoenergijska sevanja.....	14
2.3.4.1 Gama žarki.....	14
2.4 CELIČNA LINIJA HEPG2.....	15
2.4.1 Celična linija HepG2-p21-dsRED.....	16
3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.1.1 Celična linija HepG2-p21-dsRED.....	17
3.1.1.1 Gojenje celic HepG2-p21-dsRED.....	17
3.1.2 Kemikalije.....	18
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Določanje citotoksičnosti – MTS test.....	19
3.2.2 Določanje izražanja poročevalskega proteina DsRED s spektrofluorimetrom....	20
3.2.3 Določanje genotoksičnosti – test komet.....	22
3.2.3.1 Test komet.....	22
3.2.3.2 Izpostavitve celic modelnim mutagenom.....	23
3.2.3.3 Priprava raztopin in reagentov za test komet.....	24
3.2.3.4 Potek testa komet.....	25

4	REZULTATI	28
4.1	CITOTOKSTIČNOST MODELNIH MUTAGENOV – MTS TEST	28
4.1.1	BaP	28
4.1.2	MMS.....	29
4.1.3	CP.....	30
4.1.4	VNB	31
4.1.5	Gama žarki	32
4.2	IZRAŽANJE POROČEVALSKEGA PROTEINA.....	33
4.2.1	BaP	33
4.2.2	MMS.....	34
4.2.3	CP.....	35
4.2.4	VNB	36
4.2.5	Gama žarki	37
4.3	TEST KOMET – POŠKODBE DNA	38
4.3.1	BaP	38
4.3.2	MMS.....	39
4.3.3	CP.....	40
4.3.4	VNB	41
4.3.5	Gama žarki	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.1.1	Citotoksičnost modelnih mutagenov	43
5.1.2	Izražanje poročevalskega proteina	46
5.1.3	Test komet	48
5.2	SKLEPI.....	51
6	POVZETEK.....	53
7	LITERATURA	55

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Slika 1: Plazmid pp21-DsRED	16
Slika 2: Nativna celična linija HepG2-p21-dsRED	17
Slika 3: Celična linija HepG2-p21-dsRED z inducirano fluorescenco po 48-urni inkubaciji z MMS (40 µg/ml)	17
Slika 4: Fotografije jeder celic HepG2, ki prikazujejo poškodovano DNA	22
Slika 5: Vpliv različnih koncentracij BaP na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 in 48 urah inkubacije z mutagenom.....	28
Slika 6: Vpliv različnih koncentracij MMS na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom	29
Slika 7: Vpliv različnih koncentracij CP na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom	30
Slika 8: Vpliv različnih koncentracij VNB na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom	31
Slika 9: Vpliv različne doze gama žarkov na preživetje celic HepG2-p21-dsRED 24 (A) in 48 (B) ur po obsevanju	32
Slika 10: Vpliv različnih koncentracij BaP na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 in 48 urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic	33
Slika 11: Vpliv različnih koncentracij MMS na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 in 48 urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic	34
Slika 12: Vpliv različnih koncentracij CP na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 in 48 urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic	35
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij VNB na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 in 48 urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic	36
Slika 14: Vpliv različne doze gama žarkov 24 in 48 ur po obsevanju celic HepG2-p21-dsRED na izražanje poročevalskega proteina DsRED normirano na preživetje celic.....	37
Slika 15: Vpliv različnih koncentracij BaP na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED	38
Slika 16: Vpliv različnih koncentracij MMS na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED	39

Slika 17: Vpliv različnih koncentracij CP na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED	40
Slika 18: Vpliv različnih koncentracij VNB na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED	41
Slika 19: Vpliv različne doze gama žarkov na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije uporabljene v diplomski nalogi.....	18
--	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALS	alkalno labilna mesta (alkali-labile sites)
BaP	benzo(a)piren (benzo(a)pyrene)
BPQ	BaP-kinoni (BaP-quinones)
CP	cisplatin (cisplatin)
CDK	od ciklina odvisna kinaza (cyclin-dependent kinase)
CYP	citokrom P450 (cytochrome P450)
DMSO	dimetil sulfoksid (dimethylsulphoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
DSB	dvoverižni prelomi DNA (double-strand breaks)
EGFP	ojačan zeleni fluorescentni protein (enhanced green fluorescent protein)
GADD	growth arrest and DNA damage
GFP	zeleni fluorescentni protein (green fluorescent protein)
Gy	gray (J/kg)
HC	človeške celice (human cells)
HepG2	celična linija človeških jetrnih celic (human hepatoma cell line)
HPRT	hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaza (hypoxanthine-guanosine phosphoribosyl transferase)
IF	indukcija fluorescence (fluorescence induction)
LMP	nizka temperatura tališča (low melting point)
MCF	Michigan Cancer Foundation
MDM	murine double minute
MMS	metil metan sulfonat (methilmethane sulphonate)
NMP	normalna temperaturo tališča (normal melting point)
NER	popravljanje DNA z izrezovanjem nukleotidov (nucleotide excision repair)
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PBS	raztopina fosfatnega pufra (phosphate buffer saline)
PCNA	proliferajoči celični jedrni antigen (proliferating cell nuclear antigen)
RAD	recombination and DNA repair
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (reactive oxygen species)
SCGE	elektroforeza posamezne celice (single cell gel electrophoresis)
SSB	enoverižni prelomi DNA (single-strand breaks)
TK	timidin kinaza (thymidine kinase)
VNB	vinblastin (vinblastine)

1 UVOD

Pogosta izpostavljenosti genotoksičnim snovem predstavlja tveganje za človekovo zdravje, zaradi česar je potrebno take dejavnike identificirati. Testirati moramo tako kemikalije, ki jih proizvaja industrija, kot tudi snovi, ki so prisotne v našem okolju. V večini držav zakonodaja zahteva predložitev podatkov, ki potrjujejo, da kemikalija ni genotoksična, preden gre na tržišče (npr. EU zakonodaja o varnosti kemikalij – REACH). Na osnovi toksikoloških podatkov, ki vključujejo tudi podatke o genotoksičnosti, lahko ocenimo, kakšno je pri izpostavljenosti tveganje za zdravje ljudi, in kakšni so njihovi potencialni vplivi na okolje.

Testiranje genotoksičnosti kemikalij in proizvodov, kot so farmacevtska sredstva, pesticidi, dodatki v prehrani in kozmetika, praviloma temelji na naboru testov genotoksičnosti, ki sestojijo iz *in vitro* testov na genske mutacije pri bakterijah in sesalčjih celicah, iz *in vitro* testov na poškodbe kromosomov ter iz *in vivo* testov na poškodbe kromosomov v glodavskih hematopoetskih celicah (Elespuru in sod., 2009). Vendar so te metode neprimerne za hitro presejalno testiranje, ker traja več tednov, podatke pa bi potrebovali v krajšem času, in ker so potrebne razmeroma velike količine testirane kemikalije ali vzorca, na razpolago pa so le majhne količine, kot na primer pri razvoju novih spojin v farmacevtski industriji ali pa pri monitoringu onesnaženja okolja, kadar testiramo koncentrirane vzorce.

Genotoksični dejavniki povzročijo različne vrste poškodb DNA. Da bi se ubranile pred posledicami teh poškodb, so celice razvile kompleksne obrambne mehanizme, ki ohranjajo genomsko stabilnost, ter vključujejo ustavitev celičnega cikla, popravljanje poškodb DNA in apoptozo. Kot odziv na poškodbe DNA se v celici aktivira vrsta različnih genov in zaznavanje sprememb izražanja teh genov lahko služi kot pokazatelj genotoksičnosti. Testni sistemi s genom za poročevalski protein, ki meri spremembe izražanja genov, ki se odzovejo na poškodbo DNA, so se izkazali kot primerni za presejalno testiranje genotoksičnosti (Žager in sod., 2010). Že dolgo so uveljavljeni bakterijski sistemi, ki temeljijo na zaznavanju sprememb izražanja genov vključenih v SOS odziv (Sutton in sod., 2000), v zadnjih letih pa so bili razviti tovrstni tudi testi z evkariontskimi organizmi; kvasovkami in sesalčjimi celicami (Putnam in sod., 2009; Holbrook in sod., 1991).

Na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo so razvili nov test s stabilno transfeciranimi celicami človeškega hepatoma HepG2 za hitro ugotavljanje genotoksičnosti, ki temelji na zaznavanju produkta poročevalskega gena za rdeči fluorescentni protein (DsRED), vezanega na promotorsko regijo tumor supresorskega gena *p21*, ki se specifično odzove pri poškodbah DNA. Prednosti razvitega novega testa so uporaba promotorja gena *p21*, za katerega so nedavne toksikogenomske študije na podganah pokazale, da se specifično odzove le na izpostavljenost genotoksičnim karcinogenom, ter metabolno aktivne HepG2 celice, ki omogočajo zaznavanje posredno delujočih karcinogenov brez uporabe izvencelične metabolne aktivacije.

1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je preveriti občutljivost stabilno transfecirane celične linije HepG2-p21-dsRED na izbrane modelne mutagene. Za testiranje smo izbrali substance iz različnih skupin mutagenov z znanimi mehanizmi delovanja. Benzo(a)piren (BaP) potrebuje metabolno aktivacijo, metil metan sulfonat (MMS) in cisplatin (CP) sta alkilirajoča dejavnika, citostatik vinblastin (VNB) ustavi celično delitev, gama žarke pa uvrščamo med fizikalne genotoksične dejavnike.

V diplomski nalogi smo želeli raziskati:

- občutljivost celične linije HepG2-p21-dsRED na citotoksično delovanje modelnih genotoksičnih dejavnikov (BaP, MMS, CP, VNB in gama žarkov),
- ali se pod vplivom delovanja modelnih genotoksičnih dejavnikov v celični liniji HepG2-p21-dsRED poveča izražanje poročevalskega proteina DsRED, vezanega na promotor *p21*,
- primernost uporabe celične linije HepG2-p21-dsRED za ugotavljanje vpliva modelnih genotoksičnih dejavnikov na nastanek verižnih prelomov DNA s testom komet,
- ali je celična linija HepG2-p21-dsRED uporabna za določanje genotoksičnosti snovi z različnimi mehanizmi delovanja in,
- s katero metodo – z merjenjem izražanja poročevalskega proteina ali s testom komet – zaznamo genotoksično delovanje modelnih mutagenov pri nižjih koncentracijah (oziroma dozi) teh mutagenov.

Naša hipoteza je bila, da bo merjenje fluorescence proteina DsRED, kot odziv na poškodbe DNA povzročene z modelnimi mutageni, enak ali bolj občutljiv pokazatelj genotoksičnega delovanja kot merjenje poškodb DNA s testom komet. Na osnovi dobljenih rezultatov bomo ovrednotili, ali je celična linija HepG2-p21-dsRED primerna za hitre presejalne teste genotoksičnosti in, ali je njena odzivnost primerljiva z odzivnostjo podobnih testnih sistemov.

2 PREGLED OBJAV

V okolju in prehrani je prisotnih veliko dejavnikov, ki predstavljajo tveganje za človekovo zdravje. Mnogi od njih lahko povzročijo smrt celic ali poškodujejo DNA. Možna posledica tovrstnega delovanja so mutacije, ki so ključnega pomena za pojav rakastih obolenj (De Flora in Ferguson, 2005). Epidemološki podatki kažejo, da so ravno okoljski dejavniki glavni vzrok za večino tovrstnih bolezni, kar nakazuje, da bi se s primernimi ukrepi v okolju teoretično lahko izognili njihovi prisotnosti (Weinstein, 1978). Da bi dosegli potencialno zmanjšanje izpostavljenosti ljudi karcinogenim vplivom moramo prepoznati možne genotoksične snovi in raziskati, kakšno tveganje za nastanek raka predstavljajo (Ku in sod., 2007).

2.1 METODE ZA UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI

Zaradi dobro definirane tarče delovanja genotoksičnih kemikalij, obstaja veliko testnih modelov za njihovo identifikacijo. Običajno se uporablja sistem več testov, ki ima večjo moč pri predvidevanju rakotvornosti kot posamezni testi (IARC, 1987). Eden izmed najbolj uporabljanih testov genotoksičnosti je test povratnih mutacij pri bakterijah, t.i. Amesov test (Maron in Ames, 1983). Primerjave rezultatov Amesovega testa z dvoletnim testom rakotvornosti pri glodavcih so pokazale, da ima Amesov test visoko specifičnost (med 70 in 90 %), vendar dokaj nizko občutljivost (50 – 60 %), kar pomeni, da okrog polovice glodalskih karcinogenov kaže lažno negativne rezultate (Zeiger, 1998).

Številne genotoksične snovi so t.i. klastogeni – povzročajo prelome na kromosomih. Za njihovo določanje se tradicionalno uporablja *in vitro* test kromosomskih aberacij na sesalčjih celicah, pri katerem se določajo strukturne poškodbe kromosomov tretiranih celic v metafazi – ta test je dolgotrajen in zahteva izkušene strokovnjake (Jacobson-Kram in Contrera, 2007). Kot alternativni test za določanje klastogenosti se je uveljavil *in vitro* test mikro jeder ali mikronukleus test (Fenech, 2000), ki je veliko hitrejši in bolj enostaven, nedavno pa je bil validiran kot zanesljiva zamenjava za test kromosomskih aberacij (Corvi in sod., 2008).

Kemikalije, ki ne povzročijo strukturnih sprememb kromosomov, ampak točkovne mutacije (angl. point mutations) lahko zaznavamo z ugotavljanjem mutacij v specifičnih genih (najbolj

uporabljeni gen sta gen za timidin kinazo – TK in gen za hipoksantin-gvanin fosforibozil transferazo – HPRT) v različnih sesalčjih in človeških celicah (Compton in sod., 1991).

Genotoksičnost določamo tudi s pomočjo metod, ki pokažejo učinek kemikalije na DNA. V to skupino spadajo merjenje aduktov genotoksičnih kemikalij na DNA, test zamenjav sestrskih kromatid (angl. sister chromatide exchange) in test komet. Slednji je zelo občutljiva metoda, s katero lahko merimo eno- (SSB; angl. single-strand breaks) in dvoverižne (DSB; angl. double-strand breaks) prelome DNA ter alkalno labilna mesta (ALS; angl. alkali-labile sites). Z različnimi modifikacijami testa komet lahko ločimo med specifičnimi vrstami poškodb DNA (Collins, 2004). Najnovejši pristop identifikacije genotoksičnih kemikalij je iskanje značilnega profila izražanja genov s pomočjo tehnologije mikročipov (Newton in sod., 2004). Primer skupine genov, ki se specifično izrazijo po poškodbah DNA, so geni, katerih izražanje uravnava transkripcijski faktor p53 – na primer *p21*, *GADD45a* (angl. growth arrest and DNA damage) in *MDM2* (angl. murine double minute) (Ellinger-Ziegelbauer in sod. 2004; Ellinger-Ziegelbauer in sod. 2005).

2.2 POROČEVALSKI TESTNI SISTEMI ZA DOLOČANJE GENOTOKSIČNOSTI

Zaradi trenda zmanjševanja uporabe poskusnih živali, potrebe po pridobivanju podatkov o genotoksičnosti v kratkem času in za veliko število kemikalij (npr. v farmacevtski industriji pri razvoju novih zdravil) ter zahtevnosti testiranja kompleksnih mešanic in okoljskih vzorcev obstaja potreba po hitrih presejalnih testih za določanje genotoksičnosti. V ta namen je posebej obetaven razvoj poročevalskih testov, ki vsebujejo promotorje genov, ki se odzovejo na poškodbe DNA, vezane na poročevalske molekule, ki jih lahko zaznamo. Na tem principu temeljijo nekateri že dolgo uveljavljeni bakterijski testni sistemi: SOS/umu test (Oda in sod. 1985) in SOS kromotest (Quillardet in sod., 1982). V zadnjih letih pa je bilo razvitih tudi več različic tovrstnih testov z evkariontskimi celicami: kvasovkami in sesalčjimi celicami (Putnam in sod., 2009; Holbrook in sod., 1991).

2.2.1 Testi na bakterijah

Bakterije so zelo razširjeni organizmi v sistemih za testiranje genotoksičnosti. Najpogosteje uporabljen testni sistem za detekcijo mutagenosti in potencialne karcinogenosti je razvil Bruce Ames leta 1975 (Amesov test). Test uporablja seve bakterije *Salmonella typhimurium* kot občutljive indikatorje za poškodbe DNA in ekstrakt sesalčjih jeter za metabolno pretvorbo karcinogenov v njihovo aktivno mutageno obliko. Z njim zaznamo povratne mutacije in temelji na neposrednem mutagenem delovanju potencialnih karcinogenov (McCann in sod., 1975).

Na bakterijah so bili razviti tudi prvi testi, ki delujejo na podlagi odziva celice na poškodbe, ki jih povzročijo genotoksični dejavniki. Pri bakterijah zaradi poškodb DNA pride do sprememb izražanja genov, vključenih v SOS odgovor celice (Oda in sod., 1985; Quillardet in Hofnung, 1993; Verschaeve in sod., 1999). Primeri testov, s katerimi lahko opravljamo tovrstne analize, so: kolorimetrični SOS kromotest (Quillardet in Hofnung, 1993), Vitotox test, pri katerem je poročevalec luciferazni protein (Van der Lelie in sod., 1996) ter SOS/umuC test. Slednji, tako kot Amesov test, temelji na uporabi seva bakterije *S. typhimurium*. Bakterije nosijo na plazmidu gen za β -galaktozidazo, zlit s promotorjem gena *umuC*, ki se aktivira pri SOS odgovoru (Reifferscheid in sod., 2004), in aktivnost katerega se spreminja tekom testiranja genotoksičnih vplivov. Uporaba prokariotskih SOS testov v farmacevtski industriji je omejena in se v zadnjem času usmerja predvsem v monitoring okolja (Knight in sod., 2009).

Čeprav so se testi na bakterijah izkazali kot precej učinkoviti, imajo nekaj slabosti, ki so predvsem posledica tega, da temeljijo na prokariotskih celicah in torej ne zaznajo genotoksinov, katerih tarče so za evkarionte specifične molekule (Cahill in sod., 2004).

2.2.2 Testi na celicah kvasovk

Testni sistemi, ki temeljijo na sevih kvasovk, imajo določene prednosti tako prokariontskih kot tudi evkariontskih testov. Kulture kvasovk so, podobno kot kulture prokariontskih mikroorganizmov, stabilne, imajo hitro rast in jih je enostavno gojiti. Ker pa so kvasovke evkarionti, so dobljeni rezultati bolj ustrezni za predvidevanje učinkov pri višjih evkariontskih organizmih, sesalcih oziroma človeku (Knight in sod., 2009). Primera testov na kvasovkah, ki temeljita na genih za poročevalske molekule, sta RadarScreen in GreenScreen.

Test RadarScreen uporablja sev kvasovk SKAM4, ki vsebuje konstrukt z β -galaktozidaznim poročevalcem. Poročevalski gen se izrazi pod vplivom promotorja *RAD54* (angl. recombination and DNA repair), ki se aktivira ob poškodbi DNA, ko se zlomi dvojne vijačnice popravljajo s homologno rekombinacijo (Westering in sod., 2010).

Test GreenScreen temelji na zaznavanju indukcije popravljanja DNA pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Promotor kvasovke *RAD54* je povezan z genom za zeleni fluorescentni protein (GFP; angl. green fluorescent protein). Poškodba DNA inducira *RAD54*, kar vpliva na povečano sintezo GFP. Količino izraženega GFP lahko kvantitativno izmerimo z meritvijo fluorescence. Kvasovke imajo sicer nižjo sposobnost metabolne aktivacije promutagenov (npr. v primerjavi s sesalčjimi jetri ali njihovim ekstraktom), vendar test vseeno zazna delovanje nekaterih spojin, pri katerih je metabolna aktivacija za uspešno testiranje genotoksičnosti nujno potrebna (Cahill in sod., 2004). Uporaben je povsod, kjer je potrebno testirati velike količine spojin, npr. v farmacevtski industriji.

2.2.3 Testi na sesalčjih celicah

Znanih je kar nekaj testov genotoksičnosti na sesalčjih celicah, ki temeljijo na izražanju poročevalskega proteina pod vplivom genov, ki se odzovejo na poškodbe DNA, kot pokazateljev genotoksičnih poškodb. Todd in sod. (1995) so prvi izkoristili gene, vključene v odziv na poškodbe DNA, kot so *p53R2*, *GADD45a* in *GADD153* za konstrukcijo kloramfenikol acetil transferaznega poročevalca, ki so ga stabilno integrirali v HepG2 celice.

p53R2 je eden izmed tarčnih genov p53 in kodira podenoto ribonukleotidne reduktaze (Tanaka in sod., 2000; Guittet in sod., 2001). Ohno in sod. (2005; 2008) so *p53R2* uporabili za konstrukcijo testnih sistemov s človeškimi celicami raka dojke MCF-7 (MCF – kratica, kjer so vzpostavili celično linijo leta 1973; angl. Michigan Cancer Foundation – 7) in HepG2 celicami, ki kot poročevalski gen uporabljata gen za luciferazo.

Druga skupina genov, ki jih uravnava p53, so *GADD* geni. Izrazijo se kot odziv na okoljski stres, ki vključuje poškodbe DNA, ter povzročijo zaustavitev celičnega cikla na prehodu faz G1/S ali G2/M (Siafakas in Richardson, 2009). Hastwell in sod. (2006) so razvili testni sistem, kjer izražanje poročevalskega proteina EFP (angl. enhanced green fluorescent protein) uravnava elementi *GADD45a* genov, vnešeni v človeško limfoblastoidno celično linijo TK6, ki izraža aktiven protein p53. Ta testni sistem je občutljiv in natančen (Birrell in sod., 2010) ter je poznan kot test GreenScreen HC (HC angl. human cell-based). Zhang in sod. (2009) pa so razvili stabilno transfecirano celično linijo HepG2, ki vsebuje promotorsko regijo *GADD153*, sklopljeno z luciferaznim poročevalskim genom.

Nedavne toksikogenomske raziskave so pokazale, da sta gena *GADD45* in *GADD153* relativno nespecifična, in da njun odziv povzročijo tudi ne-genotoksični karcinogeni (Ellinger-Ziegelbauer in sod., 2005), ter zaradi tega nista specifična pokazatelja genotoksičnosti. Ta raziskava je pokazala, da se le nekaj genov specifično odzove na poškodbe povzročene z genotoksičnimi karcinogeni, in sicer: inhibitor od ciklina odvisne kinaze 1A (CDK; angl. cyclin-dependent kinase; p21; CDKN1A), ciklin G1 in O6-metilguanin-DNA metiltransferaza – MGMT. Ti geni so se odzvali s povečanim izražanjem le po izpostavitvi podgan genotoksičnim karcinogenom.

Znano je, da je v sesalčjih celicah najpomembnejša pot odziva na poškodbe DNA aktivacija tumor supresorja p53 prek fosforilacije z kinazami, ki jih aktivira poškodba DNA. Aktiviran p53 nato inducira izražanje genov, ki so vpleteni v popravljanje poškodb DNA, ustavitev celičnega cikla in apoptozo (Zhou in Elledge, 2000). Inhibitor od ciklina odvisne kinaze 1A – p21, je glavni tarčni gen aktiviranega p53, ki prek zaviranja CDK ustavi celični cikla v G1 in G2 fazi mitoze (Waldman in sod., 1995; Vogelstein in sod., 2000). Poleg tega se p21 veže na proliferajoči celični jedrni antigen (PCNA) in s tem vpliva na delovanje od PCNA odvisne DNA polimeraze ter s tem na replikacijo DNA in procese popravljanja poškodb DNA.

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo, Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka, so razvili testni sistem z metabolno aktivnimi celicami HepG2, ki so jih stabilno transfecirali s konstruktom s poročevalskim genom za ojačan zeleni fluorescentni protein (EGFP; angl. enhanced green fluorescent protein) (Hreljac, 2009; Žager in sod., 2010), ki je vezan na operativno regijo promotorja gena *p21*. Ob poškodbah DNA se poveča izražanje *p21* in s tem tudi izražanje poročevalskega gena (Patentna prijava P2010000072, Urad RS za industrijsko lastnino).

2.3 IZBRANI MODELNI MUTAGENI

2.3.1 Policiklični aromatski ogljikovodiki

Pomembna skupina genotoksičnih snovi v našem okolju so policiklični aromatski ogljikovodiki (angl. PAHs – polycyclic aromatic hydrocarbons). Nastajajo pri nepopolnem izgorevanju ali pirolizi organskega materiala (npr. fosilnih goriv), ki vsebuje ogljik in kisik. Mešanice PAH lahko nastajajo v naravi (npr. gozdni požari) ali pod vplivom človekovega delovanja, ki vodi v onesnaženje zraka, vode, zemlje, sedimentov in hrane (npr. cigaretni dim, emisije iz pečic, strešne kritine).

2.3.1.1 Benzo(a)piren (BaP)

Med PAH je najbolje preučen BaP (Brooks in sod., 1999), ki je v mešanicah PAH prisoten povsod v okolju. Mutagen je v prokariotskih in evkariotskih testnih sistemih in je živalski karcinogen (IARC, 1973; IARC, 1983; Huberman in Sachs, 1974; McCann, 1975), ki ga uvrščajo v skupino 2A (angl. probably carcinogenic to humans) (IARC, 1987). Kot močan sistemski in lokalni karcinogen pri živalskih modelih sproži nastanek tumorjev na koži, pljučih in v želodcu (Ueng in sod., 2001). Pri testih genotoksičnosti se BaP uporablja tudi kot substanca za pozitivno kontrolo (Amanuma in sod., 2008).

BaP je sam po sebi nereaktiven in postane mutagen šele po metabolni aktivaciji. Mutagenost BaP je odvisna od razmerja med encimi za njegovo aktivacijo in detoksikacijo (Yang in sod., 1977) ter od uravnavanja njihovega delovanja in razporeditve v celici. Glavni encim, ki je vključen v njegovo metabolno aktivacijo je citokrom CYP1A1 (Eberhard in sod., 1992; Shimada in sod., 1989; Vahakangas in sod., 1989).

Poti metabolizma BaP so kompleksne, vendar so kot končni genotoksični metabolit, ki ga tvori citokrom-P450 sistem, identificirali anti-izomer BaP 7,8-diol-9,10-epoksid (Sims in sod., 1974; Sims in sod., 1975). Za to pretvorbo so potrebne tri encimatske reakcije (Yang in sod., 1977): začetna epoksidacija, pri kateri nastane 7,8-epoksid, hidroliza epoksida v (-)-*trans*-8-diol in na koncu še sekundarna epoksidacija diola v BaP-7,8-diol-9,10-epoksid (anti izomera). Končni produkt metabolizma BaP (diol-epoksid BPDE) se kovalentno veže na

gvaninske baze na DNA (Perlow in sod., 2002) in tvori DNA adukte, kar sproži popravljalne procese DNA. Popravilo mora uspešno poteči pred podvojevanjem DNA, sicer nastanek aduktov povzroči nukleotidne substitucije, delecije in preurejanje kromosomov (Rieger in sod., 1991), kar lahko vodi v karcinogenozo ali celično smrt. Genotoksični metaboliti BaP so tudi BaP-kinoni (BPQ), ki nastanejo pod vplivom citokroma P450, aldo keto reduktaze, peroksidaze ali UV-svetlobe. Preko redoks reakcij pri tem nastanejo tudi proste kisikove zvrsti (ROS). ROS povzročijo poškodbe v celici, vključno s poškodbami DNA, ki prav tako lahko vodijo v nastanek mutacij in celično smrt (Burdick in sod., 2003).

Raziskave so pokazale, da izpostavitve celic BaP inducira aktivacijo tumor supresorja p53 in genov, ki jih p53 uravnava, vključno s *p21* (Wang in sod., 2003; Hreljac in sod., 2008). Na aktivacijo p53 vpliva tako nastanek poškodb DNA, kot tudi oksidativni stres, ki sta posledica delovanja BaP na celice (Ueno in sod., 1999).

2.3.2 Alkilirajoče snovi

Alkilirajoče snovi so v okolju zelo pogoste. Najdemo jih v naravi, pomemben vir so tudi onesnaženja, npr. cigaretni dim (Scherer in sod., 2010), poleg tega pa se pogosto uporabljajo pri kemoterapijah za zdravljenje nekaterih vrst raka. Njihovi učinki so toksični, mutageni, teratogeni in karcinogeni ter so posledica kovalentne vezave na tarčno molekulo (Scherer in sod., 2010). Z DNA reagirajo neposredno *in vitro* in *in vivo*, reaktivni pa so lahko tudi produkti njihove metabolne aktivacije (npr. dialkinitrozamini), zaradi česar se zelo pogosto uporabljajo pri raziskavah mehanizmov mutageneze in karcinogeneze. Produkti reakcij alkilirajočih dejavnikov z DNA (proteini, glutationom) se lahko uporabljajo kot biomarkerji za izpostavljenost tem kemikalijam (Van Welie in sod., 1992). Spadajo med kemikalije, ki povzročajo poškodbe DNA, kar vodi v motnje funkcije DNA in celično smrt (Baek in sod., 2009). Škoda, ki jo povzročijo se popravlja predvsem z izrezovanjem poškodovanih baz in DNA alkiltransferazami (Lee in sod., 2007).

2.3.2.1 Metil metan sulfonat (MMS)

Alkilirajoči dejavnik metil metan sulfonat (MMS) je močan mutagen in karcinogen. Alkil sulfonate so najprej razvili kot kemosterilante za insekte in sesalčje škodljivce (Beranek, 1990). MMS so nekoč uporabljali kot topilo, insekticid in kemoterapevtski dejavnik, sedaj pa se ga zaradi njegovega močnega karcinogenega potenciala uporablja predvsem kot modelni alkilirajoči dejavnik (Doak in sod., 2007).

MMS spada med alkilirajoče snovi tipa S_{N2} (bimolecular nucleophilic substitution) (Wyatt in Pittman, 2006). Njegovi citotoksični in/ali mutageni učinki so predvsem posledica metilacije DNA, vendar lahko alkilira tudi proteine, pri katerih reagira z $-SH$ skupinami (Boffa in sod., 1987). MMS povzroči metilacijo DNA na mestih N7 metilgvanina in N3 deoksiadenina. Nastanejo velike količine N^7 -metilgvanina (N^7 -meG) in N^3 -metiladenina (N^3 -meA). Metilacije na mestih N7 sicer niso toksične in mutagene, metilacija na mestih N3 pa je letalna poškodba, ki inhibira sintezo DNA, in jo je potrebno aktivno popraviti (Lee in sod., 2007). Metilirane DNA baze se odstranjujejo z izrezovanjem poškodovanih baz, sledi cepitev na abazičnih mestih z endonukleazami, in nato sinteza DNA ter zapolnitev vrzeli z DNA ligazami (Glaab in sod., 1999). Poleg popravljalnih mehanizmov DNA MMS sproži tudi odziv na poškodbe DNA, ki temelji na aktivaciji proteina p53 s fosforilacijo. MMS povzroči aktivacijo p53 in povečano izražanje p21 (Jaiswal in Narayan, 2002).

2.3.2.2 Cisplatin (CP)

CP (*cis*-diaminodikloro platin(II) oz. *cis*-DDP) je zelo razširjen kemoterapevtik, ki se ga uporablja za zdravljenje malignih obolenj, vključno s hepatocelularnim karcinomom (Go in Adjei, 1999; Leung in sod., 1999) in je bil prvi v skupini snovi, ki delujejo na bazi platine. Je modelna učinkovina za zdravljenje raka, kar se tiče uporabe kovin v medicini. Poleg svojega analoga karboplatina (*cis*-diamino-1,1-ciklobutandikarboksilat platin(II)), je danes med najpogosteje uporabljenimi zdravili proti tumorjem (Cepeda in sod., 2007).

CP spada med bifunkcionalne alkilirajoče snovi, ki tvorijo DNA monoadukte, prečne povezave znotraj ene (ICLS; angl. interstrand cross-links) ali med dvema vijačnicama DNA ter prečne povezave med DNA in proteini (McHugh in sod., 2001).

Biokemični mehanizmi citotoksičnosti CP vključujejo vezavo substance na DNA ali na druge molekule, kar v končni fazi vodi v celično smrti z apoptozo (Cvitkovič, 1998). V intaktni DNA se najpogosteje veže na N-7 mesto gvanina in adenina. Nastanejo prečne povezave znotraj ene molekule ali med različnimi molekulami DNA. Škoda, ki nastane zaradi vezave CP na DNA (DNA-adukti, prečne povezave med verigami DNA), inhibira transkripcijo in replikacijo DNA, vodi pa lahko tudi v nastanek DSB (Wang in Lippard, 2005). Nastale poškodbe prepoznajo specifični proteini, ki sprožijo popravljalne mehanizme ali poti, ki vodijo v celično smrt z apoptozo. Genotoksičen stres aktivira signalne kaskade, kar lahko vodi v fosforilacijo in aktivacijo p53 (Pabla in sod., 2008). Zaustavitev transkripcije, ki jo z nastankom poškodb in DNA aduktov povzroči CP, sproži aktivacijo p53 po ATR-Chk2 poti (Pabla in sod., 2008).

V celici pa se le 5 – 15 % CP kovalentno veže na DNA, kar 75 – 85 % pa na druge tarčne molekule, na primer na proteine (glutation, ubikvitin, šaperoni). Vezava CP na specifične proteine vpliva na potek celičnega cikla in zavre razgradnjo proteinov, kar ima tudi lahko citotoksične posledice (povzeto po Cepeda in sod., 2007).

2.3.3 Vinca alkaloidi

Rastline so že nekaj desetletij pomemben vir potencialnih zdravil za zdravljenje raka. Iskanje zdravil proti raku pri rastlinah se je začelo pred okoli 60 leti z odkritjem vinca alkaloidov (vinblastin in vinkristin) in podofilotoksina (Bhutani in sod., 2010). Vinca alkaloidi izvirajo iz rastline *Catharanthus roseus* (druga imena: *Vinca rosea*, *Lochnera rosea*, *Ammocallis rosea*) iz družine *Apocynaceae*. Še danes imajo pomembno vlogo pri terapijah za zdravljenje raka. Delujejo na mikrotubule in ustavljajo celični cikel, ker preprečijo nastanek delitvenega vretena (Page in Hieter, 1999).

2.3.3.1 Vinblastin (VNB)

VNB spada v pomembno skupino kemoterapevtikov, ki pa ne povzročajo poškodb DNA temveč vplivajo na polimerizacijo in stabilnost mikrotubulov (Rowinsky in Donehower, 1998). Vezava na β podenoto tubulinskega dimera zavre polimerizacijo, vezava na pozitivne konce pa zavre dinamiko mikrotubulov in povzroči ustavitev celičnega cikla na prehodu G2/M ter celično smrt z apoptozo (Jordan in Wilson, 2004). Na celice deluje citostatično, saj z inhibicijo dinamike mikrotubulov zavre delovanje delitvenega vretena. Zaradi delovanja na delitveno vreteno VNB povzroči nepravilno ločevanje kromosomov in s tem aneuploidijo, zaradi česar ga prištevamo med genotoksične snovi.

2.3.4 Visokoenergijska sevanja

Del elektromagnetnega spektra z najkrajšimi valovnimi dolžinami in največjimi frekvencami zavzemajo visokoenergijska sevanja (rentgenski in gama žarki). Ta valovanja lahko zaradi velike vsebnosti energije spremenijo strukturo in funkcijo polimernih molekul. Visokoenergijska sevanja uporabljamo v medicini za radiodiagnostiko (rentgenski žarki) in pri zdravljenju rakastih obolenj (gama žarki) (Radiation exposure..., 2010).

2.3.4.1 Gama žarki

Gama žarki imajo najkrajšo valovno dolžino (0.03 do 0.003 nm) in največjo energijo v elektromagnetnem spektru. Generirajo jih radioaktivni atomi in jederne eksplozije (NASA, 2009).

Gama sevanje ima ionizirajoč učinek, kar pomeni, da žarki ob prehodu skozi tkivo tvorijo ione, zato lahko neposredno ali posredno povzročijo celično smrt ali genetske spremembe. Neposredno delovanje gama žarkov na biološko pomembne molekule (najpogosteje DNA) vpliva povzroči spremembo njihove strukture. Posredno delovanje pa je posledica interakcije žarkov z molekulami vode v celicah, kar povzroči nastanek visoko reaktivnih in nestabilnih prostih kisikovih radikalov, ki reagirajo z okoliškimi biomolekulami in tako povzročijo poškodbe celičnih molekul, vključno z DNA (Fang in sod., 2002). Ionizirajoča sevanja povzročijo poškodbe baz DNA, SSB, DSB in prečne povezave med verigami DNA. Nastnek DSB je glavni dejavnik, ki vodi v smrt celic (Olive, 2007).

2.4 CELIČNA LINIJA HepG2

Za oceno tveganja, ali lahko določena snov povzroči raka, se veliko raziskav genotoksičnosti izvaja na živalih, vendar so zaradi specifičnih razlik potrebni tudi za ljudi bolj zanesljivi testni sistemi. Zaradi tega, in za zmanjšanje števila živali uporabljenih pri testiranju snovi, so se za ugotavljanje genotoksičnosti začeli uporabljati modeli sesalčjih celičnih linij, med njimi tudi človeške celice. Eden najpogostejših človeških *in vitro* modelov je celična linija HepG2 (Wilkening in sod., 2003).

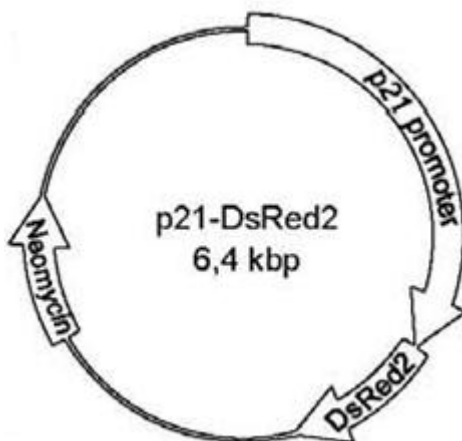
Celice človeškega hepatoma HepG2 so leta 1979 izolirali iz hepatoblastoma 11 letnega dečka (Aden in sod., 1979). Njihova morfologija je podobna epitelu in vsebujejo eno jedro z 48 do 54 kromosomi (aneuploiden kariotip). Delitveni čas celic je 20 do 28 ur (Natarajan in Darroudi, 1991).

Te celice imajo ohranjeno aktivnost mnogih encimov, ki imajo ključno vlogo pri aktivaciji oz. detoksifikaciji genotoksičnih prokarcinogenov. Dosti bolje odražajo njihov metabolizem *in vivo* kot eksperimentalni modeli z metabolno inkompetentnimi celicami, ki jim je potrebno dodajati eksogene mešanice za aktivacijo promutagenov (Knasmüller in sod., 2004).

S HepG2 lahko zaznamo delovanje različnih skupin okoljskih karcinogenov, kot so nitrozamini, mikotoksini, aromatski in heterociklični amini ter policiklični aromatski ogljikovodiki, in tudi razlikujemo med strukturno sorodnimi karcinogeni in nekarcinogeni. Zaradi tega se v zadnjem času se njihova uporaba uveljavlja predvsem v študijah genotoksičnosti. Z njihovo pomočjo lahko pri študijah mutagenih/antimutagenih učinkov zaznamo mehanizme, ki jih z mnogimi drugimi *in vitro* sistemi ne moremo (npr. indukcijo encimov za detoksifikacijo, inaktivacijo endogeno-tvorjenih metabolitov in drugo) (Knasmüller in sod., 1998).

2.4.1 Celična linija HepG2-p21-dsRED

HepG2-p21-dsRED so HepG2 celice, stabilno transfecirane z rekombinantnim vektorjem pp21-dsRED, ki ima promotor za človeški gen *p21* vezan s poročevalskim genom *dsRED*.



Slika 1: Plazmid pp21-DsRED

Za konstrukcijo plazmida pp21-DsRed so uporabili promotor *p21* ki so ga izrezali iz plazmida WWP-LUC (Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, Maryland, ZDA), vir DsRED2 pa je bil plazmid pCLEF35 DsRED2 (Invivogen), ki kodira različico *Discosoma sp.* rdečega fluorescentnega proteina (DsRED), ki se hitro razvije. Za konstrukcijo rekombinantnega vektorja s promotorjem *p21* so kot ogrodje uporabili plazmid pEGFP-N1 (Clontech), ki je sesalčni ekspresijski vektor. Vanj so vstavili fragment promotorske regije *p21* s prepoznavnim mestom za p53, na katerega so vezali zaporedje za DsRED2. Nastali plazmid so poimenovali pp21-DsRED2 (Slika 1). Del plazmida nosi tudi rezistenco na neomicin/kanamicin.

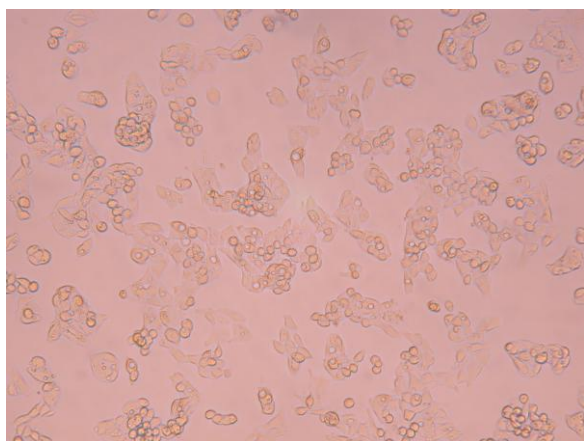
Celice HepG2 so namnožili in jih transfecirali z omenjenim rekombinantnim vektorjem s pomočjo elektroporacije. S selekcijo z antibiotikom (neomicin, kanamicin) so izbrali stabilno transfecirane kolonije. Izbrane klonove so tretirali s 50 µg/ml MMS, določili citotoksičnost z MTS testom in indukcijo DsRED normirali na gostoto celic. Izmed klonov so izbrali najbolj odzivnega in novo celično linijo poimenovali HepG2-p21-dsRED (Patentna prijava P2010000072, Urad RS za industrijsko lastnino).

3 MATERIALI IN METODE

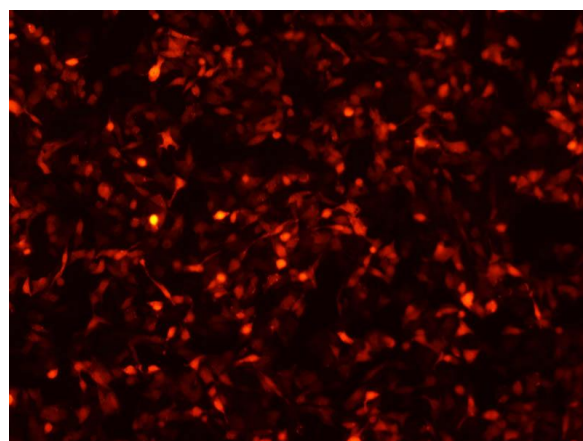
3.1 MATERIALI

3.1.1 Celična linija HepG2-p21-dsRED

Celična linija HepG2-dsRED je stabilno transfecirana s poročevalskim genom za protein DsRED, ki je operativno vezan na promotor gena *p21*, ki se odziva na poškodbe DNA. Ekscitacijski maksimum DsRED je pri 563 nm in emisijski pri 582 nm, torej v območju valovnih dolžin, ki ne sovpadajo v avtofluorescenco proteinov.



Slika 2: Nativna celična linija HepG2-p21-dsRED (foto: Žegura, 2009).



Slika 3: Celična linija HepG2-p21-dsRED z inducirano fluorescenco po 48-urni inkubaciji z MMS (40 µg/ml) (foto: Sedlar, 2010).

3.1.1.1 Gojenje celic HepG2-p21-dsRED

Celice smo gojili na plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) s površino 25 cm² (T-25) in 75 cm² (T-75) pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % CO₂. Gojišče je vsebovalo 10 % FBS, 50 mg/ml geneticin, 1 % penicilin/streptomycin, 2 mM L-glutamin, 1 % neesencialnih aminokislin in medij Minimum essential media (MEM).

Ob presajanju celic na nove plošče smo jih odlepljali s tripsinom. Pripravili smo ga tako, da smo za 1 liter raztopine 0.1 % tripsina zatehtali 1 g tripsina, 0.1 g EDTA, 8 g NaCl, 0.4 g KCl, 1 g glukozemonohidrata in 0.84 g NaHCO₃. Raztopino smo nato sterilizirali s filtriranjem skozi filter s porami velikosti 0.22 µm.

Presajanje celic

Celice smo presajali ob približno 80 % preraščenosti plošče. Iz platenke smo odstranili gojišče, površino sprali s fosfatnim pufrom ($1 \times$ PBS), ga odstranili in dodali 0.1 % tripsin za celice HepG2 (približno 1.5 ml na ploščo T-25 in 2.5 ml na ploščo T-75). Inkubirali smo v inkubatorju ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažna atmosfera) 3 do 5 minut in nato po potrebi pretresli ploščo, da so se celice dokončno odlepili iz podlage. Dodali smo svež medij s fetalnim govejim serumom (FBS) (2-kratno količino volumna dodanega tripsina), da je zavrnil delovanje tripsina. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali supernatant, celice resuspendirali v 5 ml svežega gojišča z FBS in prenesli v novo centrifugirko. Nato smo jih s pomočjo brizge 10-krat potegnili skozi injekcijsko iglo ($0,9 \times 40$ mm, Becton Dickenson, Fraga, Španija). Tako smo dobili suspenzijo bolj ali manj posameznih celic. Nasadili smo jih na ploščo in dodali ustrezno količino gojišča (5 ml za T-25 in 10 ml za T-75).

Kadar smo potrebovali suspenzijo celic z določeno gostoto, smo jih prešteli s pomočjo hemocitometra. Pripravili smo si raztopino iz $40\text{ }\mu\text{l}$ 0.4 % tripanskega modrila in $10\text{ }\mu\text{l}$ celične suspenzije. $10\text{ }\mu\text{l}$ raztopine smo nanесли v hemocitometer in prešteli celice v 4 poljih pod $40 \times$ povečavo ter izračunali gostoto celic/ml.

Celice smo uporabljali do največ 20. pasaže po odmrznitvi, saj se pri višjih pasažah spremenijo morfogenezne lastnosti celic in hkrati zmanjša encimska aktivnost.

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 1: Kemikalije uporabljene v diplomski nalogi.

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC	KAT. ŠT.
Geneticin G-418 sulfat (Geneticin G-418 sulphate)	Gibco	1811-023
Raztopina z neesencialnimi amino kislinami (MEM non-essential amino-acid solution 100×)	Sigma, St. Louis, ZDA	M7145
MEM (Minimum essential medium)	Invitrogen, VB	00167
Fetalni goveji serum FBS (Fetale bovine serum)	Euro Clone	ECS 0180L
L-glutamin (L-glutamine)	EuroClone	ECD 3000D
Raztopina s penicilinom in streptomocina (Penicilin-streptomycin solution 100×)	Euro Clone	ECB 3001D
Fosfatna fiziološka raztopina PBS (Dulbecco's PBS (10×) without Ca and Mg)	Euro Clone	ECM 4004XL
LMP agaroz (Low melting point agarose)	Invitrogen, VB	15517-022
NMP agaroz (Ultra Pure™ Agarose)	Invitrogen, VB	16500-100
EDTA (Ethilenediaminetetraacetic acid disodium salt dyhydrate 99 + %)	Sigma, St. Louis, ZDA	E5134-500G
Tris (hydroxymethyl)-aminoethan GR for analysis buffer substance	Merck, Nemčija	1.08382.1000
Natrijev klorid NaCl (Sodium chloride)	Merck, Nemčija	1.06404.1000
Natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, Nemčija	1.06482.1000
Raztopina pufra pH 7 s fungicidom (Buffer solution pH 7.00 with fungicide)	Fluka	33646
Raztopina pufra pH 10 (Buffer solution pH 10)	Fluka	33649
Vinblastin sulfat (Vinblastine PCH)	Pharmachemie BU	08A25LB
Cisplatin (Cisplatine)	Medac, Nemčija	15663-27-1
Metil metan sulfonat (Methylmethane sulphonate)	Fluka	64294
Benzo(a)piren (Benzo(a)pyrene)	Sigma, St. Louis, ZDA	B-1760
Dimetil sulfoksid DMSO (Dimethyl sulphoxyde)	Sigma, St. Louis, ZDA	154938-1L
MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol)	Promega	G1111
Fenazin metosulfat PMS (Phenasyne methosulphate)	Fluka	6866
Tripansko modrilo (Trypan blue)	Sigma, St. Louis, ZDA	T-8154

3.2 METODE

3.2.1 Določanje citotoksičnosti – MTS test

Vpliv modelnih mutagenov na preživetje celic HepG2-p21-dsRED smo ugotavljali z MTS testom. Z njim določamo proliferacijo, citotoksičnost in viabilnost celic. To je kvantitativna kolorimetrična metoda, ki je primerna za testiranje brezbarvnih substanc, ki ne motijo absorbance oz. tistih, ki nimajo delcev, ki bi sipali svetlobo. MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) se ob prisotnosti živih celic pretvori v vodotopen formazan. To pretvorbo katalizirajo mitohondrijski dehidrogenazni encimi. Količino nastalega formazana merimo z absorbanco na 490 nm in je sorazmerna količini živih celic (povzeto po navodilih 10G-Pos05-01, MTS test, Laboratorij GEN, NIB, Ljubljana).

Postopek

a) Izpostavitev celic BaP, MMS, CP in VNB

Celice smo nasadili na črne mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami s prozornim dnom (Nunclon, 96-well). Za testiranje posamezne koncentracije mutagena smo pripravili pet paralelk. Posebej smo nasadili celice na plošče za 24- in 48-urno izpostavitev. V posamezno vdolbino smo nanесли 100 μ l celične suspenzije z gostoto 200000 celic/ml in inkubirali 24 ur (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). Nato smo celicam zamenjali gojišče s svežim (negativna kontrola) oziroma z ustrežno koncentracijo mutagena v mediju ter plošče vrnili v inkubator (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). Po 24 oziroma 48 urah smo izvedli MTS test (po meritvi fluorescence – glej točko 3.2.2). V vsako vdolbino smo dodali 20 μ l mešanice MTS in PMS (fenazin metosulfat; angl. phenazine methosulphate), ki smo jo pripravili tik pred uporabo. MTS : PMS smo zmešali v razmerju 20 : 1 (2 ml MTS + 100 μ l PMS). Po 3-urni inkubaciji (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera) smo izmerili absorbanco pri 515 nm s spektrofluorimetrom (TECAN Genios). Relativno preživetje celic smo preračunali tako, da smo delili absorbanco tretiranih celic z absorbanco kontrolnih. Poskus smo izvedli v dveh neodvisnih ponovitvah za vsak mutagen.

b) Obsevanje celic z gama žarki

Celice HepG2-p21-dsRED smo tripsinizirali in resuspendirali v mediju, prešteli in nanесли 2 ml celične suspenzije z ustrežno gostoto celic na petrijevke (Petri dishes; Costar, Beovendorf, The Netherlands) ter jih obsevali z izbranimi dozami gama žarkov (Darpac, Gulmay Medical Ltd, VB; 220 kV in 10mA; filtra 0.55 mm Cu in 1.80 Al). Po obsevanju smo celice v suspenziji z gostoto 20000 celic/ml nanесли na mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami s prozornim dnom (Corning Costar, Acton, ZDA, 96-well), po 100 μ l v posamezno vdolbino, in inkubirali 24 oziroma 48 ur (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). V vsako vdolbino smo dodali po 20 μ l mešanice MTS in PMS ter izmerili absorbanco pri 492 nm s spektrofluorimetrom (Anthos micro plate reader, Labtec HT2).

Tretiranje oziroma obsevanje celic:

BaP [μ M]: 0 (kontrola topila – medij z DMSO), 0.1, 1, 5, 20

CP [μ g/ml]: 0, 0.145, 0.825, 1.65, 3.3, 6.6

VNB [μ g/ml]: 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5

MMS [μ g/ml]: 0, 5, 10, 20, 40, 50

Gama obsevanje [Gy]: 0, 0.5, 1, 2, 4, 6

Pri statistični obdelavi smo uporabili Studentov t-test. $p < 0.05$ smo določili za statistično značilno razliko skupin celic tretiranih z določenim mutagenom v primerjavi s kontrolno skupino celic.

3.2.2 Določanje izražanja poročevalskega proteina DsRED s spektrofluorimetrom

Postopek

a) Izpostavitev celic BaP, MMS, CP in VNB

Po 24 oziroma 48 urah inkubacije celic HepG2-p21-dsRED z mutageni smo s spektrofluorimetrom (TECAN Genios) izmerili fluorescenco (ekscitacijska valovna dolžina – 535 nm, emisijska valovna dolžina – 595 nm, gain 50, integracijski čas – 40 μ s). Indukcijo fluorescence (IF) DsRED smo normirali na preživetje celic, tako da smo meritve fluorescence DsRED delili s podatki o MTS absorbanci, izmerjeni pri istih populacijah celic. Poskus smo ponovili v dveh neodvisnih ponovitvah za vsak mutagen.

b) Obsevanje celic z gama žarki

Po obsevanju smo celice nasadili na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami s prozornim dnom (Corning Costar, Acton, ZDA, 96-well), po 100 ml celične suspenzije z gostoto 50000 celic/ml v posamezno vdolbino, in inkubirali 24 oziroma 48 ur (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera) ter nato s spektrofotometrom (Tecan Infinite 200) izmerili fluorescenco (ekscitacijska valovna dolžina – 535 nm, emisijska valovna dolžina – 590 nm, gain 100). IF DsRED smo normirali na preživetje celic, tako da smo meritve fluorescence DsRED delili s podatki o MTS absorbanca.

Tretiranje oziroma obsevanje celic:

BaP [μM]: k (kontrola medija), 0 (kontrola topila – medij z DMSO), 0.1, 1, 5, 20

CP [μg/ml]: 0, 0.145, 0.825, 1.65, 3.3, 6.6

VNB [μg/ml]: 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5

MMS [μg/ml]: 0, 5, 10, 20, 40, 50

Gama obsevanje [Gy]: 0, 0.5, 1, 2, 6

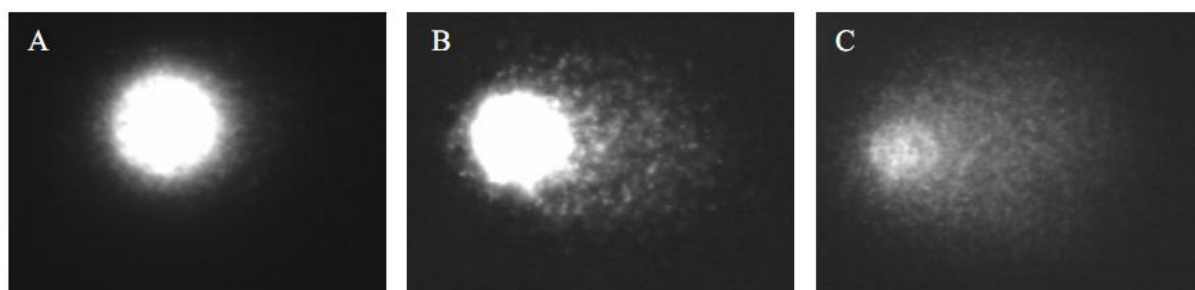
Pri statistični obdelavi smo uporabili Studentov t-test. $p < 0.05$ smo določili za statistično značilno razliko indukcije DsRED normirane na preživetje skupin celic tretiranih z določenim mutagenom v primerjavi s kontrolno skupino celic.

3.2.3 Določanje genotoksičnosti – test komet

3.2.3.1 Test komet

Test komet imenujemo tudi gelska elektroforeza posamezne celice (SCGE – single cell gel electrophoresis). Leta 1984 sta jo razvila Östling in Johanson za opazovanje poškodb DNA (Östling in Johanson, 1984). Celice, obsevane z X-žarki, sta lizirala v agaroznem gelu in izpostavila elektroforezi pri nevtralnem pH. DNA s povečano frekvenco DSB je dlje potovala proti anodi. DNA sta obarvala z etidijevim bromidom in izmerila fluorescenco s fotometrom mikroskopa. Glede na jakost fluorescence sta določila količino DNA na dveh določenih mestih znotraj migrirajočega vzorca. Leta 1988 so Singh in sod. modificirali metodo tako, da elektroforeza poteka pri bazičnih pogojih ($\text{pH} > 13$). To poleg zaznavanja DSB omogoča tudi zaznavanje enoverižnih prelomov DNA (angl. SSB; single-strand breaks) in alkalno labilnih mest (angl. ALB; alkali-labile sites). Dve leti kasneje (1990) so Olive in sod. opisali različico testa z elektroforezo pri $\text{pH} \sim 12.3$, pri kateri se ALS izrazijo, SSB pa ne.

Med elektroforezo DNA zaradi svojega negativnega naboja migrira proti pozitivni elektrodi. Nepoškodovana jedra ostanejo okrogla in potujejo počasneje kot odvitni deli. Po elektroforezi oblika jeder spominja na komete, po čemer je metoda tudi dobila ime. Z analizo slik posameznih jeder oz. kometov ovrednotimo poškodbe DNA.



Slika 4: Fotografije jeder celic HepG2, ki prikazujejo poškodovano DNA (foto: Žegura, 2009).

Več kot je poškodb DNA, več DNA je v repu kometa; A: Malo poškodb DNA, rep je skoraj neopazen; B: Bolj poškodovana DNA, rep je že bolj opazen; C: Najbolj poškodovana DNA, skoraj vsa DNA je migrirala v rep kometa.

S testom komet lahko določimo prelome SSB ali DSB, ki jih povzročajo mutageni (npr. gama žarki, H_2O_2) neposredno, ALS, ki jih nekateri genotoksični dejavniki tvorijo na DNA in prelome DNA, ki nastanejo kot vmesna stopnja v procesu baznega (BER) ali nukleotidnega (NER) izrezovalnega popravljanja poškodb DNA. Večina genotoksičnih snovi povzroči SSB

ali ALS. Alkalna različica testa komet je najprimernejša izbira za določanje genotoksičnega delovanja snovi, saj se pri $\text{pH} > 12.6$ ALS izrazijo kot SSB (Tice in sod., 2000), kar omogoča večjo občutljivost te metode.

Test komet ima kar nekaj prednosti v primerjavi z drugimi testi genotoksičnosti. Dokazano je, da je bolj občutljiv za zaznavanje šibkih poškodb DNA, ne zahteva velikega števila celic v vzorcu, je cenovno ugoden in omogoča enostavno uporabo. Za izvajanje raziskav je potrebna relativno majhna količina testne substance, poskusi pa se lahko opravijo v precej kratkem času (nekaj dni) (Tice in sod., 2000).

Pri tem testu ni potrebna predhodna delitev celic, tako kot pri drugih testih, s katerimi določamo genotoksičnost – izmenjava sestrskih kromatid, kromosomske aberacije, povišanje števila mikronukleusov) in zato lahko v testu uporabljamo tudi primarne celične linije (Pool-Zobel in Leucht, 1997).

Test komet se lahko uporablja v *in vitro* in *in vivo* raziskavah: v genetski toksikologiji, kot potencialno hiter presejalni test, v mehanističnih študijah, za razlikovanje med poškodbami kromosomov nastalih zaradi citotoksičnosti ali genotoksičnosti, ter v mehanističnih *in vivo* študijah za razlikovanje med genotoksičnimi in negenotoksičnimi karcinogeni (Tice in sod., 2000). Uporablja se ga v okoljskem monitoringu in monitoringu pri ljudeh in pri molekularni epidemiologiji.

3.2.3.2 Izpostavitve celic modelnim mutagenom

Celice HepG2-p21-dsRED smo nasadili na plošče z 12 vdolbinami s posebej obdelanim dnom za pritrjanje celic (Costar, 12-well). 24 ur po nasaditvi smo jih izpostavili delovanju različnih koncentracij mutagenov. Po 24 urah smo jih odlepili ter izvedli test komet.

Celice smo tretirali z BaP, MMS, CP in VNB. Na vsaki plošči smo nastavili še kontrolo, kjer smo celicam 24 ur po nasaditvi zamenjali gojišče s svežim. Pri tretiranjih z MMS, VNB in CP smo za pozitivno kontrolo celice izpostavili $20 \mu\text{M}$ BaP. Pri tretiranju z BaP smo nastavili še kontrolo topila (0.2 % dimetil sulfoksid – DMSO). Količino topila smo uravnali, da je bila njegova koncentracija enaka kot pri testni substanci (BaP) (0.2 % DMSO). Po 24 urah smo

zamenjali gojišče s svežim gojiščem z 0.2 % DMSO. Tako smo preverili, ali lahko morda že samo topilo povzroči poškodbe DNA.

S testom komet smo ugotavljali tudi vpliv obsevanja z gama žarki na poškodbe DNA. Celice v suspenziji z gostoto 80.000 celic/ml smo obsevali z različnimi dozami (0.5, 1, 2, 4 in 6 Gy) in takoj izvedli test komet.

3.2.3.3 Priprava raztopin in reagentov za test komet

Raztopina za liziranje celic:

2.5 M NaCl	146.4 g/l H ₂ O
100 mM EDTA-Na ₂	37.2 g/l H ₂ O
100 mM Tris	1.2 l g/l H ₂ O

Z NaOH oz. HCl smo umerili pH raztopine na 10 in jo shranili v hladilniku. Pred uporabo smo dodali detergent (1 % Triton-X 100).

Pufer za elektroforezo:

Pripravili smo si 1250 ml raztopine.

Za 1 liter potrebujemo:

965 ml bidH₂O
30 ml 10 M NaOH
5 ml 0.2 M EDTA

Pufer za nevtralizacijo:

0.4 M Tris: 48.44 g/l H₂O

Z NaOH oz. HCl smo umerili pH raztopine na 7.5 in jo do uporabe shranili v hladilniku.

3.2.3.4 Potek testa komet

1. Priprava celic

Za test komet smo nasadili celice na plošče z 12 vdolbinami, z gostoto 50.000 celic/vdolbino. Po 24-urni inkubaciji (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera) smo jih tretirali z ustrežno koncentracijo določenega mutagena in vrnili v inkubator. Po 24 urah smo celice sprali z 1 × PBS in poželi (0.1 % tripsin za HepG2, po 200 µl na vdolbino). Ko so se celice odlepile smo dodali po 800 µl medija na vdolbino in prenesli celično suspenzijo v epice. Centrifugirali smo 5 minut pri 800 obratov/minuto in približno 60 µl resuspendiranega peleta nato razdelili v dve epici po 30 µl.

2. Priprava stekelc in nanos celične suspenzije

Uporabljali smo objektna stekelca, peskana po celi površini (Surgipath, UK). Shranjevali smo jih v metanolu, da so se razmastila. Pred uporabo smo jih vzeli iz metanola in obžgali. Na stekelca smo najprej nanесли prvo plast, 1 % NMP (normalna točka tališča; angl. normal melting point) agarozo. Pripravili smo jo v 1 × PBS. Agarozo smo raztopili in dali na mešalnik s segrevanjem. Na stekelca smo na peskano stran nanесли dvakrat po 80 µl agaroze, takoj prekrili s krovnicama in jih dali v hladilnik za 5 minut, da se je agaroz strdila. Nato smo segreli 1 % agarozo LMP (nizka točka tališča; angl. low melting point), ki smo jo prav tako pripravili v 1 × PBS, in jo dali na magnetno mešalo. Drugo plast agaroze, v katero smo primešali celice, smo nanašali na vsako stekelce posebej. Previdno smo odstranili krovni stekelci. V epico s 30 µl celične suspenzije tretiranih celic smo dodali 70 µl agaroze LMP, pomešali in 70 µl agaroze s celično suspenzijo nanесли na objektno stekelce na prvo plast agaroze (1 % NMP) ter prekrili s krovnikom. Za 5 minut smo postavili v hladilnik, da se je agaroz strdila. Objektna stekelca smo vzeli iz hladilnika in previdno odstranili krovna stekelca.

3. Liziranje celic

Od začetka lize naprej smo poskus izvajali v temi v hladni sobi (da smo preprečili nadaljne poškodbe DNA). V kadičko smo nalili pufer za liziranje celic. Objektna stekelca, ki smo jim odstranili krovnike, smo položili v pufer za liziranje in inkubirali v hladilniku najmanj 60 minut. Pufer za lizo celic je imel pH vrednost 10 in je vseboval detergente. Visok pH razgradi proteine in RNA, detergenti pa povzročijo razpad celičnih membran.

4. Odvijanje DNA ali alkalna denturacija

Po končani fazi liziranja smo preparate predstavili v kadičko za elektroforezo. Prazna mesta smo po potrebi zapolnili s praznimi objektnimi stekelci, s čimer smo zagotovili homogenost električnega polja. Kadičko smo postavili v hladilnik in dolili sveže pripravljen in ohlajen pufer za elektroforezo (pH 13). Prekrili smo s pokrovom ter inkubirali v hladilniku 20 minut. V tem času se DNA začne odvijati na mestih prelomov verig.

5. Elektroforeza

Elektroforeza je potekala 20 minut v hladilniku pri napetosti 0.5 – 1.0 V/cm (nastavili smo vrednost električnega polja: napetost 25 V, tok 300 mA).

6. Nevtralizacija

V kadičko smo nalili ohlajen pufer za nevtralizacijo (pH 7.5) in vanjo položili objektna stekelca. Nevtralizacija je potekala 15 minut.

7. Shranjevanje stekelc

Stekelca smo položili v kadičko na navlaženo papirnato brisačo, s čimer smo preprečili izsušitev preparatov. Kadičko smo pokrili z alufolijo in jo do analize kometov shranili v hladilniku.

8. Barvanje

Jedra celic smo obarvali tako, da smo nanесли po 20 μ l etidijevega bromida s koncentracijo 5 μ g/ml na posamezen gel in ga prekrili s krovnim stekelcem.

9. Slikanje jeder celic

Slike jeder celic smo opazovalil pod mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) tako, da smo jih osvetlili z zeleno fluorescenčno svetlobo (Nikon HB-10104AF, Japonska) pri 400 \times povečavi (objektiv: 40 \times povečava). Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515 – 560 nm, barierni pa 590 nm. Jedra smo zajemali s kamero (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies, UK), slike prenesli na računalnik in jih shranili s pomočjo računalniškega programa Comet Assay (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK). Zajeli smo slike 50 jeder celic pri vsaki koncentraciji preiskovane snovi.

10. Analiza slik in obdelava podatkov

Vsako jedro posebej smo analizirali s pomočjo programa Comet Assay IV, ki lahko meri več parametrov. Za prikaz stopnje poškodovanosti jedra celice se najpogosteje uporabljajo: dolžina repa, odstotek DNA v repu kometa in moment repa, najpogosteje Olivin moment in razširjen moment repa (angl. extended tail moment). Mi smo izbrali parameter odstotek DNA v repu kometa.

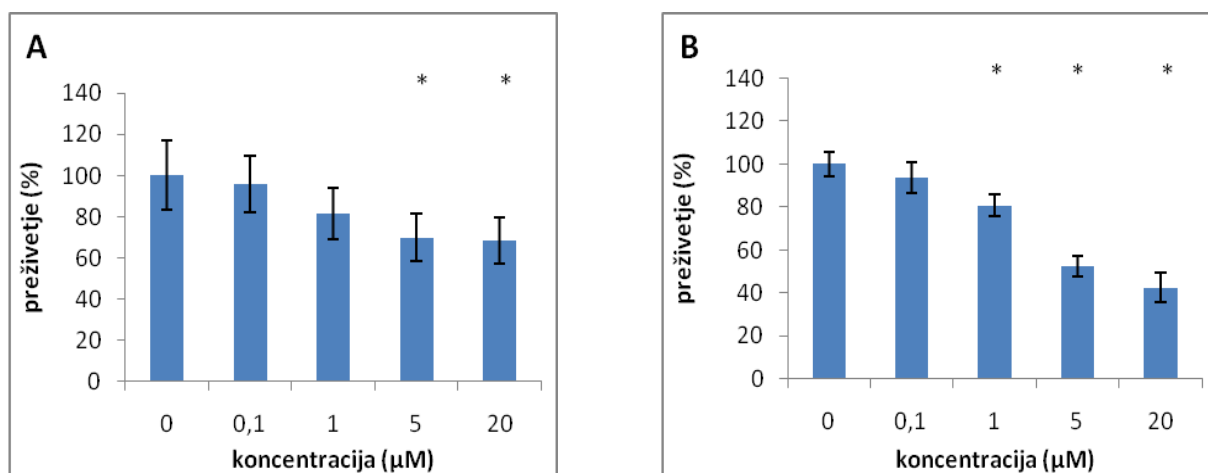
Podatke smo statistično obdelali s programom GraphPadPrism 5. Za analizo razlik med celicami tretiranimi z mutageni in kontrolnimi celicami smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo vrednosti median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnet, pri čemer smo $p < 0.05$ določili kot statistično značilno razliko.

4 REZULTATI

4.1 CITOTOKSIČNOST MODELNIH MUTAGENOV – MTS TEST

Citotoksičnost izbranih modelnih mutagenov smo določali z MTS testom, s katerim merimo pretvorbo MTS v formazanski produkt, z mitohondrijskimi dehidrogenazami živih celic, ki sovpada s številom živih celic. Zato smo ta test uporabili tudi za določitev relativne spremembe števila živih celic med izpostavljenostjo testirani kemikaliji. Na slikah 5 – 9 so za posamezen mutagen prikazani rezultati ene izmed najmanj dveh neodvisnih ponovitev poskusa, pri katerih smo določili podoben odziv celic na delovanje tega mutagena.

4.1.1 BaP

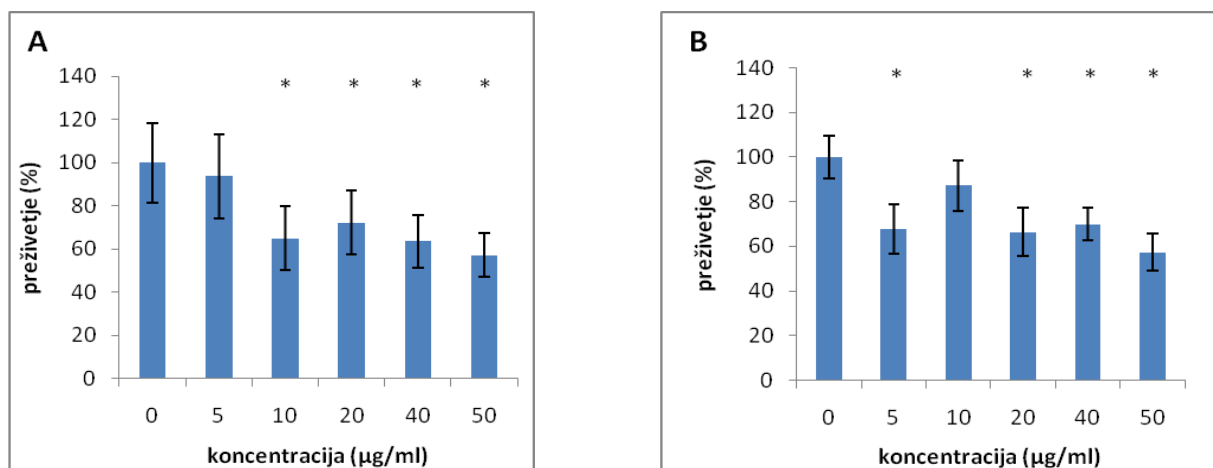


Slika 5: Vpliv različnih koncentracij BaP na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom

Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam BaP (0, 0,1, 1, 5 in 20 µM) in nato izvedli MTS test. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24-in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Z višanjem koncentracije BaP se je nižalo preživetje celic po 24- in po 48-urni inkubaciji z mutagenom. Razlike v preživetju so pri 24-urni inkubaciji z mutagenom statistično značilne pri koncentracijah 5 in 20 µM, pri 48-urni pa pri vseh koncentracijah, razen najnižji (0.1 µM). Preživetje celic se je pri najvišji koncentraciji BaP (20 µM) po 24 urah inkubacije znižalo na 69.86 %, po 48 urah pa na 42.52 % v primerjavi s kontrolo.

4.1.2 MMS

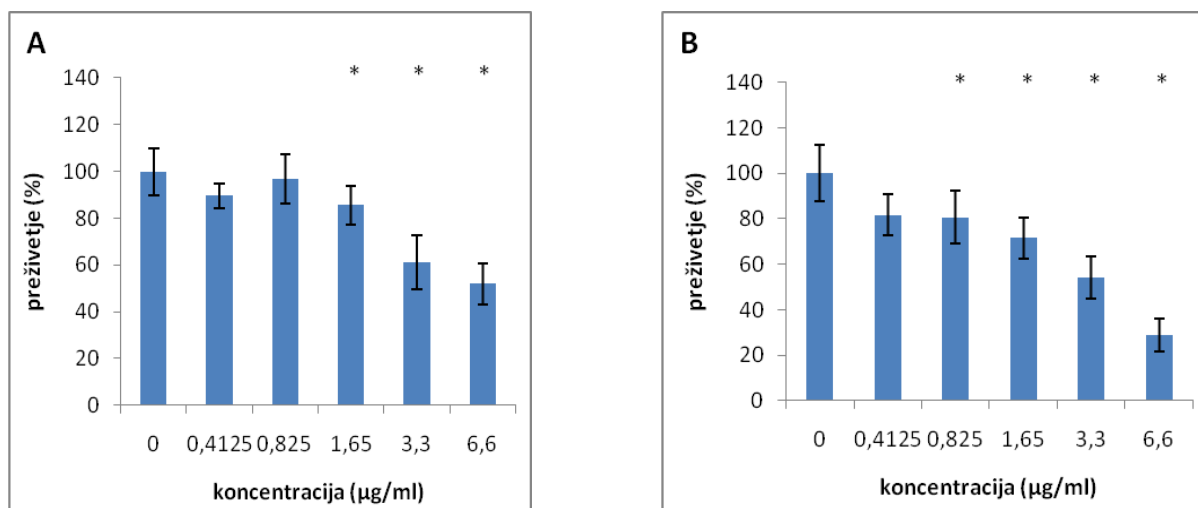


Slika 6: Vpliv različnih koncentracij MMS na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom

Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam MMS (5, 10, 20, 40 in 50 µg/ml) in nato izvedli MTS test. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24-in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Najvišje tri koncentracije (20, 40 in 50 µg/ml) so značilno znižale preživetje celic pri obeh časih inkubacije. Najvišja koncentracija MMS (50 µg/ml) je po 24 in po 48 urah znižala preživetje na približno 57 % v primerjavi s kontrolo.

4.1.3 CP

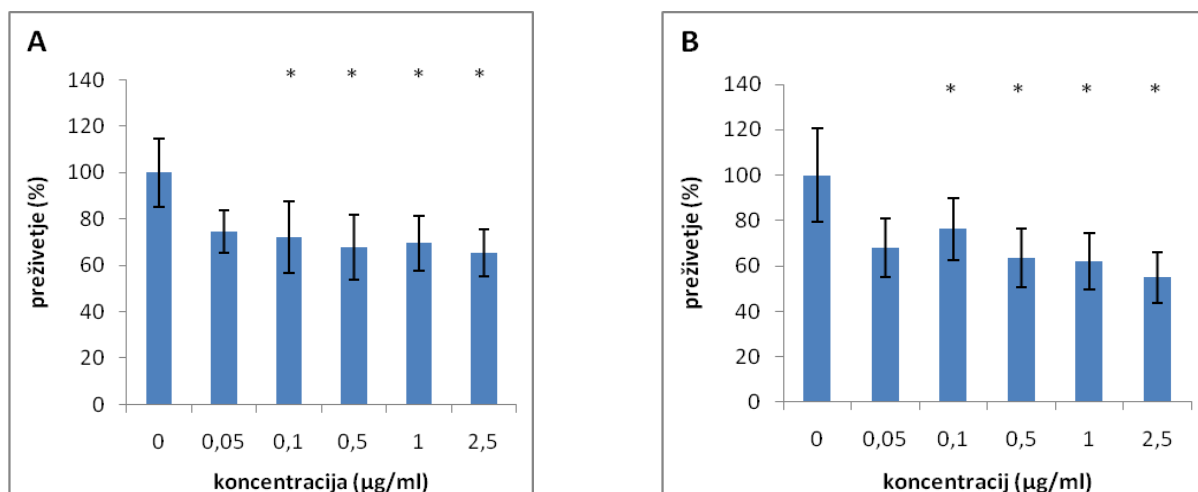


Slika 7: Vpliv različnih koncentracij CP na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom

Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam CP (0.4125, 0.825, 1.65, 3.3 in 6.6 µg/ml) in nato izvedli MTS test. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24-in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Rezultati kažejo, da CP zniža preživetje celic v odvisnosti od koncentracije. Po 24-urni inkubaciji z mutagenom se je preživetje statistično značilno znižalo pri treh najvišjih koncentracijah (1.65, 3.3 in 6.6 µg/ml), pri 6.6 µg/ml je preživelih približno 50 % celic. Po 48 urah pa se je preživetje značilno znižalo pri vseh koncentracijah CP. Pri najvišji koncentraciji (6.6 µg/ml) smo izmerili 29 % preživelih celic.

4.1.4 VNB

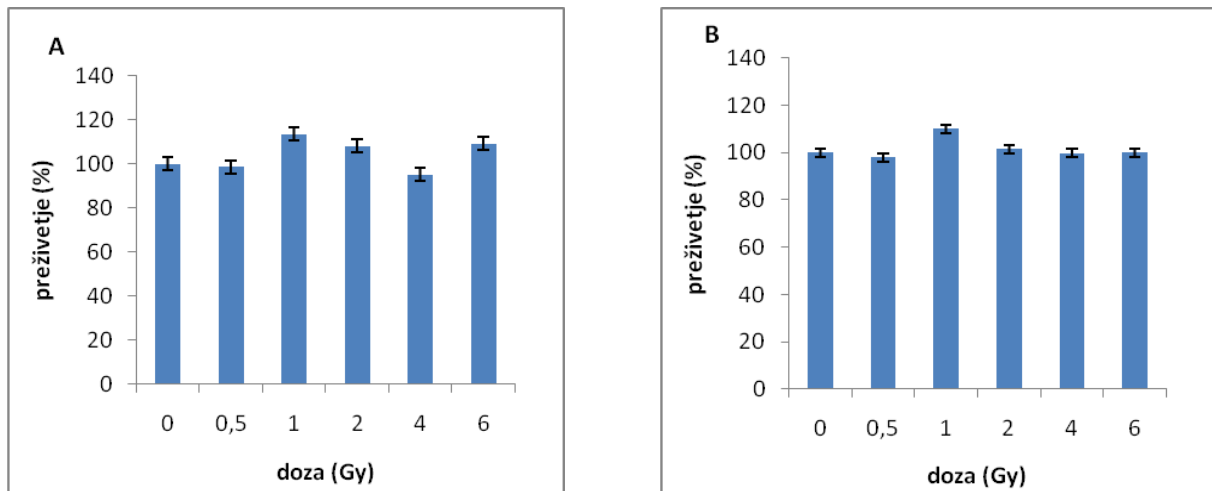


Slika 8: Vpliv različnih koncentracij VNB na preživetje celic HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom

Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam VNB (0.05, 0.1, 0.5, 1 in 2.5 µg/ml) in nato izvedli MTS test. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24-in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Že najnižja koncentracija VNB (0.05 µg/ml) je znižala preživetje na 65 % po 24 urah in na 55 % po 48 urah inkubacije z mutagenom. Znižanje preživetja celic ni odvisno od doze VBN.

4.1.5 Gama žarki



Slika 9: Vpliv različne doze gama žarkov na preživetje celic HepG2-p21-dsRED 24 (A) in 48 (B) ur po obsevanju

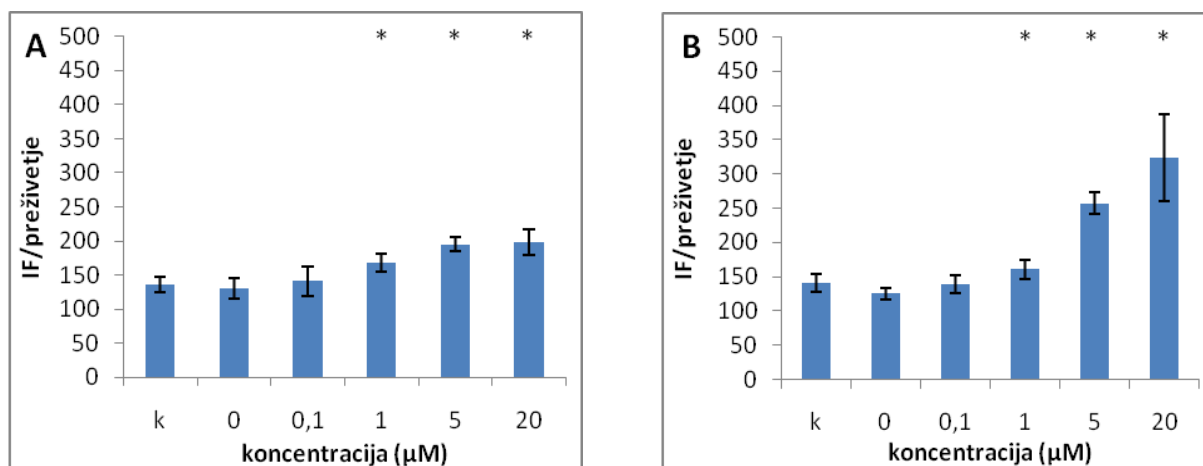
Celice smo obsevali z gama žarki, jih inkubirali 24 in 48 ur, ter nato izvedli MTS test. Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Nobena doza obsevanja z gama žarki ni vplivala na preživetje celic po 24 in po 48 urah inkubacije po obsevanju.

4.2 IZRAŽANJE POROČEVALSKEGA PROTEINA

Izražanje poročevalskega proteina DsRED smo merili 24 in 48 ur po izpostavitvi celic izbranim modelnim mutagenom. Za vsak mutagen smo izvedli najmanj dve neodvisni ponovitvi poskusa. Prikazani so rezultati ene izmed ponovitev.

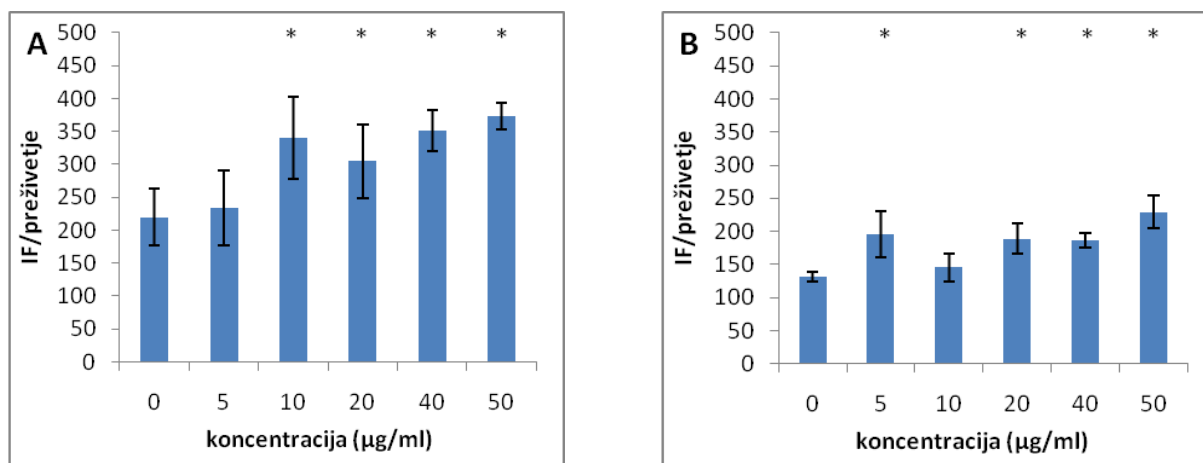
4.2.1 BaP



Slika 10: Vpliv različnih koncentracij BaP na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic
Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam BaP (k, 0, 0.1, 1, 5 in 20 µM) in nato izmerili fluorescenco s spektrofluorimetrom. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24-in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali kot IF normirano na preživetje celic. (\pm STD) * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Po tretiranju celic z BaP so rezultati pokazali od koncentracije mutagena odvisno povečanje fluorescence. Pri vseh koncentracijah, razen najnižji (0.1 µM), so statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo po obeh časih inkubacije. Po 24 urah inkubacije z 20 µM BaP je bilo razmerje med fluorescenco tretiranih celic in kontrolo 1.45, po 48 urah pa 2.30. Kontrola topila ni povzročila značilnega povečanja fluorescence.

4.2.2 MMS

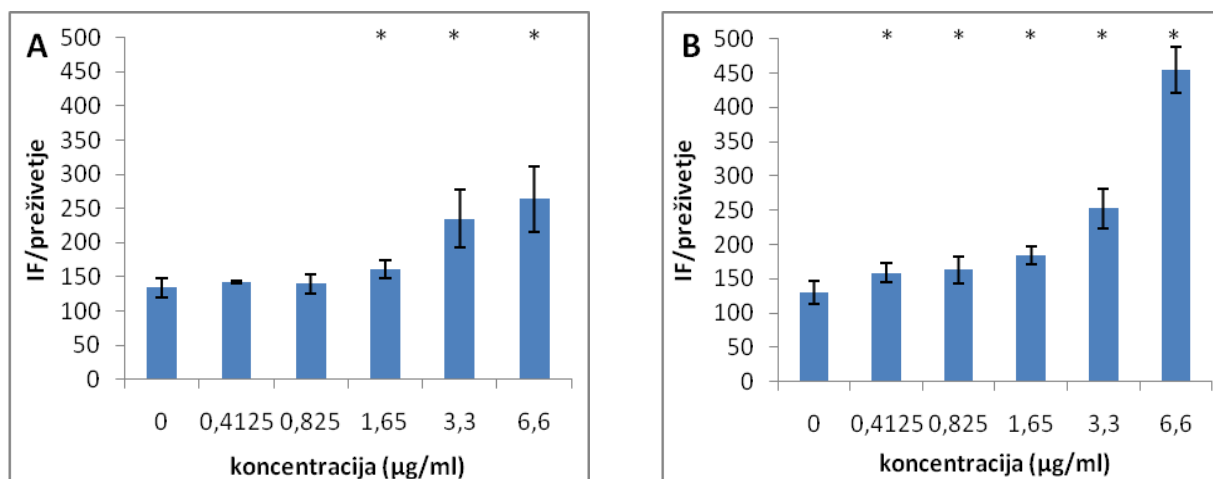


Slika 11: Vpliv različnih koncentracij MMS na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic

Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam MMS (0, 5, 10, 20, 40 in 50 µg/ml) in nato izmerili fluorescenco s spektrofluorimetrom. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24-in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali kot IF normirano na preživetje celic (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

MMS je po 24 urah inkubacije statistično značilno povečal fluorescenco pri vseh koncentracijah mutagena, razen pri 5 µg/ml, po 48 urah pa smo statistično značilno povečanje opazili tudi pri tej koncentraciji. Pri koncentraciji 50 µg/ml MMS je bilo razmerje vrednosti fluorescence normirane na preživetje izpostavljenih celic v primerjavi s kontrolo 1.69, po 48 urah pa 1.75.

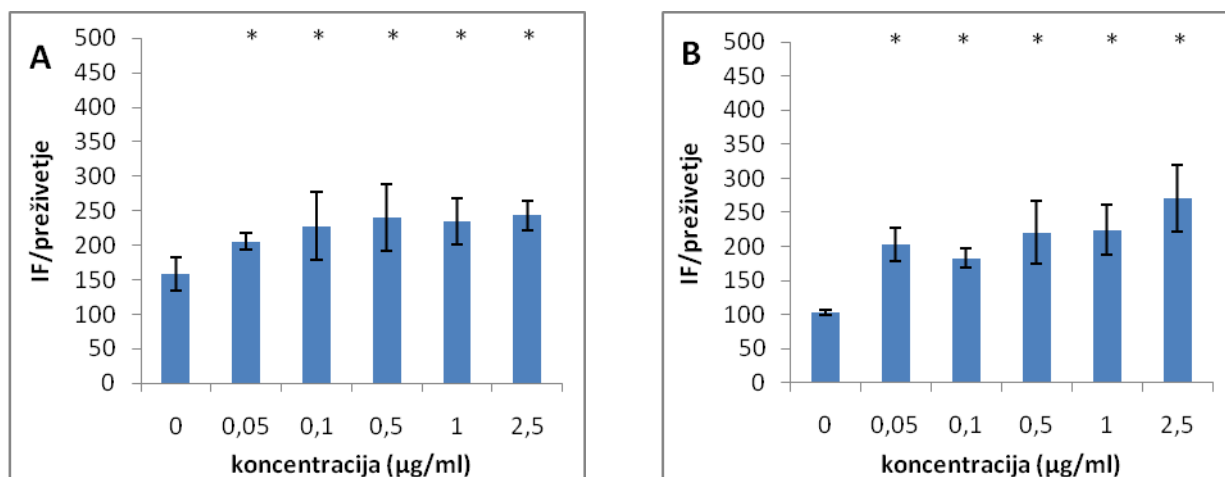
4.2.3 CP



Slika 12: Vpliv različnih koncentracij CP na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic
Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam CP (0, 0.4125, 0.825, 1.65, 3.3 in 6.6 µg/ml) in nato izmerili fluorescenco s spektrofluorimetrom. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24- in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali kot IF normirano na preživetje celic (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Iz rezultatov je razvidno povečanje fluorescence v odvisnosti od koncentracije CP. Razlike so bile statistično značilne pri vseh meritvah po 24 in 48 urah, razen po 24-urni inkubaciji z 0.825 µg/ml CP. Po inkubaciji z najvišjo koncentracijo CP (6.6 µg/ml) je bilo razmerje med vrednostmi fluorescence normiranimi na preživetje tretiranih celic in kontrolo po 24 urah 1.97, po 48 urah pa 3.50.

4.2.4 VNB

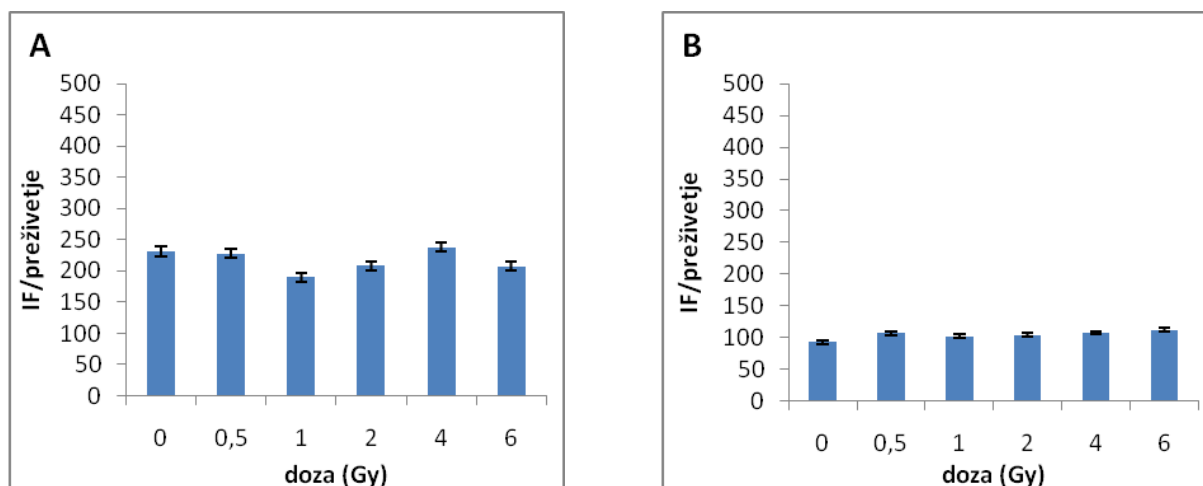


Slika 13: Vpliv različnih koncentracij VNB na izražanje poročevalskega proteina DsRED pri celicah HepG2-p21-dsRED po 24 (A) in 48 (B) urah inkubacije z mutagenom normirano na preživetje celic

Celice smo za 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam VNB (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 in 2.5 µg/ml) in nato izmerili fluorescenco s spektrofluorimetrom. Tretiranja celic smo izvedli v dveh neodvisnih poskusih po 24-in 48-urni izpostavitvi. Rezultate smo podali kot IF normirano na preživetje celic (\pm STD). * statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

Statistično značilno povečanje fluorescence normirane na preživetje celic smo izmerili pri vseh koncentracijah VNB po 24 in po 48 urah inkubacije po tretiranju. Že pri najnižji koncentraciji (0.05 µg/ml) smo izmerili razmerje med fluorescenco tretiranih celic in kontrolo 1.29 (po 24 urah) oziroma 1.98 (po 48 urah). Razmerje se z naraščanjem koncentracije VNB ni bistveno spremenilo (pri 2.5 µg/ml je bilo po 24-urah 1.53 in po 48 urah 2.63).

4.2.5 Gama žarki



Slika 14: Vpliv različnih doz gama žarkov 24 (A) in 48 (B) ur po obsevanju celic HepG2-p21-dsRED na izražanje poročevalskega proteina DsRED normirano na preživetje celic

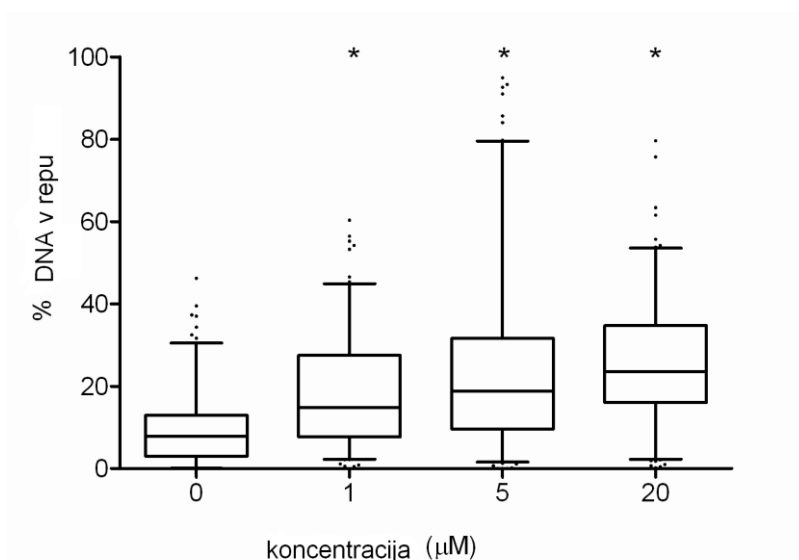
Celice smo obsevali z različnimi dozami gama žarkov (0, 0.5, 1, 2, 4 in 6 Gy), jih inkubirali 24 in 48 ur, ter nato izmerili fluorescenco s spektrofluorimetrom. Rezultate smo podali kot IF normirano na preživetje celic (\pm STD).
* statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (t-test, $p < 0.05$).

24 in 48 ur po obsevanju ni bilo značilnega povečanja fluorescence v primerjavi s kontrolo pri nobeni od doz gama žarkov.

4.3 TEST KOMET – POŠKODBE DNA

S testom komet smo preverjali genotoksično delovanje modelnih mutagenov na celice HepG2-p21-dsRED po 24-urni inkubaciji z mutageni. Testirali smo koncentracije kemikalij, kjer je bilo preživetje večje od 70 % v primerjavi s kontrolo, razen pri VNB, ki deluje citostatično in preprečuje delitev celic. V primeru VNB smo testirali genotoksično delovanje pri koncentraciji 2.5 $\mu\text{g/ml}$, kjer smo izmerili 65.24 % preživetje celic v primerjavi s kontrolo.

4.3.1 BaP

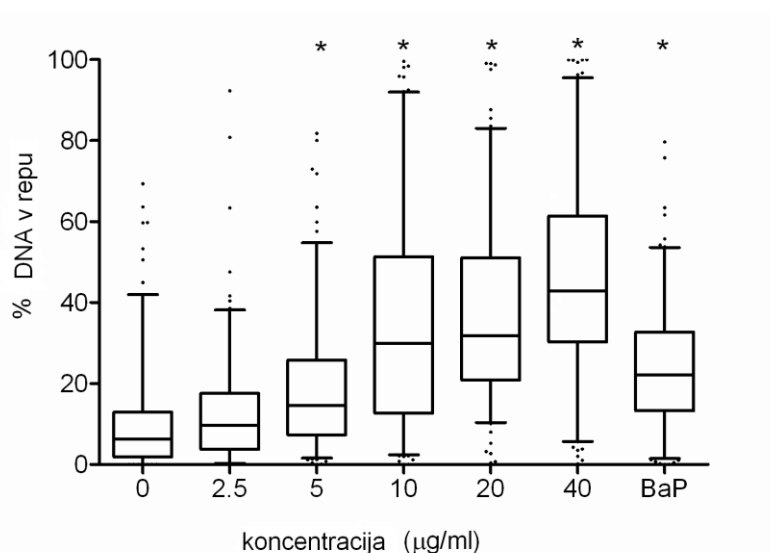


Slika 15: Vpliv različnih koncentracij BaP na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED

Celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam BaP (0, 1, 5 in 20 μM) ter nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat in pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilno povečanje v primerjavi s kontrolo (test Dunnet, $p < 0.05$).

Iz rezultatov je razvidno, da so vse koncentracije BaP statistično značilno vplivale na nastanek poškodb DNA. Odstotek DNA v repu se je večal z naraščanjem koncentracije BaP. Že pri najnižji testirani koncentraciji (1 μM) se je število poškodb v primerjavi s kontrolo povečalo, pri najvišji koncentraciji (20 μM) pa je bilo število prelomov približno trikrat večje kot pri netretiranih celicah.

4.3.2 MMS

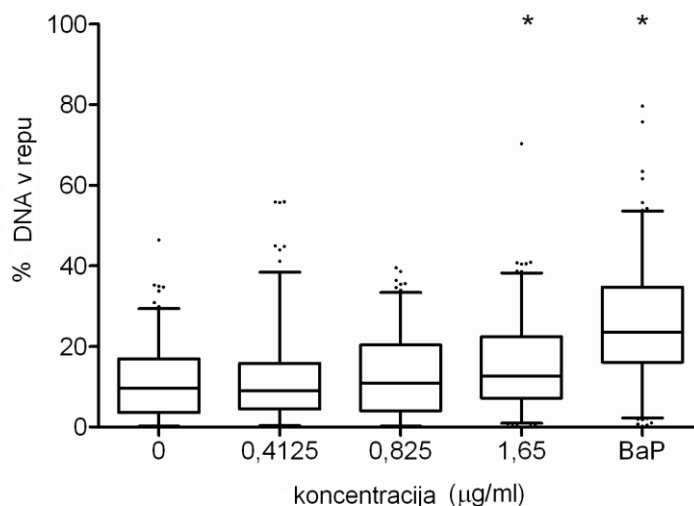


Slika 16: Vpliv različnih koncentracij MMS na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED

Celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam MMS (0, 2.5, 5, 10, 20 in 40 µg/ml) ter nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat in pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. Prikazani so tudi rezultati pozitivne kontrole (20 µM BaP). * statistično značilno povečanje v primerjavi s kontrolo (test Dunnet, $p < 0.05$).

MMS je povzročil od doze odvisno povečanje poškodb DNA, ki je bilo statistično značilno pri vseh koncentracijah višjih od 2.5 µg/ml. Pri koncentraciji 5 µg/ml je bilo število prelomov približno dvakrat, pri 10 in 20 µg/ml približno petkrat ter pri 40 µg/ml skoraj šestkrat večje v primerjavi s kontrolo.

4.3.3 CP

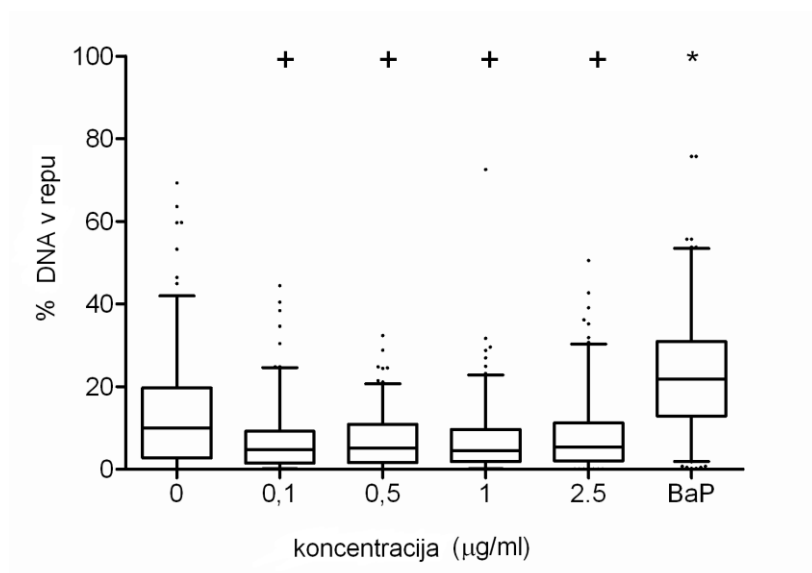


Slika 17: Vpliv različnih koncentracij CP na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED

Celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam CP (0, 0.4125, 0.825 in 1.65 µg/ml) ter nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat in pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. Prikazani so tudi rezultati pozitivne kontrole (20 µM BaP). * statistično značilno povečanje v primerjavi s kontrolo (test Dunnet, $p < 0.05$).

V primeru CP smo le pri najvišji testirani koncentraciji (1.65 µg/ml) opazili rahlo povečanje količine prelomov DNA, ki pa je bilo statistično značilno.

4.3.4 VNB

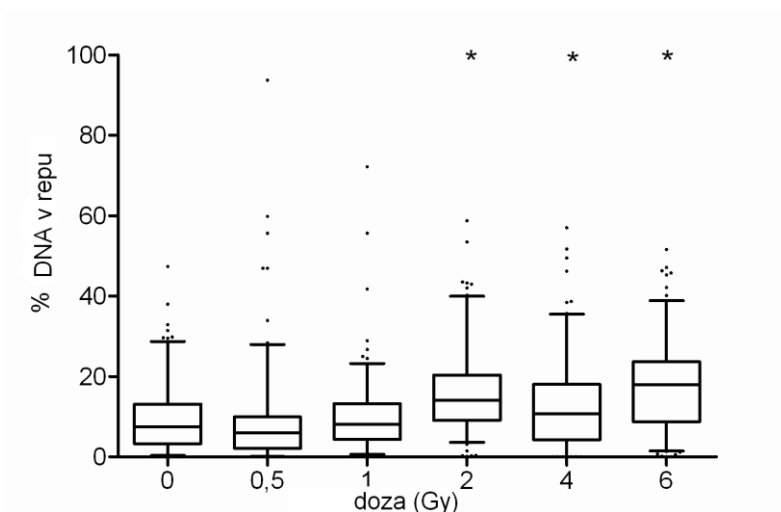


Slika 18: Vpliv različnih koncentracij VNB na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED

Celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam VNB (0, 0.1, 0.5, 1 in 2.5 µg/ml) ter nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat in pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. Prikazani so tudi rezultate pozitivne kontrole (20 µM BaP). * statistično značilno povečanje v primerjavi s kontrolo (test Dunnet, $p < 0.05$); + statistično značilno zmanjšanje v primerjavi s kontrolo (test Dunnet, $p < 0.05$).

VNB ni pozročil povečanja poškodb DNA v primerjavi s kontrolo. Pri vseh koncentracijah VNB so rezultati pokazali celo statistično značilno zmanjšanje odstotka DNA v repu.

4.3.5 Gama žarki



Slika 19: Vpliv različne doze gama žarkov na nastanek poškodb DNA pri celicah HepG2-p21-dsRED

Celice smo obsevali z gama žarki (0, 0.5, 1, 2, 4 in 6 Gy) ter nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat in pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilno povečanje v primerjavi s kontrolo (test Dunnet, $p < 0.05$).

Iz rezultatov je opazen trend povečanja količine poškodb DNA z večanjem doze gama žarkov, vendar so statistično značilne razlike le pri najvišjih dozah (2, 4 in 6 Gy). Pri najvišji dozi obsevanja (6 Gy) je bilo število prelomov približno dvakrat večje kot pri kontroli.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo preverjali učinkovitost novega sistema za zaznavanje genotoksičnosti, ki temelji na izražanju poročevalskega proteina DsRED, vnešenega v celično linijo HepG2. Zanimalo nas je, ali bi bila ta linija primerna za hitro presejalno testiranje genotoksičnosti različnih kemikalij. Za testiranje smo izbrali mutagene snovi z različnimi načini delovanja. Eden glavnih ciljev v razvoju testov genotoksičnosti je namreč zaznati čim širši spekter genotoksičnih snovi, ki delujejo preko različnih mehanizmov, in tako podati čimbolj natančno in široko oceno tveganja za človeka (Elespuru in sod., 2009).

5.1.1 Citotoksičnost modelnih mutagenov

Citotoksičen učinek dejavnikov vključuje njihov kvaren vpliv na fiziologijo, delovanje in zgradbo celic ter lahko vodi v zaustavitev rasti in delitve celic ali v celično smrt. Kvaren vpliv dejavnikov na genetski material celice, ki ima pogosto mutagene in karcinogene posledice, pa opisujemo kot genotoksičnost.

Testiranje genotoksičnosti kemikalij se praviloma izvaja pri koncentracijah, ki niso citotoksične za testne celice, ker so lahko rezultati meritev genotoksičnosti pri citotoksičnih koncentracijah zavajajoči (Henderson in sod., 1998). Citotoksičnost mutagenov je potrebno preučiti zaradi dveh razlogov. Prvi je, da je pri testiranju genotoksičnosti na osnovi sprememb izražanja poročevalskega proteina DsRED potrebno meritve fluorescence normirati na število živih celic po končani izpostavitvi. Pri testiranjih, kjer se meritve fluorescence izvajajo na mikrotitrskih ploščah z zelo različnim številom živih celic pri kontrolah v primerjavi s tretiranimi, je možna napaka optičnih meritev zaradi sprememb odbojnosti in absorbance ozadja plošče. V primerih, ko je preživetje celic zelo zmanjšano, lahko dobimo napačne rezultate izračuna fluorescence DsRED normirane na preživetje tudi zaradi akumulacije fluorescentnega proteina, ki ima razpolovni čas med 24 in 48 ur. Drugi razlog pa so različni načini citotoksičnega delovanja. Obsežne celične poškodbe lahko privedejo do nespecifičnih poškodb DNA (npr. zaradi delovanja endonukleaz), ki inducirajo p21, vendar pa nimajo genetskih posledic, če celica umira ali je že mrtva. Zaradi tega za določanje genotoksičnosti

kot verodostojne upoštevamo le meritve DsRED pri katerih se preživetje celic ni zmanjšalo na manj kot 70 %.

Rezultati merjenja citotoksičnosti BaP so v naši raziskavi pokazali značilno znižanje preživetja po 24 urah inkubacije pri koncentracijah 5 in 20 μM , po 48 urah pa tudi pri 1 μM . Po 24 urah nobena koncentracija BaP ni znižala preživetja pod 70 %, po 48 urah inkubacije pa smo opazili citotoksično delovanje pri koncentracijah 5 in 20 μM . To se ne sklada z rezultati Žager in sod. (2010), ki so uporabili celično linijo p21HepG2GFP. V njihovih poskusih BaP po izpostavitvi celic mutagenu za 24 in 48 ur ni deloval citotoksično pri nobeni od testiranih koncentracij (0.5, 2, 4, 10, 20 μM). Značilno zmanjšanje preživetja (t-test, $p < 0.001$) so zaznali pri najvišjih dveh koncentracijah (10 in 20 μM) po 72 urah izpostavitve. Po 120 in 168 urah inkubacije z mutagenom pa se je pokazalo citotoksično delovanje BaP pri vseh testiranih koncentracijah (od 0.5 do 20 μM). V poskusih na HepG2ECACC celicah (Požin, 2009) BaP po 20-urni izpostavitvi ni deloval citotoksično pri nobeni koncentraciji. Statistično značilno je znižal preživetje celic pri 75 in 100 μM koncentracijah in sicer za 20 oziroma 24 %, vendar so bile testirane koncentracije višje kot pri drugih omenjenih raziskavah. Tudi Plazar in sod. (2007) po 24 urah inkubacije niso zaznali citotoksičnosti tega mutagena (koncentracije 10 – 100 μM).

Po 24-urni izpostavitvi celic MMS so bile citotoksične vse koncentracije, razen najnižje (5 $\mu\text{g/ml}$), po 48 pa tudi ta. Citotoksično delovanje MMS smo zaznali pri nižji koncentraciji kot Žager in sod. (2010) v študiji s celicami p21HepG2GFP, kjer niso opazili značilnega znižanja preživetja celic do vključno 72-urne inkubacije pri nobeni od testiranih koncentracij MMS (5, 10, 20, 40 in 50 $\mu\text{g/ml}$). Šele po daljšem času izpostavitve (več kot 120 ur) je kemikalija delovala citotoksično. Tudi Hastwell in sod. (2006), ki so uporabili test GreenScreen HC, so opazili znižanje preživetja pod 70 % šele po tretiranju celic z več kot 50 $\mu\text{g/ml}$ MMS (24-urna inkubacija).

Citotoksično delovanje snovi na bazi platine, kamor spada CP, je delno posledica nastanka prečnih povezav ali tvorbe platina-DNA aduktov (Wang in Lippard, 2005), celično smrt pa lahko povzroči tudi vezava CP na specifične proteine in druge makromolekule, čemur sledi splošna odpoved celičnih mehanizmov (povzeto po Cepeda in sod., 2007). Po 24 urah inkubacije s CP smo opazili značilno znižanje preživetja celic pri koncentraciji 1.65 $\mu\text{g/ml}$, po 48 urah pa pri vseh testiranih koncentracijah. Na manj kot 70 % sta najvišji testirani

koncentraciji (3.3 in 6.6 $\mu\text{g/ml}$) znižali preživetje že po 24 urah izpostavitve, po 48 urah pa tudi koncentracija 1.65 $\mu\text{g/ml}$. Citotoksično delovanje smo zaznali pri nižjih koncentracijah CP kot v raziskavi, ki so jo izvedli Žager in sod. (2010). V njihovi raziskavi CP po 24 urah inkubacije celic p21HepG2GFP z enakimi koncentracijami kemikalije, kot smo jih uporabili v naši raziskavi, ni znižal preživetja celic, po 48 in 72 urah pa je bilo preživetje značilno znižano le pri dveh najvišjih koncentracijah (3.3 in 6.6 $\mu\text{g/ml}$). Po daljšem času izpostavitve so citotoksično delovale vse testirane koncentracije CP.

VNB spada v skupino strupov, ki inhibirajo celično delitev, ne da bi neposredno poškodovali DNA (Owellen in sod., 1976). Iz rezultatov diplomske naloge bi lahko sklepali, da se je preživetje celic manjšalo z večanjem koncentracije VNB, vendar so razlike v preživetju med celicami tretiranimi z različnimi koncentracijami kemikalije majhne. Pri obeh časih izpostavitve so rezultati pokazali podoben učinek različnih koncentracij VNB na preživetje tretiranih celic v primerjavi s kontrolo. Poudariti je potrebno, da v tem primeru ne gre za zmanjšanje preživetja celic po inkubaciji z VNB, ampak za ustavljeno celično delitev (citostazo). Netretirane kontrolne celice so se med poskusom delile, tretirane celice pa so sicer ostale žive, vendar je bila njihova delitev zavrtta. V času meritev so bile torej pri kontroli večje vrednosti absorbance zaradi povečanega števila celic na račun normalne delitve in ne zato, ker bi VNB povzročil celično smrt. Tudi rezultati Žager in sod. (2010) so pokazali podobno zmanjšanje relativnega preživetja celic po tretiranju z VNB. Pri najvišjih koncentracijah (2.5 in 5 $\mu\text{g/ml}$) se je po 24 urah zmanjšala na 80 % in po 48 urah na 70 %. Po daljši inkubaciji so pri vseh koncentracijah VNB izmerili manj kot 60 % preživetje celic. V raziskavi, ki so jo izvedli Hastwell in sod. (2006) s testom GreenScreen HC, so zaznali citostatično delovanje VNB že pri koncentraciji 0.02 $\mu\text{g/ml}$.

Obsevanje z gama žarki ni vplivalo na preživetje celic, kar je bilo v nasprotju s pričakovanji, saj je znano, da sevanje vpliva na nastanek prelomov DNA in oksidativnih poškodb, kar vodi v celično smrt z apoptozo ali nekrozo (Mikloš in sod., 2009).

5.1.2 Izražanje poročevalskega proteina

V zadnjih letih je bilo opisanih več testov genotoksičnosti s sesalčjimi celicami, ki temeljijo na zaznavanju sprememb izražanja poročevalskih genov vezanih na gene, ki se odzivajo na poškodbe DNA (Ohno in sod., 2005; Zhang in sod., 2009; Jagger in sod., 2009; Hastwell in sod. 2006), vendar promotor gena p21 kot pokazatelj genotoksične poškodbe, do sedaj še ni bil uporabljen. Nedavno so Žager in sod. (2010) objavili rezultate raziskave občutljivosti in primernosti sistema s celicami p21HepG2GFP za hitro detekcijo genotoksičnih snovi. Celice p21HepG2GFP in celice HepG2-p21-dsRED se razlikujejo le v uporabljenem poročevalskem genu, ki pri prvih kodira za poročevalski protein EGFP, pri drugih pa za DsRED. Namen naše raziskave je bil preveriti občutljivost celične linije HepG2-p21-dsRED za zaznavanje genotoksičnih kemikalij v primerjavi s celično linijo p21HepG2GFP ter drugimi podobnimi testnimi sistemi.

Izpostavljenost BaP inducira aktivacijo proteina p53 in gene, ki jih p53 uravnava, vključno z *p21* (Wang in sod., 2003; Sadikovic in Rodenhiser, 2006). V naši raziskavi smo opazili, da se je jakost fluorescence DsRED večala z naraščanjem koncentracije BaP. Značilno povečanje fluorescence smo zaznali pri obeh časih izpostavitve pri vseh koncentracijah mutagena, razen pri 0.1 μM . Najnižja koncentracija, kjer smo zaznali genotoksično delovanje je bila 1 μM . Pri najvišjih dveh koncentracijah (5 in 20 μM) se je fluorescenca DsRED značilno povečala z daljšim časom izpostavitve. Podoben rezultat so dobili Žager in sod. (2010), ki so testirali BaP s celicami p21HepG2GFP. Značilno povečanje fluorescence poročevalskega proteina EGFP so zaznali pri koncentraciji 0.5 μM , kar je enako kot pri testiranju BaP v prisotnosti metabolne aktivacije s celicami MCF-7, ki kot poročevalski gen vsebujejo gen za luciferazo, ki je pod kontrolo p532R (Ohno in sod., 2005). Brez metabolne aktivacije so genotoksičnost BaP zaznali pri koncentraciji 1 μM (Ohno in sod., 2005). S testom GreenScreen HC so merili povečano fluorescenco poročevalca EGFP pod vplivom *GADD45a* s pomočjo pretočne citometrije. Genotoksično delovanje BaP so zaznali pri koncentraciji 4.8 μM (Jagger in sod., 2009). HepG2 celice, transfecirane z luciferazo kot poročevalskim proteinom pod kontrolo *GADD153*, so se izkazale kot izjemno občutljive za detekcijo genotoksičnosti BaP s pomočjo izražanja poročevalca, saj so jo zaznale že pri koncentraciji 10 nM (Zhang in sod., 2009).

MMS inducira fosforilacijo proteina p53 in poveča sposobnost njegove vezave na DNA, kar vpliva na izražanje p21, ki je odvisno od doze in časa izpostavljenosti MMS (Jaiswal in Narayan, 2002). Rezultati diplomske naloge so pri MMS pokazali od doze odvisno povečanje fluorescence, ki je bilo statistično značilno pri koncentraciji 10 µg/ml. To kaže na nekoliko večjo občutljivost celic HepG2-p21-dsRED od celic p21HepG2GFP, pri katerih so zaznali statistično značilno povečanje fluorescence EGFP po 24 urah izpostavljenosti koncentraciji 50 µg/ml in po 48 urah koncentraciji 20 µg/ml MMS (Žager in sod., 2010). Občutljivost celic HepG2-p21-dsRED je tudi večja od občutljivosti sistema GreenScreen HC (Hastwell in sod., 2006) in sistema z MCF-7 celicami transfeciranimi z luciferaznim poročevalcem pod kontrolo GADD153 (Ohno in sod., 2008). S prvim so značilno povečanje fluorescence proteina EGFP (pod kontrolo promotorja *GADD45a*) zaznali pri koncentraciji 25 µg/ml, z drugim pa značilno povečanje luminescence pri koncentraciji 10 µg/ml MMS.

Genotoksično delovanje CP smo s pomočjo izražanja poročevalskega proteina DsRED zaznali že pri najnižji testirani koncentraciji kemikalije (0.4125 µg/ml) po 24 urah inkubacije z mutagenom, kar se sklada z rezultati dobljenimi s celicami p21HepG2GFP (Žager in sod., 2010), kjer je CP povzročil značilno povišanje fluorescence EGFP pri vseh testiranih koncentracijah že po 24-urni izpostavitvi kemikaliji. Rezultati njihove raziskave so pokazali, da se je s časom izpostavitve večala relativna indukcija fluorescence, medtem ko smo mi značilno povišanje fluorescence po 48 urah v primerjavi s 24-urno inkubacijo opazili le pri najvišji koncentraciji (6.6 µg/ml). Tako naši poskusi, kot tudi poskusi, ki so jih izvedli Žager in sod. (2010), so pokazali od doze odvisno izražanje poročevalskega proteina. S testom GreenScreen HC so drugi raziskovalci zaznali genotoksičnost šele pri več kot dvakrat višji koncentraciji – 1 µg/ml (Hastwell in sod., 2006). Še manj občutljiv se je izkazal test z MCF-7 celicami – genotoksičnost so zaznali pri koncentraciji 10 µg/ml (Ohno in sod., 2008).

Kemikalije, ki vplivajo na delovanje delitvenega vretena, inducirajo aktivacijo p53 in ustavitev celičnega cikla, ki ga uravnava p21 (Tishler in sod., 1995), vendar podrobnosti tega procesa še niso razjasnjene (Žager in sod., 2010). Rezultati te diplomske naloge so pokazali, da je že najnižja koncentracija VNB (0.05 µg/ml) inducirala izražanje poročevalskega proteina DsRED. S testom GreenScreen HC so zaznali indukcijo GFP pri koncentraciji 0.02 µg/ml (Hastwell in sod., 2006). V raziskavi, ki so jo izvedli Žager in sod. (2010), je značilno povečala fluorescenco EGFP že najnižja testirana koncentracija VNB (0.1 µg/ml), vrednosti pa so se nato manjšale z naraščanjem koncentracije kemikalije. To je v nasprotju z našimi

rezultati, kjer se fluorescenca z naraščanjem koncentracije VNB ni bistveno spremenila. Žager in sod. (2010) so po 24 urah zaznali značilno povečanje fluorescence pri vseh koncentracijah VNB, razen pri najvišji (5 $\mu\text{g/ml}$), po 48 urah pa pri treh najnižjih (0.1, 0.5 in 1 $\mu\text{g/ml}$), medtem ko je bilo v naši raziskavi značilno povečanje fluorescence DsRED pri vseh koncentracijah po obeh časih inkubacije z mutagenom. Kljub temu da VNB sproži izražanje p21, pa se z naraščanjem koncentracije kemikalije izmerjena fluorescenca DsRED ni bistveno povečala.

Gama sevanje lahko poškoduje DNA posredno in neposredno (Fang in sod., 2002), vendar značilnega povečanja fluorescence DsRED po obsevanju nismo zaznali. V 24 oziroma 48 urah po obsevanju je morda prišlo že do aktivacije popravljalnih mehanizmov, ki se v celicah sprožijo pod vplivom ionizirajočega sevanja (Zhang in sod., 2008).

5.1.3 Test komet

Test komet je dobro uveljavljena metoda za preučevanje genotoksičnosti in velja za zelo enostavno, občutljivo, zanesljivo in cenovno ugodno tehniko merjenja poškodb DNA (Collins in sod., 1997). Zanimalo nas je v kolikšni meri se rezultati testiranja genotoksičnosti dobljeni s komet testom skladajo z rezultati dobljenimi z merjenjem izražanja poročevalskega proteina. Pri določanju genotoksičnosti BaP, MMC in CP smo uporabili koncentracije, pri katerih smo z MTS testom dokazali več kot 70 % preživetje celic v primerjavi s kontrolo. Pri VNB, ki je citostatik, pa smo testirali koncentracije do vključno 2.5 $\mu\text{g/ml}$, kjer je MTS test pokazal približno 65 % preživetje. Poškodbe smo merili po 24-urni inkubaciji z mutageni. V tem času lahko nastanejo mutageni metabolni produkti posredno delujočih snovi (BaP), ki povzročijo poškodbe DNA. Po drugi strani pa je ta čas dovolj dolg, da lahko pride do aktivacije popravljalnih mehanizmov, zaradi česar ne moremo zaznati kratkoživečih poškodb (Collins, 1998).

Že v prejšnjih raziskavah delovanja BaP so s pomočjo testa komet dokazali močan genotoksični potencial tega mutagena (Park in sod., 2006), zaradi česar se BaP pri testu komet pogosto uporablja kot substanca za pozitivno kontrolo (Knasmüller in sod., 1999). Prelomi verig DNA nastanejo med produkcijo BaP kinonov, pod vplivom prostih radikalov (kationskih radikalov BaP ali ROS), ki se generirajo med formacijo BaP kinonov v redoks reakcijah (Mitchelmore in sod., 1998) in ob aktivaciji popravljanja poškodb DNA z

izrezovanjem (Speit in Hartmann, 1995). V naši raziskavi smo zaznali statistično značilno povišanje poškodb DNA že pri 1 μM koncentraciji BaP, kar je enako kot pri zaznavanju poškodb s pomočjo izražanja poročevalskega proteina DsRED. Z večanjem koncentracije BaP se je tudi količina poškodb DNA večala, kar se sklada z rezultati Plazar in sod. (2007). V raziskavi delovanja mutagenov na HepG2 celice s pomočjo testa komet so Valentin-Severin in sod. (2003) zaznali statistično značilno povečanje poškodb (test Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) po 20-urni inkubaciji s 5 μM BaP. V raziskavi so kot parameter za oceno poškodovanosti DNA uporabili Olivin moment.

MMS povzroči nastanek enoverižnih (SSB) ali dvoverižnih (DSB) prelomov DNA na naključnih mestih v genomu. Test komet zazna tudi posredne cepitve verig DNA, ki jih povzročijo encimi, zaradi česar so pozitivni rezultati po tretiranju z MMS tudi dokaz prisotnosti popravljalnih mehanizmov v celici (Darroudi in sod., 1996). V naši raziskavi smo statistično značilno povečanje prelomov DNA smo opazili po tretiranju z 5 $\mu\text{g/ml}$ MMS, kar se sklada z rezultati raziskave Valentin-Severin (2003), kjer so opazili statistično značilno povečanje poškodb pri koncentraciji 5.5 $\mu\text{g/ml}$. Odstotek DNA se je višal z naraščanjem koncentracije MMS. Test komet se je izkazal kot bolj občutljiva metoda za zaznavanje genotoksičnosti MMS kot merjenje izražanja poročevalskega proteina DsRED, kjer smo značilno povečanje fluorescence opazili pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$.

CP tvori kovalentne vezi s purinskimi bazami v DNA, s čimer povzroči nastanek prečnih povezav (1,2- ali 1,3-) znotraj DNA, ki lahko vodijo v dvojne prelome DNA (DSB) (Wang in Lippard, 2005). Prečne povezave pa lahko, v nasprotju z drugimi poškodbami, stabilizirajo DNA in preprečijo njeno migracijo med elektroforezo (Pfuhrer in Wolf, 1996). Statistično značilno povečanje števila prelomov DNA smo s testom komet zaznali šele po tretiranju z najvišjo koncentracijo CP (1.65 $\mu\text{g/ml}$), medtem ko smo s pomočjo povečanega izražanja poročevalskega proteina DsRED poškodbe v celici zaznali že pri najnižji koncentraciji (0.4125 $\mu\text{g/ml}$). Zaradi nastanka prečnih povezav s testom komet ne moremo natančno določiti genotoksičnega delovanja CP.

Snovi kot je VNB, ki vplivajo na delovanje mikrotubulov, ne povzročijo neposrednih poškodb DNA (Tishler in sod., 1995), zato so bili rezultati testa komet v skladu s pričakovanji – nismo opazili prelomov DNA. Test komet torej ni pokazal, da bi VNB povzročil poškodbe v celici,

medtem ko smo z merjenjem izražanja poročevalskega proteina DsRED zaznali genotoksičnost VNB.

Ionizirajoče sevanje lahko povzroči ALS, SSB in DSB, prečne povezave med verigami DNA, povezave med DNA in proteini, ter poškodbe purinskih in pirimidinskih baz, oksidirane baze in abazična mesta. Gama žarki lahko vplivajo na poškodbe DNA neposredno s prelomom kemijskih vezi med atomi makromolekul, ali posredno z nastankom prostih radikalov (ROS) (Fang in sod., 2002). Zaradi širokega spektra poškodb ki jih povzročijo, je alkalna različica testa komet primerna za zaznavanje genotoksičnosti gama žarkov (povzeto po Mikloš in sod., 2009). V naši raziskavi smo zaznali od doze odvisno povečanje števila prelomov DNA, ki so bile statistično značilne različne v primerjavi s kontrolo po obsevanju z 2, 4 in 6 Gy. Rezultati se skladajo z rezultati raziskave, ki so jo izvedli Mikloš in sod. (2009), kjer so po obsevanju človeških limfocitov zaznali od doze odvisno povečanje prelomov DNA, ki je bilo statistično značilno po obsevanju s 4 Gy. S testom komet smo torej zaznali vpliv gama žarkov na poškodbe DNA takoj po obsevanju, medtem ko z merjenjem indukcije fluorescence DsRED nismo zaznali vpliva sevanja na nastanek poškodb v celici. 24 in 48 ur po obsevanju so se lahko poškodbe v veliki meri že popravile, zaradi česar nismo zaznali genotoksičnega delovanja žarkov s pomočjo izražanja DsRED, test komet pa smo izvedli takoj po obsevanju, kar nam je omogočilo zaznavo prelomov DNA še pred popravilom poškodb.

5.2 SKLEPI

Na osnovi dobljenih rezultatov smo lahko oblikovali naslednje sklepe:

- Celična linija HepG2-p21-dsRED se je iskazala kot občutljiva na citotoksično delovanje BaP, MMS, CP in VNB, medtem ko gama žarki nanjo nimajo značilnega citotoksičnega učinka.
- Pod vplivom delovanja modelnih genotoksičnih dejavnikov se v celicah HepG2-p21-dsRED statistično značilno poveča izražanje poročevalskega proteina DsRED, vezanega na promotor *p21*.
- Celična linija HepG2-p21-dsRED je primerna za ugotavljanje vpliva modelnih genotoksičnih dejavnikov na nastanek verižnih prelomov DNA s testom komet, saj smo povečanje števila verižnih prelomov zaznali pri večini testiranih dejavnikov (BaP, MMS in gama žarki).
- Celična linija HepG2-p21-dsRED ima ohranjen zapis za encime, ki so potrebni za metabolizem snovi kot je BaP, katerih metabolni produkti delujejo genotoksično, zato je primerna za preučevanje genotoksičnosti takih dejavnikov.
- Poročevalski sistem s celično linijo HepG2-p21-dsRED je primeren za ugotavljanje genotoksičnosti alkilirajočih agensov, kot je MMS.
- S pomočjo merjenja izražanja poročevalskega proteina v celični liniji HepG2-p21-dsRED zaznamo genotoksičnost snovi kot je CP, ki povzročijo prečne povezave verig DNA.
- Celična linija HepG2-p21-dsRED je primerna za zaznavanje poškodb v celicah, ki jih povzroči VNB, ki deluje na delitveno vreteno, s pomočjo merjenja izražanja poročevalskega proteina.
- Celična linija HepG2-p21-dsRED je uporabna za določanje genotoksičnosti gama žarkov s testom komet takoj po obsevanju.

- Za nekatere dejavnike je merjenje izražanja poročevalskega proteina enak ali bolj občutljiv pokazatelj genotoksičnosti kot test komet (BaP, CP in VNB), kar delno potrjuje postavljeno hipotezo.
- Celice HepG2-p21-dsRED so človeškega izvora, zato so rezultati testov primernejši za ocenjevanje tveganj za ljudi, kot sistemi s celicami, ki niso človeškega izvora.
- Testni sistem s celično linijo HepG2-p21-dsRED je enostaven in občutljiv, rezultate o genotoksičnosti preiskovane kemikalije ali vzorca pa dobimo že po 48 urah, zato je primeren za hitro presejalno testiranje genotoksičnosti.

6 POVZETEK

V okolju in prehrani je prisotnih veliko genotoksičnih dejavnikov, katerih delovanje moramo preučiti, saj predstavljajo tveganje za človekovo zdravje. Na osnovi toksikoloških podatkov, ki vključujejo tudi podatke o genotoksičnosti, lahko ocenimo, kakšno je pri izpostavljenosti tveganje za zdravje ljudi, in kakšni so njihovi potencialni vplivi na okolje. Znanih je veliko različnih testov genotoksičnosti, ki temeljijo na kulturah prokariotskih ali evkariotskih celic. Dva izmed glavnih ciljev v razvoju testnih sistemov za ugotavljanje genotoksičnosti sta vzpostavitev ustrezne ocene tveganja za človeka, za kar so najprimernejši testi na človeških celičnih linijah, in zaznavanje čim širšega spektra snovi, ki delujejo na celice na različne načine.

Kot odziv na poškodbe DNA so celice razvile kompleksne obrambne mehanizme, pri katerih pride do spremembe v izražanju genov, kar lahko služi kot pokazatelj genotoksičnosti. V diplomski nalogi smo preverjali učinkovitost novega testnega sistema za zaznavanje genotoksične aktivnosti snovi, ki je osnovan na stabilno transfecirani celični liniji HepG2-p21-dsRED, in temelji na zaznavanju produkta poročevalskega gena za rdeči fluorescentni protein DsRED vezanega na promotorsko regijo tumor supresorskega gena *p21*, ki se odzove pri poškodbah DNA. Za testiranje smo izbrali modelne mutagene z različnimi mehanizmi delovanja (BaP, pri katerem so genotoksični njegovi metabolni produkti, alkilirajoča dejavnika MMS in CP, citostatik VNB in gama žarke, kot fizikalni genotoksični dejavnik).

Za meritve citotoksičnosti in izražanja reporterskega proteina DsRED smo celice za 24 in 48 ur izpostavili mutagenom oziroma jih v primeru preučevanja vpliva gama žarkov inkubirali 24 in 48 ur po obsevanju. Citotoksičnost snovi smo merili z MTS testom, pri katerem merimo absorbanco formazana, ki nastane pod vplivom encimov metabolno aktivnih celic. Rezultate smo normirali na netretirano kontrolo, da smo dobili podatek o relativnem preživetju celic. Izražanje poročevalskega proteina DsRED pod vplivom poškodb DNA smo merili s spektrofluorimetrom. Aktivacija promotorja *p21* je vplivala na izražanje gena za poročevalski protein DsRED, kar se je odražalo v povečanju jakosti fluorescence. S testom komet smo ugotavljali, kako izbrani mutageni vplivajo na nastanek prelomov DNA po 24 urah delovanja na celice, v primeru gama žarkov pa smo merili nastanek poškodb DNA takoj po obsevanju. Uporabili smo alkalno različico testa komet, s katero zaznamo DSB, SSB in ALS.

Citotoksičnost BaP smo opazili po 48 urah delovanja pri koncentracijah 5 in 20 μM . Pod 70 % so preživetje znižale vse koncentracije MMS po obeh časih inkubacije (razen 5 $\mu\text{g/ml}$ po 24 urah). CP je deloval citotoksično po 24 urah pri koncentracijah 3.3 in 6.6 $\mu\text{g/ml}$ in po 24 urah pri koncentracijah 1.65, 3.3 in 6.6 $\mu\text{g/ml}$. Rezultati tretiranja celic z VNB so pokazali navidezno citotoksično delovanje kemikalije. Ker je VNB citostatik, je manjše število celic v primerjavi s kontrolo posledica ustavitve celičnega cikla. Obsevanje z gama žarki ni vplivalo na preživetje celic.

Z merjenjem izražanja poročevalskega proteina DsRED smo zaznali genotoksičnost BaP pri vseh koncentracijah po obeh časih izpostavitve, razen pri najnižji (0.1 μM), MMS pri vseh koncentracijah, razen pri 5 $\mu\text{g/ml}$ po 24 urah, ter CP in VNB pri vseh koncentracijah po obeh časih izpostavitve. Povečevanje poškodb v celicah je bilo v primerih BaP, MMS in CP odvisno od doze. Po tretiranju z VNB so rezultati pokazali, da je prišlo do nastanka poškodb v celici, vendar nismo zaznali povečanja števila poškodb z naraščanjem koncentracije kemikalije, kar je verjetno posledica manjšega števila celic v primerjavi s kontrolo zaradi citostatičnega delovanja VNB. Po obsevanju z gama žarki nismo zaznali značilnega povečanja fluorescence DsRED.

S testom komet smo zaznali genotoksičnost BaP pri koncentraciji 1 μM , kar je enako kot pri izražanju poročevalskega proteina DsRED. MMS je povzročil statistično značilno povečanje števila prelomov DNA pri koncentraciji 5 $\mu\text{g/ml}$, medtem ko je bilo izražanje poročevalskega proteina DsRED značilno povečano pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$. Po tretiranju s CP smo s testom komet rahel vpliv na poškodbe DNA zaznali le pri najvišji koncentraciji (1.65 $\mu\text{g/ml}$). VNB ni povzročil prelomov DNA, čeprav je merjene fluorescence poročevalskega proteina DsRED pokazalo genotoksičnost te snovi. Gama žarki so povzročili poškodbe DNA pri dozah obsevanja 2, 4 in 6 Gy, iz česar vidimo, da so celice HepG2-p21-dsRED občutljive na njihovo delovanje.

Celična linija HepG2-p21-dsRED je primerna za zaznavanje genotoksičnosti mutagenov z različnimi mehanizmi delovanja. Ugotovili smo, da se gen za poročevalski protein DsRED izrazi pod vplivom poškodb v celici, ki jih povzročijo genotoksični mutageni. Uporabljen testni sistem s celično linijo HepG2-p21-dsRED, ki temelji na izražanju poročevalskega proteina DsRED pod vplivom poškodb DNA, je torej učinkovita metoda za hitro presejalno testiranje genotoksičnosti.

7 LITERATURA

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: 615-616.

Amanuma K., Tone S., Nagaya M., Matsumoto M., Watanabe T., Totsuka Y., Wakabayashi K., Aoki Y. 2008. Mutagenicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and benzo[a]pyrene (BaP) in the gill and hepatopancreas of rpsL transgenic zebrafish. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 656: 36-43.

Baek J.H., Han M.J., Lee S.Y., Yoo J.S. 2009. Transcriptome and proteome analyses of adaptive responses to methyl methanesulfonate in *Escherichia coli* K-12 and ada mutant strains. *BMC Microbiology*, 9: 186.

Beranek D.T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*, 231: 11-30.

Bhutani K.K., Paul A.T., Fayad W., Linder S. 2010. Apoptosis inducing activity of steroidal constituents from *Solanum xanthocarpum* and *Asparagus racemosus*. *Phytomedicine*, 17: 789-793.

Birrell L., Cahill P., Hughes C., Tate M., Walmsley R.M. 2010. GADD45a-GFP GreenScreen HC assay results for the ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of new genotoxicity tests. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695: 87-95.

Boffa L.C., Bolognesi C., Mariani M.R. 1987. Specific targets of alkylating agents in nuclear proteins of cultured hepatocytes. *Mutation Research*, 190: 119-123.

Brooks R.A., Gooderham N.J., Edwards R.J., Boobis A.R., Winton D.J. 1999. The mutagenicity of benzo[a]pyrene in mouse small intestine. *Carcinogenesis*, 20: 109-114.

Burdick A.D., Davis II J.W., Liu K.J., Hudson L.G., Shi H., Monske M.L., Burchiel S.W. 2003. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer research*, 63: 7825-7833.

Cahill P.A., Knight A.W., Billinton N., Barker M.G., Walsh L., Keenan P.O., Williams C.V., Tweats D.J., Walmsley R.M. 2004. The GreenScreen[®] genotoxicity assay: a screening validation programme. *Mutagenesis*, 19: 105-119.

Celični sistem za hitro zaznavanje in določanje genotoksičnosti. Patentna prijava P2010000072, Urad RS za industrijsko lastnino.

Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7: 3-18.

Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R. 1997. The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193.

Collins A.R. 1998. The comet assay: a novel approach to measuring DNA oxidation. V: Arouma, O.I., Halliwell, B. (Eds.), DNA and Free Radical: Techniques, Mechanisms and Applications, OICA International, St Lucia, London, 241-259.

Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261.

Compton P.J.E., Hooper K., Smith M.T. 1991. Human somatic mutation assays as biomarkers of carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 94: 135-141.

Corvi R., Albertini S., Hartung T., Hoffmann S., Maurici D., Pfuhler S., van Benthem J., Vanparys P. 2008. ECVAM retrospective validation of *in vitro* micronucleus test (MNT). *Mutagenesis*, 23: 271-283.

Cvitkovič E. 1998. A historical perspective on oxaliplatin: Rethinking the role of platinum compounds and learning from near misses. *Seminars in Oncology*, 25: 1-3.

Darroudi F., Meijers C.M., Hadjidekova V., Natarajan A.T. 1996. Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (HepG2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent *in situ* hybridization with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis*, 11: 425-433.

De Flora S. in Ferguson L.R. 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, 591: 8-15.

Doak S.H., Jenkins G.J.S., Johnson G.E., Quick E., Parry E.M., Parry J.M. 2007. Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Research*, 67: 3904-3911.

Elespuru R.K., Agarwal R., Atrachi A.H., Bigger C.A.H., Heflich R.H., Jagannath D.R., Levy D.D., Moore M.M., Ouyang Y., Robison T.W., Sotomayor R.E., Cimino M.C., Dearfield K.L. 2009. Current and future application of genetic toxicity assays: The role and value of *in vitro* mammalian assays. *Toxicological Sciences*, 109: 172-179.

Ellinger-Ziegelbauer H., Stuart B., Wahle B., Bomann W., Ahr H.J. 2004. Characteristic expression profiles induced by genotoxic carcinogens in rat liver. *Toxicological Sciences*, 77: 19-34.

Ellinger-Ziegelbauer H., Stuart B., Wahle B., Bomann 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: 61-84.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879.

Fatur T., Filipič M., Lah T.T. 2008. Postopek/navodilo: alkalni komet test; Seznam dokumentov sistema kakovosti. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana.

Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455: 81-95.

Glaab W.E., Tindall K.R., Skopek T.R. 1999. Specificity of mutations induced by methylmethane sulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mutation Research*, 427: 67-78.

Go R.S. in Adjei A.A. 1999. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 409-422.

Guittet O., Hakansson P., Voevodskaya N., Fridd S., Greslund A., Arakawa H., Nakamura Y., Thelander L. 2001. Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase *in vitro* with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 40647-40651.

Hastwell P.W., Chai L.L., Roberts K.J., Webster T.W., Harvey J.S., Rees R.W., Walmsley R.M. 2006. High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay. *Mutation Research*, 607: 160-175.

Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. 1998. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13: 89-94.

Holbrook N.J., Fornace A.J. 1991. Response to adversity – molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biologist*, 3: 825-833.

Hreljac I., Zajc I., Lah T.T., Filipič M. 2008. Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 360-367.

Hreljac I. 2009. Genotoksično, kogenotoksično in potencialno rakotvorno delovanje modelnih organofosfornih pesticidov. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta.

Huberman E., Sachs L. 1974. Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens. *International Journal of Cancer*, 13: 326-333.

IARC. 1973. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 3. IARC, Lyon.

IARC. 1983. Polynuclear aromatic compounds, part 1: chemical, environmental and experimental data. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Human, vol. 32. IARC, Lyon.

IARC. 1987. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs, vol. 1-42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (suppl. 7). IARC, Lyon.

Jagger C., Tate M., Cahill P.A., Hughes C., Knight A.W., Billinton N., Walmsley R.M. 2009. Assessment of the genotoxicity of S9-generated metabolites using the GreenScreen HC *GADD45a-GFP* assay. *Mutagenesis*, 24: 35-50.

Jacobson-Kram D. in Contrera J.F. 2007. Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation part I: Early screening for potential human mutagens. *Toxicological Sciences*, 96: 16-20.

Jaiswal A.S. in Narayan S. 2002. S(N)2 DNA-alkylating agent-induced phosphorylation of p53 and activation of p21 gene expression. *Mutation Research*, 231: 11-30.

Jordan M.A. in Wilson L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4: 253-265.

Knight A.W., Birrell L., Walmsley R.M. 2009. Development and validation of a higher throughput screening approach to genotoxicity testing using the *GADD45a-GFP* GreenScreen HC Assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 14: 16-30.

Knasmüller 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. *Mutation Research*, 402: 185-202.

Knasmüller 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*, 4: 533-539.

Knasmüller 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 genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198: 315-328.

Ku W.W., Bigger A., Brambilla G., Glatt H., Gocke E., Guzzie P.J., Hakura A., Honma M., Martus H.J., Obach R.S., Roberts S. 2007. Strategy for genotoxicity testing – metabolic considerations. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627: 59-77.

Lee M.W., Kim B.J., Choi H.K., Ryu M.J., Kim S.B., Kang K.M., Cho E.J., Youn H.D., Huh W.K., Kim S.T. 2007. Global protein expression profiling of budding yeast in response to DNA damage. *Yeast*, 24: 145-154.

Leung T.W., Patt Y.Z., Lau W.Y., Ho S.K., Yu S.C., Chan A.T., Mok T.S., Yeo W., Liew C.T., Leung N.W., Tang A.M., Johnson P.J. 1999. Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 5: 1676-1681.

Maron D.M. in Ames B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215.

McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72: 5135-5139.

McHugh P.J., Spanswick V.J., Hartley J.A. 2001. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. The Lancet Oncology, 2: 483-490.

Mikloš M., Gajski G., Garaj-Vrhovac V. 2009. Usage of the standard and modified comet assay in assessment of DNA damage in human lymphocytes after exposure to ionizing radiation. Radiology and Oncology, 43: 97-107.

Mitchelmore C.L., Birmelin C., Chipman J.K., Livingstone D.R. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. 1998. Aquatic Toxicology, 41: 193-212.

NASA (National Aeronautics and Space Administration), Science Mission Directorate (2009) Introduction to The Electromagnetic Spectrum.
http://missionscience.nasa.gov/nasascience/ems_intro.html (25.6.2010)

Natarajan A.T. in Darroudi F. 1991. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. Mutagenesis, 6: 399-403.

Newton M.A., Noueir A., Sarkar D., Ahlquist P. 2004. Detecting differential gene expression with a semiparametric hierarchical mixture method. Biostatistics, 5: 155-176.

Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H. 1985. Evaluation of a new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. Mutation Research, 147: 219-229.

Ohno K., Tanaka-Azuma Y., Yoneda Y., Yamada T. 2005. Genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: Examination with 80 chemicals. Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 588: 47-57.

Ohno K., Ishihata K., Tanaka-Azuma Y., Yamada T. 2008. A genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: Assessment of its reactivity to various classes of genotoxic chemicals. Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 656: 27-35.

Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. Journal of the National Cancer Institute, 82: 779-783.

Olive P.L. 2007. Impact of the comet assay in radiobiology. Mutation Research, 681: 13-23.

Östling O. in Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communication, 123: 291-298.

Owellsen R.J., Hartke C.A., Dickerson R.M., Hains F.O. 1976. Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of vinca alkaloid class. *Cancer Research*, 36: 1499-1502.

Pabla N., Huang S., Mi Q.S., Daniel R., Dong Z. 2008. ATR-Chk2 Signaling in p53 Activation and DNA Damage Response during Cisplatin-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 6572-6583.

Page A.M. in Hieter P. 1999. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annual Reviews of Biochemistry*, 68: 583-609.

Park S.Y., Lee S.M., Ye S.K., Yoon S.H., Chung M.H., Choi J. 2006. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicology Letters*, 167: 27-33.

Perlow R.A., Kolbanovskii A., Hingerty B.E., Geacintov N.E., Broyde S., Scicchitano D.A. 2002. DNA adducts from a tumorigenic metabolite of benzo[a]pyrene block human RNA polymerase II elongation in a sequence- and stereochemistry-dependent manner. *Journal of Molecular Biology*, 321: 29-47.

Pfuhler S. in Wolf H.U. 1996. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27: 196-201.

Plazar J., Hreljac I., Pirih P., Filipič M., Groothuis G.M.M. 2007a. Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human and rat precision-cut liver slices. *Toxicology in Vitro*, 21: 1134-1142.

Pool-Zobel B. in Leucht U. 1997. Introduction of DNA damage by risk factors of colon cancer in human colon cells derived from biopsies. *Mutation Research*, 375: 105-115.

Požin M. 2009. Odzivnost različnih celičnih linij na toksične in genotoksične učinke modelnih mutagenov. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

Putnam C.D., Jaehnig E.J., Kolodner R.D. 2009. Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 8: 974-982.

Quillardet P., Huisman O., D'Ari R., Hofnung M. 1982. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 5971-5975.

Quillardet P. in Hofnung M. 1993. The SOS chromotest: a review. *Mutation Research*, 297: 235-279.

Radiation exposure and cancer. 2010. American Cancer Society.
<http://www.cancer.org/Cancer/CancerCauses/OtherCarcinogens/MedicalTreatments/radiation-exposure-and-cancer> (27.6.2010)

Reifferscheid G., Heil J., Oda Y., Zahn R.K. 2004. A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental

samples. *Mutation Research – Environmental Mutagenesis and Related Subjects Including Methodology*, 253: 215-222.

Rieger R., Michaelis A., Green M.M. 1991. *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*. 5th ed New York. Springer-Verlag.

Rowinsky E.K. in Donehower R.C. 1998. Microtubule-targeting drugs. In: Perry MC, editor. *The chemotherapy source book*. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 998: 387-423.

Sadikovic B. in Rodenhiser D.I. 2006. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216: 458-468.

Scherer G., Urban M., Hagedorn H.W., Serafin R., Feng S., Kapur S., Muhammad R., Jin Y., Sarkar M., Roethig H.J. 2010. Determination of methyl-, 2-hydroxyethyl- and 2-cyanoethylmercapturic acids as biomarkers of exposure to alkylating agents in cigarette smoke. *Journal of Chromatography B*, doi:10.1016/j.jchromb.2010.02.023.

Shimada T., Martin M.V., Pruess-Schwartz D., Marnett L.J., Guengerich F.P. 1989. Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo[a]pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Research*, 49: 6304-6312.

Siafakas R.A. in Richardson D.R. 2009. Growth arrest and DNA-damage – 45 alpha (GADD45 α). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41: 986-989.

Sims P., Grover P.L., Swaisland A., Pal K., Hewer A. 1974. Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature*, 252: 326-328.

Sims P. 1975. Epoxides as reactive intermediates in aromatic hydrocarbon metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 3: 59-62.

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: 184-191.

Speit G. in Hartmann A. 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, 10: 555-559.

Sutton M.D., Smith B.T., Godoy V.G., Walker G.C. 2000. The SOS response: Recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annual Review of Genetic*, 34: 479-497.

Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y., Nakamura Y. 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, 404: 42-49.

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: 206-221.

Tishler R.B., Lamppu D.M., Park S., Price B.D. 1995. Microtubule-active drugs taxol, vinblastine, and nocodazole increase the levels of transcriptionally active P53. *Cancer Research*, 55: 6021-6025.

Todd M.D., Lee M.J., Williams J.L., Nalezny J.M., Gee P., Benjamin M.B., Farr S.B. 1995. The cat-tox (L) assay – a sensitive and specific measure of stress-induced transcription in transformed human liver-cells. *Fundamental and Applied Toxicology*, 28: 118-128.

Ueng Y., Shyu C., Liu T., Oda Y., Liao J., Chen C. 2001. Protective effects of baicalein and wogonin against benzo[a]pyrene- and aflatoxin B1-induced genotoxicities. *Biochem Pharmacol*, 62: 1653-1660.

Ueno M., Masutani H., Arai R.J., Yamauchi A., Hirota K., Sakai T., Inamoto T., Yamaoka Y., Yodoi Y., Nikaido T. 1999. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 35809-35815.

Valentin-Severin I., Le Hegarat L., Lhuguenot 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: 79-90.

Vahakangas K., Raunio H., Pasanen M., Sivonen P., Park S.S., Gelboin H.V. 1989. Comparison of the formation of benzo[a]pyrene diolepoxide–DNA adducts in vitro by rat and human microsomes: evidence for the involvement of P-450IA1 and P-450IA2. *Journal of Biochemical Toxicology*, 4: 79-86.

Van der Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A., Verschaeve L. 1997. The VITOTOX test, an SOS bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. *Mutation Research*, 389: 279-290.

Van Welie R.T.H., Van Dijck R.G.J.M., Vermeulen N.P.E., Van Sittert N.J. 1992. Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. *Critical Reviews in Toxicology*, 22: 271-306.

Verschaeve L., Van Gompel J., Thilemans L., Regniers L., Vanparys P., van der Lelie D. 1999. VITOTOX® bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33: 240-248.

Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307-310.

Waldman T., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1995. P21 is necessary for the P53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research*, 55: 5187-5190.

Wang A., Gu J., Judson-Kremer K., Powell K.L., Mistry H., Simhambhatla P., Aldaz C.M., Gaddis S., MacLeod M.C. 2003. Response of human mammary epithelial cells to DNA damage induced by BPDE: involvement of novel regulatory pathways. *Carcinogenesis*, 24: 225-234.

Wang D. in Lippard S.J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 307-320.

Weinstein I.B. 1978. Current concepts on mechanisms of chemical carcinogenesis. *Bulletine of the New York Academy of Medicine*, 54: 366-383.

Wilkening S., Stahl F., Bader A. 2003. Comparison of primary hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, 31: 1035-1042.

Wyatt M.D. in Pittman D.L. 2006. Methylating agents and DNA repair responses: methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical Research in Toxicology*, 19: 1580-1594.

Yang S.K., McCourt D.W., Leutz J.C., Gelboin H.V. 1977. Benzo[a]pyrene diol-epoxides: mechanisms of enzymatic formation and optically active intermediates. *Science*, 196: 1199-1201.

Zajc I., Sever N., Filipič M. 2007. Postopek: MTS test; 10G-Pos05-01; Seznam dokumentov sistema kakovosti. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana.

Zeiger E. 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regular Toxicology and Pharmacology*, 28: 85-95.

Zhang Y., Rohde L.H., Emami K., Hammond D., Casey R., Mehta S.K., Jeevarajan A.S., Pierson D.L., Wu H. 2008. Suppressed expression of non-DSB repair genes inhibits gamma-radiation-induced cytogenetic repair and cell cycle arrest. *DNA Repair*, 7: 1835-1845.

Zhang R., Niu Y.J., Do H.R., Cao X.W., Hao Q.L., Zhou Y. 2009. A stable and sensitive testing system for potential carcinogens based on DNA damage-induced gene expression in human HepG2 cell. *Toxicology in Vitro*, 23: 158-165.

Zhou B.B.S. in Elledge S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439.

Žager V., Čemazar M., Hreljac I., Lah T.T., Serša G., Filipič M. 2010. Development of human cell biosensor system for genotoxicity detection based on DNA damage-induced gene expression. *Radiology and Oncology*, 44: 42-51.

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem dr. Bojani Žegura, ki me je usmerjala pri raziskovalnem delu, in mi bila v veliko pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Metki Filipič za mentorstvo in omogočeno opravljanje diplomske naloge na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Zahvaljujem se Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta pod vodstvom prof. dr. Gregorja Serše, kjer so mi omogočili izvedbo dela raziskav v sklopu diplomske naloge.

Hvala članici komisije in recenzentki prof. dr. Damjani Drobne ter predsedniku komisije prof. dr. Mihaelu J. Tomanu za pregled diplomske naloge.

Najbolj pa se zahvaljujem družini in prijateljem, ki so mi bili v podporo, ne le v času opravljanja diplomske naloge, temveč v času celotnega študija biologije.