

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ana KOPČAVAR

**MUTAGENO IN GENOTOKSIČNO DELOVANJE IZVLEČKOV,
IZOLIRANIH IZ PEČENEGA PIŠČANČJEGA MESA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MUTAGENIC AND GENOTOXIC ACTIVITY OF THE EXTRACTS
ISOLATED FROM ROASTED CHICHEN MEAT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. 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 prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorico pa dr. Bojano Žegura.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Damjana Drobne

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Metka Filipič

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

Članica: prof. dr. Kristina Sepčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Bojana Žegura

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

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: 27.6.2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Kopčavar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 615.9:575.224.4:616-006(043.2)=163.6
KG izvleček pečenega piščančjega mesa, heterociklični amini, mutagenost, genotoksičnost, metabolizem, test komet, test mikrojedr, izražanje genov
AV KOPČAVAR, Ana
SA SEPČIČ, Kristina (mentorica) / ŽEGURA, Bojana (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo / Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka
LI 2011
IN MUTAGENO IN GENOTOKSIČNO DELOVANJE IZVLEČKOV, IZOLIRANIH IZ PEČENEGA PIŠČANČJEGA MESA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 87 str., 18 sl., 16 pregl., 218 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Meso je s svojo visoko hranilno vrednostjo pomembno živilo človeške prehrane. Pred zaužitjem se ga običajno na različne načine termično obdela, visoke temperature pri pripravi živila pa so vzrok za nastanek različnih zdravju škodljivih snovi. Najpomembnejša skupina genotoksičnih spojin, ki nastanejo pri toplotni obdelavi mesa so heterociklični amini (HCA). HCA spadajo med najmočnejše mutagene snovi in so dokazano karcinogeni pri glodavcih. Ljudje smo z uživanjem mesa vedno izpostavljeni kompleksni mešanici genotoksičnih snovi, zaradi česar je izvleček pečenega mesa dober pokazatelj dejanske izpostavljenosti in možnosti povečanega tveganja za razvoj rakavih obolenj. V diplomski nalogi smo testirali dva izvlečka izolirana iz skorje in sredice pečenega piščančjega mesa, kjer je izvleček skorje vseboval HCA (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin - PhIP, 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin - MeIQx in 2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin - DiMeIQx), izvleček sredice pa je zaradi odsotnosti HCA služil kot kontrola. Namen naše raziskave je bil preveriti mutageno in genotoksično delovanje izvlečkov pečenega piščančjega mesa ter ugotoviti morebiten vpliv na izražanje izbranih genov. Mutageno delovanje izvlečkov smo preverjali z Amesovim testom na bakterijah *Salmonella typhimurium* sev TA98, genotoksično delovanje pa s testom komet in testom mikrojedr na celicah HepG2. Vpliv izvlečkov na izražanje izbranih genov smo preverjali s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR). Z Amesovim testom smo ugotovili, da je izvleček skorje že pri najnižjih testiranih koncentracijah (0.125 µL izvlečka/ploščo) povzročil mutacije in sicer -1 premik bralnega okvirja, medtem ko je izvleček sredice pri 400x višjih koncentracijah povzročil rahlo povišanje mutacij. Izvlečka (1 vol%) nista delovala citotoksično na celice HepG2 in nista povzročala verižnih prelomov DNA. Izvleček skorje je povzročil nastanek mikrojedr, medtem ko na tvorbo jedrnih brstov in nukleoplazmatskih mostičkov ni vplival. Izvleček skorje (1 vol%) je povišal izražanje genov, vključenih v metabolno pretvorbo ksenobiotikov (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *NAT2*, *UGT1A1*) in odgovor celice na poškodbe DNA (*CDKN1A*) ter zmanjšal izražanje anti-apoptotskega gena (*BCL-2*).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 615.9:575.224.4:616-006(043.2)=163.6
CX extract from roasted chicken meat, heterocyclic amines, mutagenicity, genotoxicity, metabolism, Comet assay, Cytokinesis-block micronucleus assay, gene expression
AU KOPČAVAR, Ana
AA SEPČIČ, Kristina (supervisor) / ŽEGURA, Bojana (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology / National Institute of Biology, Department for Genetic Toxicology and Cancer Biology
PY 2011
TI MUTAGENIC AND GENOTOXIC ACTIVITY OF THE EXTRACTS ISOLATED FROM ROASTED CHICKEN MEAT
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 87 p., 18 fig., 16 tab., 218 ref.
LA sl
AL sl/en
AB High nutritional value makes meat an important part of our alimentation. It usually undergoes different kind of heat treatment before consumption, and the high temperature involved in such preparations may cause the formation of potentially harmful substances. The most important group of genotoxic compounds resulting from heat treatment of meat are the heterocyclic amines. HCAs have been found to be highly mutagenic and proven to be carcinogenic in rodents. The consumption of meat exposes humans to a complex mixture of genotoxic substances, and an extract of roasted meat is therefore a good indicator of the exposure and the possibility of an increased risk of cancer development. In the present study we tested two extracts isolated from the crust and the core of roasted chicken meat. The extract from the crust contained HCAs (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine - PhIP, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline - MeIQx and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline - DiMeIQx), while the extract from the core served as control, since it did not contain HCAs. The main purpose of our research was to examine the mutagenic and genotoxic activity of the extracts of roasted chicken meat and to determine whether it influences the expression of selected genes. The mutagenic activity of the extracts was examined with the Ames test on the bacteria *Salmonella typhimurium* strain TA98, while the genotoxic activity was assessed with the comet assay and micronucleus test on HepG2 cells. The influence of the extracts on the expression of selected genes was examined with the quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The Ames test showed that the extract of the crust caused mutations even at the lowest concentrations tested (0.125 µL extract/plate), causing a -1 reading frame shift, while the extract from the core caused only slightly increased mutations at 400 times higher concentrations. The extracts (1 vol%) proved not to be cytotoxic on HepG2 cells and did not cause DNA strand breaks. The extract from the crust caused the formation of micronuclei, but it had no effect on the formation of nuclear buds and nucleoplasmic bridges. Furthermore, the extract from the crust (1 vol%) increased the expression of genes included in the metabolic activation of xenobiotics (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *NAT2*, *UGT1A1*) as well as genes involved in cell response to DNA damage (*CDKN1A*), and decreased the expression of the anti-apoptotic gene (*BCL-2*).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
1 UVOD	1
1.1 NAMEN RAZISKOVANJA IN HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 TOPLOTNA OBDELAVA MESA.....	2
2.2 HETEROCIKLIČNI AMINI (HCA).....	5
2.3 METABOLIZEM HETEROCIKLIČNIH AMINOV (HCA)	8
2.4 POLIMORFIZEM GENOV METABOLNE AKTIVACIJE	10
2.5 GENOTOKSIČNOST HCA	11
2.5.1 DNA ADUKTI.....	12
2.5.2 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST HCA	13
2.5.2.1 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST MeIQx.....	15
2.5.2.2 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST PhIP	15
2.5.2.3 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST DiMeIQx.....	17
2.6 RAK IN HCA	17
3 MATERIALI IN METODE.....	19
3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA.....	19
3.1.1 KEMIKALIJE.....	19
3.2 METODE DELA	21
3.2.1 PRIPRAVA HCA IZVLEČKA PIŠČANČJEGA MESA.....	21
3.2.1.1 DOLOČANJE HCA V MESNEM IZVLEČKU	21
3.2.2 TESTI NA BAKTERIJAH - AMESOV TEST.....	21
3.2.2.1 OPIS METODE	21
3.2.2.2 SALMONELLA TYPHIMURIUM sev TA98.....	22
3.2.2.2.1 GOJENJE <i>S.typhimurium</i>	22
3.2.2.3 METABOLNA AKTIVACIJA S9.....	23
3.2.2.4 PRIPRAVA GOJIŠČ.....	23
3.2.2.5 POTEK DELA	26
3.2.3 TESTI NA MODELU SESALČJIH CELIC ČLOVEŠKEGA HEPATOMA (HepG2 celice)	26
3.2.3.1 CELICE HepG2	26
3.2.3.1.1 GOJENJE CELIC HepG2 IN PRESAJANJE.....	27
3.2.3.2 TEST 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIJEV BROMID..	28
3.2.3.2.1 OPIS METODE	28
3.2.3.2.2 POTEK DELA	28
3.2.3.3 ALKALNI TEST KOMET	29
3.2.3.3.1 OPIS METODE	29
3.2.3.3.2 PRIPRAVA REAGENTOV IN RAZTOPIN ZA TEST KOMET	30
3.2.3.3.3 POTEK DELA	31
3.2.3.4 TEST MIKROJEDER	33
3.2.3.4.1 OPIS METODE	33
3.2.3.4.2 POTEK DELA	34

3.2.3.5	IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV, KI SO VKLJUČENI V METABOLNO PRETVORBO KSENOBIOTIKOV, ODGOVOR CELICE NA POŠKODBE DNA IN APOPTOZO	36
3.2.3.5.1	PRIPRAVA IN TRETIRANJE CELIC HEPG2	36
3.2.3.5.2	IZOLACIJA mRNA S TRIZOL [®] REAGENTOM	36
3.2.3.5.3	PREPIS mRNA V cDNA.....	38
3.2.3.5.4	KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (qPCR).....	39
4	REZULTATI.....	43
4.1	DOLOČANJE HCA V IZVLEČKU PIŠČANČJEGA MESA	43
4.2	TESTI NA BAKTERIJAH	44
4.2.1	AMESOV TEST	44
4.3	TESTI NA MODELU SESALČJIH CELIC ČLOVEŠKEGA HEPATOMA (HepG2).....	46
4.3.1	TEST MTT.....	46
4.3.2	ALKALNI TEST KOMET	47
4.3.3	TEST MIKROJEDER.....	48
4.3.4	IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV, KI SO VKLJUČENI V METABOLNO PRETVORBO KSENOBIOTIKOV, ODGOVOR CELICE NA POŠKODBE DNA IN APOPTOZO	53
5	DISKUSIJA.....	58
6	SKLEPI.....	68
7	POVZETEK.....	70
8	VIRI	71

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijske strukture glavnih piroliznih in termičnih (AIA) heterocikličnih aminov (Turesky, 2010: 39).....	6
Slika 2: Mehanizem tvorbe HCA (AIA), ki vključuje Millardovo reakcijo, Strecker-jevo razgradnjo in ciklizacijo kreatina (Turesky, 2010: 41).....	7
Slika 3: Potek metabolizma, ki vključuje reakcije detoksifikacije in aktivacije HCA (AIA) <i>in vivo</i> (Dashwood, 2002: 93; Schut in Snyderwine, 1999: 355).	9
Slika 4: Tvorba DNA aduktov preko metabolne aktivacije HCA (primer IQ) (Turesky, 2010: 65).....	13
Slika 5: Glavne poti v procesu metabolizma molekule MeIQx (Turesky, 2010: 55).	15
Slika 6: Glavne poti v procesu metabolizma molekule PhIP (Turesky, 2010: 55).....	16
Slika 7: Potek nastanka raka preko zaužitja in metabolne pretvorbe prokarcinogena (HCA) (prirejeno po Felton, 1995b: 8).	17
Slika 8: Število revertiranih kolonij v odvisnosti od koncentracije izvlečka sredice pečenega piščančjega mesa.....	44
Slika 9: Število revertiranih kolonij v odvisnosti od koncentracije izvlečka skorje pečenega piščančjega mesa.....	45
Slika 10: Določanje citotoksičnega delovanja različnih koncentracij izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa na celicah HepG2.....	46
Slika 11: Določanje genotoksičnega delovanja različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredice pečenega piščančjega mesa na celicah HepG2.....	47
Slika 12: Število HepG2 celic z mikrojedri v odvisnosti od različnih koncentracij izvlečkov pečenega piščančjega mesa.....	48
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredica pečenega piščančjega mesa na nastanek vseh mikrojedr v HepG2 celicah.....	49
Slika 14: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredica pečenega piščančjega mesa na nastanek nukleoplazmatskih mostičkov v HepG2 celicah.....	50
Slika 15: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredica pečenega piščančjega mesa na nastanek jedrnih brstov v HepG2 celicah.	51
Slika 16: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredica pečenega piščančjega mesa na delitev celic HepG2.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij	19
Preglednica 2: Minimalno glukozno gojišče.	23
Preglednica 3: Vogel-Bonner soli (50x VB soli).	24
Preglednica 4: 40% glukoza.	24
Preglednica 5: Top agar.	24
Preglednica 6: Rastopina histidin/biotin (5 mM)	24
Preglednica 7: Hranilno gojišče za bakterije	25
Preglednica 8: Fosfatni pufer (NaHPO ₄ , pH 7.4).	25
Preglednica 9: 4% metabolno aktivna frakcija S9.	25
Preglednica 10: Celični medij za celično kulturo HepG2.	27
Preglednica 11: NMP in LMP agaroz.	30
Preglednica 12: Rastopina za odvijanje DNA in elektroforezo (pH 13).	30
Preglednica 13: Rastopina za lizo (pH 10).	31
Preglednica 14: Rastopina za nevtralizacijo.	31
Preglednica 15: Reakcijska mešanica za RT.	38
Preglednica 16: Reakcijska mešanica za PCR posameznega gena.	41
Preglednica 17: Sestava in količina HCA v izvornem in 100-krat redčenem (1 vol%) izvlečku pečenega piščančjega mesa.	43
Preglednica 18: Vpliv 1 vol% izvlečka sredice in skorje pečene perutnine, 0.6721 µg/mL MeIQx, 0.647 µg/mL PhIP, kombinacije PhIP (0.647 µg/mL) z MeIQx (0.6721 µg/mL), MeIQx (250 M) in BaP (30 M) na izražanje genov HepG2 celic.	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIA	aminoimidazoazareni
HCA	heterociklični amini
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolon
IQx	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
HepG2	celice človeškega hepatoma
CYP	družina citohrom P450 monooksigenaz
NAT	N-acetiltransferaza
SULT	glutation-S-transferaza
UGT	UDP-glukuronozil-transferaza
GST	glutation-S-transferaza
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
BAX	proapoptotski gen BAX (angl. BCL2-associated X protein)
BCL-2	antiapoptotski gen BCL-2 (angl. B-cell lymphoma/leukemia 2)
CDKNA1	od ciklina odvisni kinazni inhibitor A1 (P21)
MDM2	negativni regulator tumor-supresorskega proteina p53 (angl. murine transformed 3T3 cell double minute 2 oncogene)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
n.d.	pod mejo detekcije
S9	eksogen sesalski metabolni aktivacijski sistem
qrtPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
PBS	raztopina slanega fosfatnega pufra (angl. phosphate buffered saline)
FBS	serum govejega zarodka (angl. foetal bovine serum)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
LMP	nizko tališče (angl. low melting point)
NMP	normalno tališče (angl. normal melting point)
MN	mikrojerdo
BaP	benzo(a)piren
SD	standardna deviacija
DMSO	dimetilsulfoksid
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina (angl. ethylenediamine tetraacetic acid)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
dG	deoksigvanozin
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin
AαC	2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol

MeAαC	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3- <i>b</i>]indol
Glu-P-2	2-amino-dipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol
vol%	volumski odstotek
DEPC	voda brez RN-az (angl. diethyl pyrocarbonate-phosphate buffer)
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka (angl. International Agency of Research of Cancer)
CBMN	test elektroforeze posameznih celic (angl. the cytokinesis-block micronucleus assay)
NPB	nukleoplazmatski mostički (angl. nucleoplasmic bridges)
NB	jedrni brsti (angl. nuclear buds)
SNP	polimorfizem v enem nukleotidu gena (angl. single nucleotide polymorphism)
His	histidin
RT	reverzna (obratna) transkripcija
NOC	N-nitro spojine (nitrozamin)
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki (angl. polycyclic aromatic hydrocarbons)
ESI	ionizacija z elektrorazprševanjem
SIR	ang. Selected Ion Recording
SPE	ekstrakcija s trdno fazo (angl. Solid Phase Extraction)
Ct	cikel v katerem amplifikacijska krivulja seka prazno vrednost (treshold cycle)

1 UVOD

Prehrana je namenjena predvsem preskrbi organizma z energijo. Z uživanjem različnih prehranskih izdelkov smo ljudje dnevno izpostavljeni številnim sestavinam živil. Enega izmed glavnih virov beljakovin v človekovem jedilniku predstavlja meso. Običajno ga pred zaužitjem na različne načine termično obdelamo. S tem pridobimo željen okus in aromo ter se izognemo morebitni okužbi z različnimi mikrobi. Pri mnogih načinih toplotne obdelave mesa se v mesnem izdelku lahko tvorijo snovi, ki so zdravju škodljive. Eno skupino takih spojin predstavljajo heterociklični aromatski amini.

Heterociklični aromatski amini (HCA) so snovi, ki nastanejo kot produkt toplotne obdelave, predvsem proteinsko bogate hrane. Najpogosteje jih zasledimo v pečenem mesu in različnih mesnih izdelkih živalskega izvora. Za nastanek HCA je ključna prisotnost ustreznih gradnikov in visoka temperatura, ki sproži potek oblikovanja aromatskih spojin. Osnovni gradniki, iz katerih se tvori večina HCA, so proste aminokisljine, saharidne komponente in kreatin oz. kreatinin.

Količina HCA, ki se tvori pri toplotni obdelavi mesa, je odvisna od vrste izdelka (prisotnost in količina gradnikov), načina in pogojev toplotne obdelave (temperatura in čas) in metode priprave živila (dodatek začimb, soli, moke). Najpomembnejši dejavnik je temperatura, kar potrjuje dejstvo, da se največ HCA tvori pri pečenju, praženju ali cvrtju z doseganjem visokih temperatur.

HCA so v svoji izvorni, naravni obliki nereaktivne in neškodljive snovi. Po zaužitju in vstopu v telo so molekule izpostavljene delovanju številnih encimov, ki jih v procesu metabolizma pretvorijo v različne metabolite. Reakcije bioaktivacije pretvorijo HCA v reaktivne in nestabilne molekule, ki imajo velik potencial za vezavo na različne celične komponente, s čimer se izrazi njihov strupen učinek. Glavni in najbolj škodljiv pojav, ki ga HCA povzročijo, so DNA adukti. Povezava HCA-DNA vpliva na nastanek različnih sprememb v dednem materialu in napak pri podvajanju. Številne nepravilnosti, ki so posledica napačnega delovanja celičnih mehanizmov, izpostavljajo celice in posredno tkivo organizma k razvoju karcinogenega procesa.

HCA so snovi, ki imajo visok mutagen potencial in povzročajo nastanek raka v različnih organih glodavcev. Tveganje za nastanek raka v povezavi z uživanjem HCA pri človeku je pogojeno z mnogimi dejavniki: od genetskih lastnosti, ki vplivajo na potek vseh reakcij v organizmu, številnih okoljskih dejavnikov in ne nazadnje prehranskih navad posameznika, med katerimi je pomembna tudi pogostost uživanja mesa.

1.1 NAMEN RAZISKOVANJA IN HIPOTEZA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti ali izvleček pečenega piščančjega mesa povzroča mutacije, kar smo preverjali na bakterijah *Salmonella thyphimurium*, sev TA98. Poleg tega smo na modelu človeških jetrnih celic HepG2 ugotavljali potencialno strupeno delovanje izvlečka s testom 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT), genotoksično delovanje pa s testom komet in testom mikro jeder. Vpliv na izražanje izbranih genov, ki so vključeni v aktivacijo in detoksifikacijo ksenobiotikov, smo preverjali s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

Hipoteza diplomske naloge je, da izvleček skorje pečenega piščančjega mesa deluje mutageno na bakterije *S. thyphimurium*, sev TA98 in povzroča poškodbe dednega materiala na celicah človeškega hepatoma (HepG2). Predvidevamo, da izvleček vpliva na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v metabolizem heterocikličnih aminov, odgovor celice na poškodbe DNA in apoptozo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TOPLOTNA OBDELAVA MESA

Zaenkrat ni poznane človeške skupnosti, ki bi bila sposobna preživeti s hranjenjem le s toplotno neobdelanimi živili. Uživanje surove hrane nudi malo energije in slabi reproduktivno sposobnost ter je poleg tega velikokrat neugodno za žvečenje. Toplotna obdelava živil je na podlagi teh dveh dejstev zato predlagana kot nuja za človeka (Wrangham in Conklin-Brittain, 2003).

Ljudje smo slabo prilagojeni na prehranjevanje s surovim mesom. Toplotna obdelava nam izboljša kvaliteto hrane, omogoča mehčanje živil in poveča kalorično vsebnost, kar je posledično pripeljalo do povečanega uživanja mesnih izdelkov (Wrangham in Conklin-Brittain, 2003). Meso toplotno obdelujemo zato, da zagotovimo mikrobiološko varnost živila, oblikujemo zeleno senzorično kakovost in zmanjšamo vsebnost možnih škodljivih substanc (Jägerstad in Skog, 2005). Meso je eden izmed glavnih virov proteinov v prehrani, kamor prištevamo meso rib in skeletne mišice živali (Felton in sod., 1995). Nastane v več stopnjah, v katerih pride do biokemijskega in strukturnega preoblikovanja mišice v meso (Ouali in sod., 2006). Fizikalno-kemijski procesi med segrevanjem vplivajo na osnovne gradnike mesa, njegovo teksturo, barvo in aromo ter inducirajo številne encimske reakcije. Prihaja do denaturacije beljakovin, konformacijskih sprememb, razgradnje in cepitev vezi ter tvorbe novih vezi med različnimi gradniki (Palka, 2004). Večina ogljikovodikov in lipidnih prekursorjev se vključi v mrežo kemijskih reakcij, medtem ko so proste aminokisliline bolj termostabilne in je za njihovo razgradnjo potrebna temperatura višja od 100°C (Pegg in

Shahidi, 2004). Pri pečenju in cvrtju mesa ali rib lahko pride do nastanka mutagenih in karcinogenih spojin, ki jih imenujemo heterociklični aromatski amini (HCA) (Slika 1).

Številni HCA nastanejo v procesu Millardove reakcije med prostimi amino kislinami, kreatinom in monosaharidnimi enotami, ki predstavljajo sestavine surovega mesa (Skog in sod., 1998). Proste aminokisliline in sladkorji so sestavni del mišičnih proteinov in glikogena, kreatin pa je energijski metabolit, prisoten v velikih količinah le v mišični celici (Jägerstad in Skog, 2005).

Poleg vseh pozitivnih učinkov, ki jih ima toplotna obdelava mesa, med drugim uničenje večine patogenih bakterij in parazitov, visoke temperature kuhanja in pečenja vplivajo na nastanek mnogih genotoksičnih snovi v mesu. Visoko mutageni heterociklični amini so bili odkriti v površinski skorji zapečenega mesa in rib (Sugimura in sod., 1977; Nagao in sod., 1977). Dandanes je ozaveščanje o vplivu teh škodljivih snovi na človeško zdravje vedno večje, izpostavljenost pa je močno povezana s prehrabnimi navadami in načinom pripravljavanja hrane (Jägerstad in Skog, 2005).

Način toplotne obdelave lahko povzroča velika odstopanja v celokupni mutageni aktivnosti in količini nastalih genotoksičnih snovi v mesnem izdelku (Felton in sod., 1995). Nastanek spojin, ki povzročajo spremembe v DNA, je kompleksen proces in je zelo pogojen z načinom priprave hrane (Felton, 1995a). Poglavitni pomen ima temperatura kuhanja oz. pečenja in dolžina časa toplotne obdelave (Felton in sod., 1995), vrsta hrane, ki vključuje tako prekursorje kot inhibitorje HCA in način toplotne obdelave (Skog in sod., 1998). Obstaja veliko različnih poti in razmerij v količini nastanka mutagenov, zaradi česar je pomembno poznavanje njihovih gradnikov in pogojev reakcij, v katerih nastajajo (Felton, 1995a). Razlike v koncentraciji HCA se od načina priprave mesa lahko razlikujejo tudi za 100-krat. Spreminja se tako vsebnost posameznih predstavnikov kot njihova količina (Knize in sod., 1994; Sinha in sod., 1995; Turesky, 2005).

Glavna dejavnika, ki vplivata na količino nastanka HCA

Z naraščanjem temperature in daljšim časom toplotne obdelave se vsebnost HCA poveča (Skog in sod., 1998). V poskusu, ki ga je izvedel Felton (1995a), je količina posameznih mutagenov naraščala sorazmerno z naraščanjem temperature, z izjemo heterocikličnega amina PhIP, ki je pri visokih temperaturah naraščal eksponentno. Pri običajnem pečenju v ponvi ali na žaru nastane pri temperaturah 200°C in več velika količina HCA (Jägerstad in Skog, 2005). Mutagena aktivnost mesa se pri temperaturah do 300°C še poveča, medtem ko je produkcija HCA pod 140°C majhna (Murkovic in sod., 1998). HCA nastanejo tudi pri nižjih temperaturah (≈100°C), če je čas toplotne obdelave mesa podaljšan (Jägerstad in sod., 1998). S pomočjo modelnih sistemov, s katerimi so proučevali povezavo med temperaturo in časom toplotne obdelave, je Arvidsson s sod. (1997) dokazal, da pečenje različnih gradnikov HCA (kreatinin, glukoza in mešanica aminokislin) po 5 do 10 minutah pri 150 do 225°C doseže največjo količino nastalih mutagenov. HCA se pri podaljšani izpostavitvi visokim temperaturam (225°C) tudi razgrajujejo (Arvidsson s sod., 1997).

Dejavniki v mesu, ki vplivajo na količino nastanka HCA

Sprva je veljalo, da je za nastanek mutagenih snovi v hrani voda nujno potrebna. Primerjave med eksperimenti suhih in vodnih modelov so kasneje pokazale, da je nastanek nekaterih mutagenov v odsotnosti vode večji (npr. PhIP) in da prisotnost vodnih molekul celo inhibira nastanek nekaterih tipov HCA (npr. IQ tip HCA molekul). Med pečenjem mesa se voda in v njej topni prekursorji potisnejo na obrobje zrezka, kjer v kontaktu z vročo in suho površino tvorijo različne HCA. Voda na ta način poveča koncentracijo gradnikov v zunanjih plasteh mesa (Felton, 1995a). Pri podaljšanem pečenju pri nizkih temperaturah lahko pride do izločanja vode (izceje) (Skog in sod., 1998). Mesni sok, ki nastane pri pečenju mesa, je zaradi visoke vsebnosti HCA in izločenih gradnikov močno mutagen (Felton, 1995a).

Na količino HCA, ki so nastali pri toplotni obdelavi mesa, vpliva tudi maščoba (Knize in sod., 1985; Chen in sod., 1989). Vpliv maščob se nanaša na učinkovit prenos toplote znotraj maščobnih molekul (Spingarn in sod., 1981; Barnes in sod., 1983; Holtz in sod., 1985) in možnost izpiranja lipofilnih gradnikov HCA (Knize in sod., 1985; Chen in sod., 1989). Maščobe so v nastanek HCA vpletene tudi preko kemijskih reakcij. S produkcijo prostih radikalov v procesu lipidne oksidacije in sodelovanjem v Millardovi reakciji vplivajo na povečano količino nekaterih gradnikov HCA (npr. pirazinov in piridinov) (Arnoldi in sod., 1990).

Večje koncentracije gradnikov (kreatinin oz. kreatin, sladkorji in aminokisljine) vplivajo na nastanek večjih količin HCA v hrani, še posebno polarnih tipov HCA (Murkovic, 2004). Zaradi vpliva različnih tipov gradnikov, še posebno aminokisljin, na velike razlike v strukturi in kemijskih lastnostih HCA, ima pomembno vlogo tudi vrsta mesa (Pais in sod., 1999). Pais in Knize (2000) navajata, da se v pečenem mesu perutnine nahaja vsebnost npr. PhIP od n.d. (vsebnost pod mejo detekcije) do 37.5 µg/g mesa, v pečenem mesu govedine od n.d. do 18.4 µg/g mesa, pečenem mesu svinjine od n.d. do 7.4 µg/g in pečenem mesu ribe od n.d. do 3 µg/g mesa.

Drugi dejavniki, ki vplivajo na količino nastanka HCA

Na celokupni izkupiček HCA, ki se tvorijo med toplotno obdelavo mesa, ima vpliva način priprave živila (Skog in sod., 2003). Pri običajnem pečenju na žaru ali v ponvi nastane veliko HCA, pri dušenju malo ali nič, pri pečenju v pečici, cvrtju ali praženju pa se količine nastalih HCA spreminjajo (Jägerstad in Skog, 2005). Dodajanje soli, sojinih proteinov, škroba in drugih polisaharidov zmanjša prenos v vodi topnih gradnikov HCA v zgornje sloje mesnega izdelka in znižuje temperaturo na površini mesa ter tako vpliva na manjšo količino nastalih mutagenov (Wang in sod., 1982; Skog in sod., 1992b). Na koncentracijo nastalih HCA vpliva tudi dodajanje reducirajočih sladkorjev (Skog in sod., 1992b) in mariniranje izdelkov (Tikkanen in sod., 1996; Salmon in sod., 1997).

Vpliv različnih maščob, kot so npr. maslo, margarina in različna rastlinska olja, ki se uporabljajo pri pečenju mesa, na tvorbo HCA so proučevali Johansson in sod. (1995c) in predpostavili, da so razlike v količini nastalih mutagenih snovi posledica različnega oksidacijskega stanja in vsebnosti antioksidantov v maščobah.

Prehrambeni izdelki vsebujejo številne sestavine, ki lahko vplivajo na povečano ali zmanjšano tvorbo HCA in njihov mutagen potencial. Med te sestavine spadajo kovine, antioksidanti in prehranski dodatki. V procesu pretvorbe promutagenega HCA lahko pride do nastanka prostih radikalov. Antioksidanti, ki delujejo kot lovilci spojin s prostim elektronom, se z njimi povežejo in tako lahko zmanjšujejo količino nastalih HCA (Skog in sod., 1998). Zaviralni učinek na tvorbo HCA imajo še prehranski dodatki kot so askorbinska kislina in vitamin E (Chen in sod., 1992) ter biogeni amini, kamor spadajo rastlinski flavonoidi (Alldrick in sod., 1986; Alldrick in Rowland, 1987). Raznolika zelenjava in sadje ter klorofilin, vlaknine in glikozidi vplivajo na zmanjšano mutageno delovanje HCA (Edenharder in sod., 1995).

2.2 HETEROCIKLIČNI AMINI (HCA)

Heterociklični amini so skupina nevarnih kemijskih spojin, ki jih v zadnjih desetletjih velikokrat povezujemo z nastankom različnih rakavih obolenj (Turesky, 2007). V hrani jih je leta 1977 na Japonskem prvič odkril profesor Sugimura s sodelavci (Sugimura in sod., 1977). Z uporabo Ames testa na bakteriji *S. thymurium* je dokazal, da so v zapečenem delu govejega in ribjega pečenega mesa prisotne snovi z visoko mutageno aktivnostjo (Skog in sod., 1998; Felton in sod., 2000; Sugimura in sod., 2004; Turesky in sod., 2007).

Do danes so v različno toplotno obdelani hrani, predvsem proteinsko bogati hrani živalskega izvora, izolirali in identificirali približno 20 HCA (Felton in Knize, 1990; Wakabayashi in sod., 1992; Sugimura in sod., 1993). Nastajajo med pečenjem rdečega mesa, rib in perutnine. Koncentracije HCA v pečenem mesu so običajno nizke in se gibljejo med 0.1 do 50 µg/g mesa (ppb; iz angl. parts per billion) (Felton, 1995a). Mnogi heterociklični amini so prisotni tudi v tobačnem dimu, izpušnih plinih, vinu in pivu (Turesky, 2005).

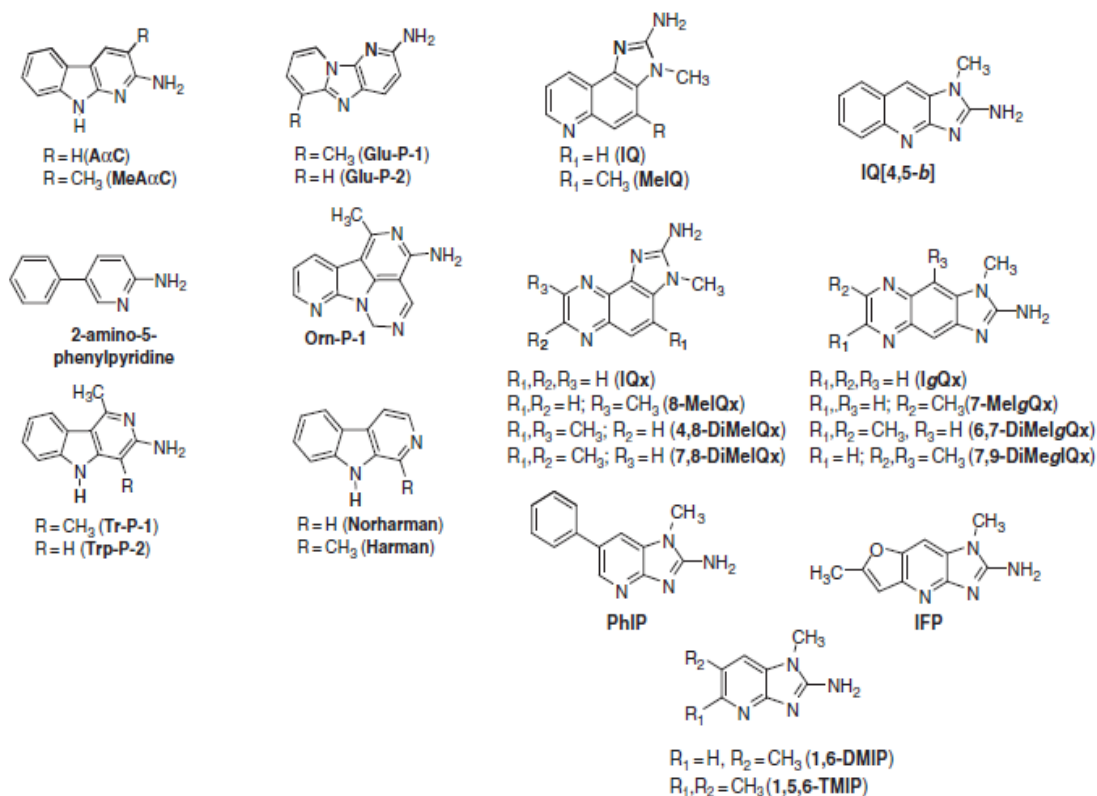
Kljub majhnim količinam veljajo HCA za najbolj mutagene spojine prisotne v hrani (Felton, 1995a). Snovi imajo karcinogen potencial in povzročajo nastanek tumorjev na različnih organih pri glodavcih (Turesky, 2007). Na osnovi zbranih podatkov poskusov na živalih in epidemioloških raziskav IARC (Mednarodna agencija za raziskave raka; iz angl. International Agency of Research of Cancer) razvršča heterociklični amin IQ v skupino 2A »verjetno karcinogen za ljudi« in osem drugih HCA v skupino 2B »možno karcinogen za ljudi«.

HCA zaradi svoje kemijske strukture imenujemo tudi policiklični aromatski amini. Vsi predstavniki vsebujejo vsaj en aromatski in en heterociklični obroč (Cheng in sod., 2006). Večina jih vsebuje izvenciklično amino-skupino, ki le pri predstavnikih β-karbolinov manjka (Jagerstad in sod., 1998). Odsotnost NH₂ skupine pri harmanu in norharmanu je ključna, da

spojini β -karbolinov nista mutageni (Sugimura in sod., 1982). HCA glede na temperaturo, pri kateri nastanejo, delimo v dve skupini. Po A. J. Miller to temperaturno ločnico predstavlja 300°C (Miller, 1985).

PIROLIZNI HCA

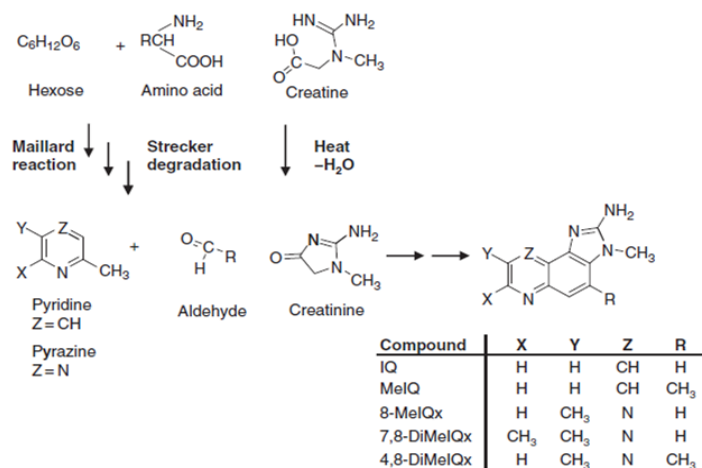
TERMIČNI HCA



Slika 1: Kemijske strukture glavnih piroliznih in termičnih (AIA) heterocikličnih aminov (Turesky, 2010: 39).

HCA prve skupine imenujemo termični HCA ali aminoimidazoazareni (AIA) (Slika 1). Spojine se tvorijo pri običajni, vsakodnevni toplotni pripravi mesa in nastajajo pri temperaturi med 100 in 300°C (Turesky, 2005). AIA so sestavljeni iz enega ali dveh aromatskih obročev in enega imidazolnega obroča. Na C-2 atom heterocikličnega obroča vseh predstavnikov AIA je vezana amino-skupina (NH₂), spojine pa imajo lahko tudi metilno skupino (CH₃) na različnih lokacijah in v različnem številu (Felton, 1995b). Na podlagi modelnega sistema, ki so ga izvedli Jägerstad s sodelavci, molekule nastajajo iz kreatina, prostih aminokislin, sladkorjev in nekaterih dipeptidov skozi Millardovo reakcijo in Strecker-jevo razgradnjo (Jägerstad in sod., 1983; Felton in sod., 2000) (Slika 2). Iz molekule kreatina se skozi ciklizacijo in z odcepitvijo molekule vode tvori spojina kreatinin, ki predstavlja aminoimidazolni del molekule. Produkti Strecker-jeve razgradnje, kot sta piridin in pirazin, nastala v Millardovi reakciji med aminokislino in heksozo, pa prispevajo preostali del skeleta molekul AIA (Jägerstad in sod, 1991; Milić in sod., 1993).

Glede na derivat, iz katerega nastanejo, termične HCA delimo v tri podskupine: imidazokinolinske derivate, kamor spada IQ (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin) in MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin), imidazokinoksalinske derivate, kamor uvrščamo DiMeIQx (2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin) ter imidazopiridinske derivate, kamor spada PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin) (Sanz Alaejos in sod., 2008). Večino mutagene aktivnosti v hitro pripravljene zapečeni hrani pripisujemo ravno tej skupini HCA (Felton in Knize, 1991).



Slika 2: Mehanizem tvorbe HCA (AIA), ki vključuje Millardovo reakcijo, Strecker-jevo razgradnjo in ciklizacijo kreatina (Turesky, 2010: 41).

Drugo skupino spojin, ki se formirajo pri temperaturah višjih od 300°C, imenujemo amino-karbolini ali pirolizni HCA (Slika 1). Pet členski heterociklični obroč se za razliko od AIA nahaja na sredini in ga obdajata dva šestčlenska obroča, pri čemer en ali oba predstavljata piridin. Karbolini imajo N-metilno skupino, za razliko od AIA, pripeto na enega od 6-členskih obročev, ali pa le ta manjka (Cheng in sod., 2006). Pirolizni HCA nastanejo s termičnim razpadom posameznih aminokislin kot so triptofan, glutaminska kislina, fenilalanin ali ornitin in proteinov, kot sta sojin globulin in kazein (Sugimura in sod., 1977; Sugimura, 1992). Pretvorba prekurzorjev pri visokih temperaturah povzroča nastanek reaktivnih prostih radikalov, ki kasneje kondenzirajo in tvorijo heterociklične strukture (Skog in sod., 2000). Amino-karboline glede na strukturo delimo v pet skupin, ki vsebujejo: tetraazafluorantensko, fenilpiridinsko, benzimidazolno, piridoimidazolno in piridoindolno obliko molekule (Turesky, 2010). Pirolizni HCA so v običajno pečenem mesu prisotni v veliko manjši meri kot AIA in so zato slabše raziskani (Cheng in sod., 2006). Amino-karboline lahko najdemo tudi v rastlinah, saj njihov nastanek ni pogojen s kreatin(in)om kot osnovnim gradnikom (Jägerstad in sod., 1998).

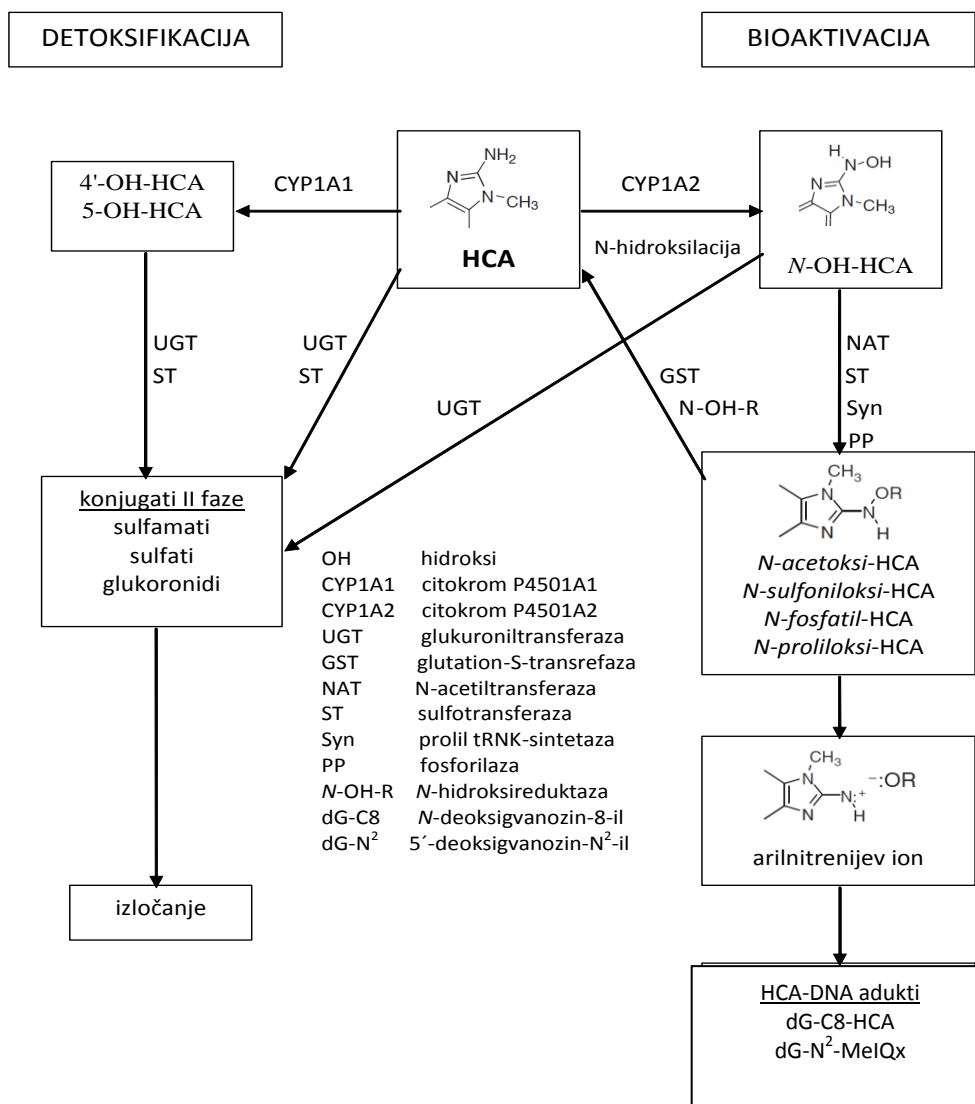
β-karbonili so HCA, ki nastajajo endogeno v organizmu. Skupino sestavljata dva HCA, norharman in harman. β-karbolini so prisotni tako v tobačnem dimu kot toplotno obdelanem mesu, kjer se pojavljajo v veliko večjih količinah kot običajni HCA (Totsuka in sod., 1999). Norharman in harman sta nemutageni spojin in v Ames testu na bakterijski kulturi

S.typhimurium v prisotnosti in odsotnosti S9 jetrnega aktivacijskega sistema ne kažeta mutagenih učinkov. Mutacije se pojavijo le s koinkubacijo dveh drugih molekul in sicer s spojino anilin ali *o*-toluidin (Totsuka in sod., 2006). Tako imenovan komutageni učinek izvira iz nastanka novih HCA (Hada in sod., 2006).

HCA lahko glede na polarnost razdelimo na polarne in nepolarne. Polarne spojine predstavljajo večinoma IQ- in IQ_x-molekule ter imidazopiridinski tipi karbonilov, nepolarne pa skupina molekul s piridoindolnim ali dipiridoimidazolnim delom molekule (Murkovic, 2004).

2.3 METABOLIZEM HETEROCIKLIČNIH AMINOV (HCA)

Človek je izpostavljen HCA predvsem zaradi uživanja toplotno obdelanega mesa (Felton in Malfatti, 2010). Ko snovi vstopijo v telo, so sprva izpostavljene želodčni kislini. Iz želodca vstopijo v tanko črevo in se preko krvnega obtoka prenesejo v jetra in druge organe (Felton, 1995b). Jetra veljajo za najbolj aktiven organ v procesu metabolizma HCA (Turesky, 2007). Metabolna aktivacija, z drugim imenom biotransformacija, je proces, pri katerem kemijske spremembe, ki jih povzroči reakcija tuje snovi z encimi citokrom P450, pretvorijo kemikalijo v bolj polarno obliko in posledično biološko bolj reaktivno spojino (Felton, 1995b). V osrednji poti biotransformacije so udeleženi encimi I. in II. faze metabolne aktivacije (Slika 3), kamor štejemo družino citokrom P450 (CYP), N-acetiltransferaze (NAT), sulfotransferaze (SULT), UDP-glukuroniltransferaze (UGT) in glutation-S-transferaze (GST). Glavni potek aktivacije HCA vključuje N-hidroksilacijo v I. fazi in zaestritev v II. fazi (Cheng in sod., 2006). Bioaktivacijo katalizira encim CYP1A2, ki preko N-oksidacije zunajciklične amino-skupine tvori N-hidroksi-HCA metabolite. Reakcijo v izvenjetrnih tkivih omogočata tudi encima CYP1A1 in CYP1B1 (Crofts in sod., 1998; King in sod., 2000b). Produkti I. stopnje metabolizma so genotoksični N-hidroksi-HCA, ki se vežejo na DNA, ali pa se naprej transformirajo pod vplivom encimov II. faze (Turesky, 2005). Adicija acetatne oz. sulfatne skupine na N-hidroksi metabolit poteče s pomočjo N-acetiltransferaze (NAT) oz. sulfotransferaze (SULT). Tvorijo se nestabilni estri, ki reagirajo z molekulo DNA in tvorijo adukte (Turesky, 2007). N-hidroksi estri se vežejo na C-8 in N² atom deoksivanina v DNA (Turesky in sod., 2005).



Slika 3: Potek metabolizma, ki vključuje reakcije detoksifikacije in aktivacije HCA (AIA) *in vivo* (Dashwood, 2002: 93; Schut in Snyderwine, 1999: 355).

V prvem koraku bioaktivacije encim CYP1A2 pretvori HCA v reaktivne N-hidroksi metabolite. Produkti v nadaljevanju reagirajo z encimom NAT ali ST (SULT). Nastanejo nestabilni HCA estri, ki se preko oblikovanja visoko reaktivnega arilnitrenijevega iona, povežejo z molekulo DNA in tvorijo DNA adukte. V procesu detoksifikacije HCA reagirajo z CYP1A1. Produkti se v drugi stopnji povežejo z različnimi molekulami, s pomočjo encimov UGT in GST, postanejo bolj polarni in se izločijo iz organizma.

CYP1A1 in 1A2 lahko HCA pretvorita tudi v nestrupene oblike, pri čemer katalizirata oksidacijo heterocikličnega obroča ali metilne skupine HCA (Turesky, 2007). Produkti delovanja encimov CYP, NAT in SULT, nekateri elektrofilni N-hidroksi-HCA ali N-hidroksi estri se lahko v procesu pretvorbe reducirajo nazaj do izvornih aminov. Reakcija poteče s pomočjo encima glutation-S-transferaze (GST), ki na HCA metabolite prenese molekulo glutationa (Turesky in sod., 2005). Pretvorbo v izvorne amine katalizira tudi NADPH reduktaza (King in sod., 2000a). N-hidroksi-HCA so izpostavljeni detoksifikaciji tudi z encimom UDP-glukuroniltransferazo (UGT), ki tvori stabilne konjugate glukuronidov.

Glukuronizacija in sulfamacija zunajcikličnih amino skupin nekaterih HCA sta pomembni alternativni metabolni poti pri številnih živalskih vrstah in človeku (Turesky in sod., 2005). Namen vezave reaktivnih HCA na specifične molekule, kot so glukoronid, glutation, acetat, sulfat, glicin, glutamin idr., je produkcija stabilnih in neškodljivih spojin ter olajšano izločanje molekul iz organizma (Sanz Alaejos in sod., 2008).

HCA se iz organizma primarno izločajo preko ledvic (Felton, 1995b). Urin je uporaben biološki pokazatelj prisotnosti HCA in njihovih metabolitov. Prisotnost heterocikličnih aromatskih spojin v urinu ne odraža vpliva na DNA poškodbe, temveč daje vpogled v relativno sposobnost posameznega organizma za bioaktivacijo in detoksifikacijo prokarcinogenov. Biomarkerji HCA, ki se nahajajo v urinu, se lahko uporabljajo za raziskave odnosa med izpostavitvijo HCA in aktivnostjo citokroma P450 1A2 ter encimi II. faze metabolne transformacije. Koncentracije HCA v urinu so pogosto pod mejo detekcije (Turesky, 2010). Večina študij, ki so proučevale človeški metabolizem s pomočjo urina, je bilo narejenih na molekulah MeIQx in PhIP. Spojini sta hitro absorbirani skozi gastrointestinalni trakt in izločeni v številnih metabolnih oblikah. Le nekaj odstotkov celotne izločene količine je predstavljala nespremenjena oblika molekul (Boobis in sod., 1994; Sinha in sod., 1995; Stillwell in sod., 1997; Turesky in od., 1998a; Kulp in sod., 2004; Walters in sod., 2004; Fede in sod., 2009).

2.4 POLIMORFIZEM GENOV METABOLNE AKTIVACIJE

Genetski zapis je odgovoren za raznolike odgovore organizma, ki je izpostavljen strupenim kemikalijam. Določitev nukleotidnega zaporedja človeškega genoma in odkritje številnih genetskih polimorfizmov sta omogočila razumevanje vpliva genetskih lastnosti na različne odzive med posamezniki (Orphanides in Kimber, 2003). Večina variabilnosti v zapisu DNA človeka izvira iz razlik v enem nukleotidu ali SNP (iz angl. single nucleotide polymorphism). Polimorfizem lahko spremeni biološko funkcijo na več načinov in vpliva na: a) spremenjeno povezovanje (splicing) mRNA (Kuehl in sod., 2001), b) aminokislinsko zaporedje proteina (Iida in sod., 2001), c) regulacijo in stopnjo izražanja proteina ali d) stabilnost, aktivnost in mesto delovanja encima (Marez in sod., 1997).

Encime, ki so vključeni v aktivacijo in detoksifikacijo HCA, kodirajo geni, ki so v človeški populaciji podvrženi številnim genskim polimorfizmom (Turesky, 2002). Razlike med posamezniki pomembno vplivajo na zmožnost in količino pretvorbe snovi v procesu metabolizma (Turesky, 2002) in se odražajo v različni dovzetnosti posameznikov za nastanek rakastega obolenja (Sanz Alaejos in sod., 2008).

Začetni metabolizem tujih snovi v glavni vrsti vršijo encimi družine citokrom P450 (Danielson, 2002; Nebert in Russell, 2002). Večina izmed *CYP* genov je podvržena genskemu polimorfizmu (Ingleman-Sundberg in sod., 1999; Nelson, 1999). Medvrstna odstopanja v genih *CYP1A2* so se kazala v različni stopnji izražanja gena, katalitični aktivnosti proteina in

specifičnem mestu oksidacije HCA, ki jo katalizira encim CYP1A2 (Turesky, 2010). Na izražanje človeškega jetrnega *P450 IA2* vpliva tako genski polimorfizem (Nakajima in sod., 1999; Sachse in sod., 2003) kot okoljski dejavniki in prehrana (Conney, 1982). Gen kodira vsaj deset različnih alelnih oblik (Chevalier in sod., 2001; Murayama in sod., 2004), številni med njimi pa izražajo različno katalitično aktivnost do mnogih HCA (Zhou in sod., 2004). Obstajata dve različici citokroma P450 CYP1A2 s hitrim in počasnim metaboličnim fenotipom (Sanz Alaejos in sod., 2008). Razlike vplivajo na toksikološke lastnosti molekul HCA, zaradi česar moramo biti pri interpretaciji škodljivega učinka določenega HCA na človeka pazljivi (Turesky, 2010).

Genski polimorfizem je prisoten tudi v genih, odgovornih za encime druge stopnje metabolizma (Strange in sod., 2001). Obsežen polimorfizem, kjer so identificirali več kot 50 različnih alelov, je bil dokazan pri genih, ki kodirajo NAT (Rovito in sod., 2005). Obstajata dve obliki N-acetiltransferaz, in sicer NAT1 in NAT2. Oba izoencima sta polimorfna in katalizirata tako N-acetilacijo (večinoma deaktivacija) kot O-acetilacijo (večinoma aktivacija) številnih HCA. Alelne različice *NAT1* in *NAT2* vplivajo na katalitično aktivnost in stabilnost proteina ter različno afiniteto do mnogih substratov (Hein in sod., 2000). Slednje je pripeljalo do delitve človeške populacije na počasne, srednje, hitre ter normalne acetilatorje (Jenne, 2002). Na izražanje fenotipa *NAT* vplivajo številni dejavniki. Pomembno vlogo imajo tako genetski in okoljski vplivi (Vesell in Gaylor, 1995), kot tudi relativna substratna specifičnost NAT2 encima (Weber in Hein, 1985; Weber, 1987). Najvišja aktivnost človeškega NAT2 encima naj bi bila v jetrih in prebavnem traktu, medtem ko je delovanje NAT1 izraženo v številnih drugih, nejetrnih tkivih (Hein in sod., 2000). Izpostavitve HCA poveča dovzetnost za nastanek raka v povezavi s polimorfizmom *NAT*. Številne epidemiološke študije predpostavljajo vpliv počasnih NAT2 acetilatorjev na nastanek raka na mehurju in hitrih NAT2 na razvoj raka na črevesju (Hein in sod., 2000).

SNP je značilen za gene, ki kodirajo encim sulfotransferazo (SULT) (Turesky, 2010). Spremembe v 1 nukleotidu gena se odražajo v treh alelih in označujejo *SULT1A1*1*, *1*2* in *1*3*. SULT1A1 katalizira reakcijo prenosa sulfatne skupine na HCA (Caughtrie in Johnston, 2001) in vpliva na bioaktivacijo številnih prokarinogenov in genotoksičnih spojin (Glatt, 2000). Polimorfizem gena *SULT1A1* vpliva na funkcionalne lastnosti proteina, in sicer na stabilnost in katalitično aktivnosti (Turesky, 2010) ter substratno specifičnosti encima (Nagar in sod., 2006).

2.5 GENOTOKSIČNOST HCA

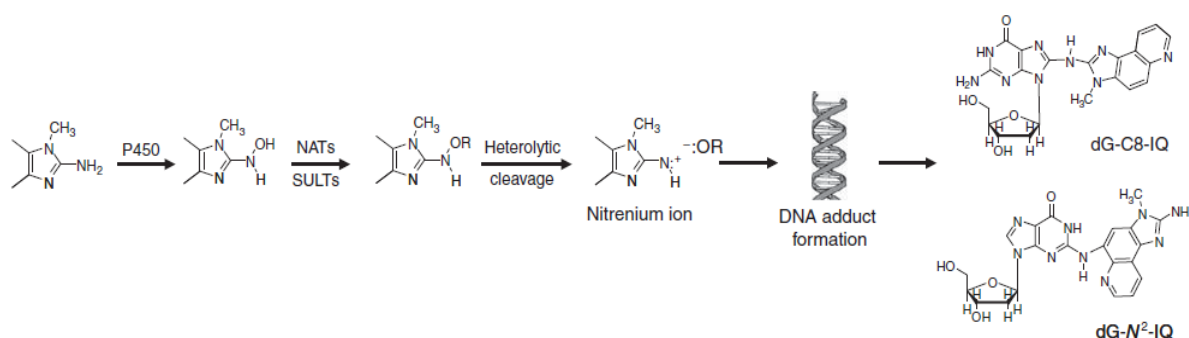
Številne snovi v okolju niso strupene, vse dokler ne pridejo v stik z organizmom in se znotraj celice v procesu bioaktivacije pretvorijo v reaktivno obliko (Abel, 1996). Primarno neškodljive snovi se preoblikujejo v elektrofilne molekule in postanejo genotoksične (Josephy in sod., 1997). Genotoksini so spojine, ki reagirajo z DNA in/ali z DNA povezanimi celičnimi sestavinami ter povzročajo vse oblike poškodb dednega materiala. Genotoksični učinki so

lahko prehodni (Dearfield in sod., 2002), dolgoročno pa se odražajo v mutagenih in karcinogenih pojavih (Fairbairn in sod., 1995). Mutagene snovi predstavljajo spojine, ki povzročajo poškodbe DNA s strukturnimi spremembami genov, medtem ko karcinogene snovi inducirajo nastanek tumorjev ali drugih malignih tvorb. Približno 80 do 90% mutagenih snovi je prav tako karcinogenih (Felton, 1995a). Glavni mutagen in karcinogen učinek je kovalentna vezava molekule ali le del karcinogena na DNA in posledično tvorba DNA aduktov (Jägerstad in Skog, 2005). Epidemiološke študije potrjujejo vpliv genotoksičnega delovanja HCA na zdravstveno stanje človeka (Cheng in sod., 2006).

2.5.1 DNA ADUKTI

Adukti so kovalentne povezave kemijskih spojin z velikimi molekulami, kot so DNA ali proteini. Najpogosteje se pojavijo po biotransformaciji kemikalije, ko se nastali reaktivni metaboliti povežejo z različnimi celičnimi komponentami. Adukti so pokazatelji izpostavljenosti posameznika karcinogenim snovem in obsegu bioaktivacije promutagenov. DNA adukti služijo kot biološki »markerji« pri ocenjevanju tveganja za nastanek raka (Felton, 1995b).

HCA so sposobni reagirati z DNA molekulo in tvoriti adukte (Slika 4) po metabolni aktivaciji v telesu (Pelkonen in sod., 2003; Jägerstad in Skog, 2005). DNA adukti se pojavljajo v zelo nizkih koncentracijah v različnih človeških tkivih in povzročajo poškodbe dednega materiala (Turesky, 2007). Povezave HCA z molekulo DNA in tvorba aduktov predstavljajo glavni vzrok za nastanek mutacij in posledično karcinogen potencial HCA (Schut in Snyderwine, 1999). DNA adukti nastanejo v reakciji med N-hidroksi-HCA metabolitom in purinsko bazo deoksigvanozinom (dG) (Schut in Snyderwine, 1999; Turesky in Vouros, 2004). Vez, ki povezuje HCA z verigo DNA, se večinoma tvori med oksidirano, zunajciklično aminske skupine HCA in C-8 atomom deoksigvanozina (Turesky in Vouros, 2004). V primeru IQ in 8-MeIQx lahko vez nastane tudi med N² atom dG in C-5 atomom heterocikličnega obroča HCA (Turesky in Vouros, 2004). Nedavno so identificirali, da molekuli IQ in MeIQx tvorita DNA adukte tudi na bazi adenina. Vez povezuje N⁶ atom adenina in C-8 atom molekule IQ oz. MeIQx. Adukti HCA povzročajo konformacijske spremembe v molekuli deoksiribonukleinske kisline in imajo pomembno vlogo pri nastanku mutacij. Med prepisovanjem DNA lahko povzročajo zamenjave baznih parov ali premike bralnega okvirja (Hoffmann in sod., 1997; Broyde in sod., 2008; Delaney in Essigmann, 2008).



Slika 4: Tvorba DNA aduktov preko metabolne aktivacije HCA (primer IQ) (Turesky, 2010: 65). Heterociklični amin IQ je v procesu oksidacije, ki jo katalizira encima CYP1A2, pretvorjen v N-hidroksi-IQ. Metabolit v nadaljevanju reagira z encimom NAT ali SULT, ki molekulo preoblikujeta v nestabilen ester. Produkt, N-acetoksi-IQ ali N-sulfoniloksi-IQ, se preko tvorbe visoko reaktivnega nitrenijevega iona poveže z DNA in tvori DNA adukt.

Zmožnost DNA adukta, da inducira nastanek mutacij, ali ustavi delovanje DNA polimeraze, se skriva v njegovi strukturi. Pomembno vlogo ima tudi oligonukleotidno zaporedje, ki DNA adukt obdaja (Hoffmann in sod., 1997; Broyde in sod., 2008; Delaney in sod., 2008), encim polimeraza in vrsta gostiteljske celice (Tan in sod., 2002). Struktura in pozicija vsakega posameznega HCA adukta ima svojevrsten učinek na natančnost in katalitično aktivnost polimeraze. Učinkovitost encimov nukleotidnega popravljalnega mehanizma, ki odstranjujejo poškodbe povzročene s tvorbo DNA aduktov, je odvisna od obsega strukturne spremembe. Glede na strukturno konformacijo se lahko nekatere povezave HCA z molekulo DNA odstranijo hitro, medtem ko se druge počasi (Culp in sod., 1993; Turesky in sod., 1997; Turesky, 2010). Nukleotidno izrezovanje DNA-HCA aduktov poteka na 3' koncu verige DNA (Felton in sod., 2007). Kljub majhni količini dG-N² aduktov v primerjavi z dG-C8 *in vitro* dodeljujejo prvemu (dG-N² aduktu), zaradi njegove stabilnosti v DNA verigi, večji pomen pri karcinogenih lastnostih HCA (Beland in Kadlubar, 1985; Turesky in sod., 1997).

2.5.2 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST HCA

Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC) je MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, (3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[3,4-b]indol) Trp-P-1, (3-amino-1-metil-5H-pirido[3,4-b]indol) Trp-P-1 in Glu-P-2 označila kot možni (skupina 2B) in IQ kot kot verjetni (skupina 2A) človeški karcinogen (Cheng in sod., 2006).

Prve učinke HCA v *in vitro* pogojih so preverjali z Amesovim testom mutagenosti na prokariotskih celicah. V ta namen so v številnih študijah uporabili bakterijske kulture *S. typhimurium* sev TA98, ki kaže linearen odnos med indukcijo mutacij in količino testirane snovi (Sugimura, 1997). Visok potencial HCA za premik bralnega okvirja v omenjenem sevu izvira iz tvorbe DNA aduktov, ki povzročajo delecijo CG baznega para (Shibutani in sod., 1999; Choi in sod., 2006).

Razlike med najšibkejšim in najmočnejšim mutacijskim delovanjem HCA so eksponentne narave in se lahko razlikujejo tudi za faktor $>10^6$ (Kosakarn in sod., 1993; Watanabe in sod., 1993; Solomon in sod., 1996). MeIQx, 8-MeIQx in IQ so v testu povratnih mutacij najmočnejši mutageni (Maron in Ames, 1983; Sugimura, 1988; Sugimura in sod., 2004), mutagenost PhIP pa je pri enakih pogoji od 100 do 1000-krat manjša (Turesky, 2010). Potencial mutagenosti HCA je odvisen od kemijske strukture spojine in sposobnosti molekule, da tvori visoko reaktiven nitrenijev ion. Metabolno aktivni produkti, kot so terciarni amini (NR_2^+) in N-hidroksi-HCA metaboliti, lahko reagirajo z DNA in tvorijo adukte (Turesky, 2010). Majhne spremembe v strukturi molekul imajo lahko velik vpliv na mutagenost HCA. Povečano mutageno delovanje se pojavi, če je na imidazolni obroč HCA vezana metilna skupina, pomembno vlogo pa ima tudi število CH_3 skupin in njihovo mesto v pet-členskem obroču (Felton, 1995b).

Hitri bakterijski testi, ki se uporabljajo za preverjanje mutagenosti HCA, so uporaben pripomoček za ocenjevanje mutagenega potenciala spojin v kompleksnih izvlečkih, pridobljenih iz hrane, in lahko služijo za spoznavanje lastnosti encimov, vpletenih v bioaktivacijo HCA (Sugimura in sod., 2004). Po potencialu mutagenosti si AIA v Ames testu sledijo v sledečem zaporedju: MeIQ> IQ> DiMeIQx>MeIQx>PhIP (Felton in Knize, 1991). Dejansko ocenjevanje tveganja zaradi uživanja HCA v prehrani običajno ocenjujemo na podlagi učinka MeIQx in PhIP (Turesky, 2007).

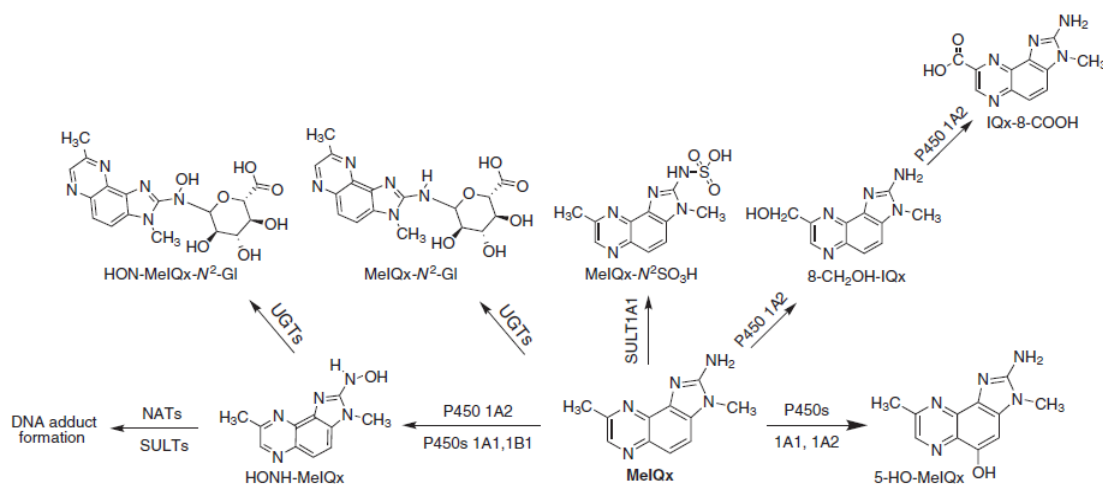
Visok genotoksičen potencial nekaterih HCA izvira iz točkovnih mutacij (Beland in Kadlubar, 1985). Odstopanja v zmogljivosti za nastanek poškodb dednega materiala različnih HCA se v bakterijskih testih lahko močno razlikujejo (Wu in sod., 1997), medtem ko so v sesalčjih tkivnih kulturah te razlike bistveno manjše (Sugimura in sod., 2004). Vzroki neskladja različnih testnih modelov so v različnih eksogenih in endogenih metabolnih aktivacijskih sistemih, različni učinkovitosti DNA popravljalnih mehanizmov, različni občutljivosti za nastanek mutacij, različnih DNA zaporedij in vplivu sosednjih zaporedij na tvorbo HCA-DNA aduktov (Turesky, 2007).

Deset HCA, med njimi MeIQx in PhIP, sprožijo ob daljši izpostavitvi nastanek tumorjev na glodavcih. Ugotovili so, da se je rak razvil v ustni votlini, želodcu, jetrih, pljučih, debelem črevesju, prostati in mlečnih žlezah (Turesky, 2007). Kljub velikim razlikam v genotoksičnem potencialu HCA so razlike v zmogljivosti tvorbe rakastega tkiva pri glodavcih manjše in se gibljejo znotraj 10-kratnega ranga (Sugimura in sod., 2004). Raziskave na človeku podobnih primatih so pokazale, da je molekula IQ ena od močnejših jetrnih karcinogenov (Turesky, 2007).

2.5.2.1 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST MeIQx

MeIQx velja za možen človeški karcinogen. Dejstvo podpirajo številne raziskave karcinogenosti na eksperimentalnih živalih in podatki o genotoksičnem potencialu (NTP, 2002). MeIQx povzroča mutacije na različnih kulturah (bakterijskih in sesalčjih) in tvorbo rakastega tkiva na glodavcih (Kang in sod., 2007). Pri miših in podganah, ki so bile hranjene z MeIQx, se je tumor pojavil v različnih tkivih. Pri miših je MeIQx povzročil raka na jetrih pri obeh spolih, pljučni tumor pri samicah in limfom ter levkemijo pri samcih. Pri podganah se je tumor pri samicah in samcih razvil na jetrih in obušesni žlezi, kožni tumor se je razvil pri samcih, pri samicah pa je rak nastal na žlezi ob klitorisu (NTP, 2002). MeIQx je predlagan kot možni povzročitelj povečanega tveganja za nastanek črevesnega adenoma in pljučnega raka (Sinha in sod., 2001).

MeIQx spada v skupino AIA, ki po metabolni aktivaciji tvorijo reaktivne metabolite, ki lahko reagirajo z DNA molekulo in tvorijo DNA adukte (Slika 5). Poleg običajne tvorbe na C-8 atomu gvanina lahko MeIQx sproži nastanek adukta tudi na N² mestu nukleotidne baze gvanina (Herman in Synderwine, 1999). Natančen mehanizem delovanja MeIQx še ni popolnoma raziskan (Kang in sod., 2007). Karcinogen potencial spojine se lahko spreminja pod vplivom različnih dejavnikov, vključno z interakcijami kompleksnih mečanih HCA (NTP, 2002). Najvišje koncentracije MeIQx se tvorijo v dobro pečenem piščančjem in govejem mesu ter šunki (Sinha in sod., 1995), prisoten pa je tudi v vinu in aromah toplotno odelane prehrane (NTP, 2002).



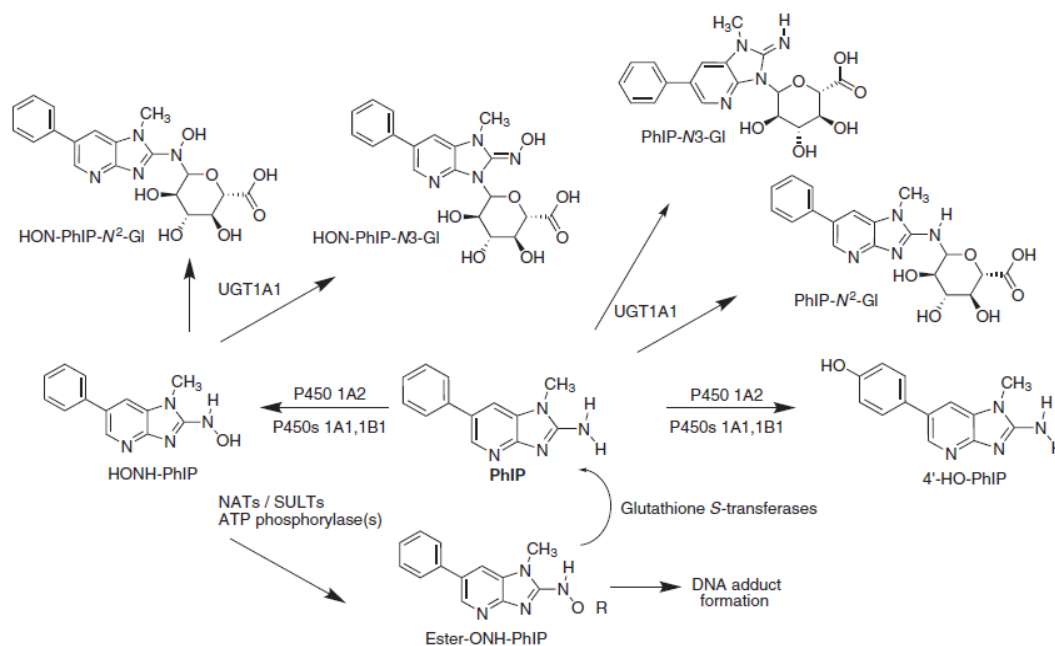
Slika 5: Glavne poti v procesu metabolizma molekule MeIQx (Turesky, 2010: 55).

2.5.2.2 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST PhIP

PhIP je možen človeški karcinogen. Molekula je količinsko najbolj zastopan HCA v pečenem mesu govedine, svinjine in perutnine (NTP, 2002). Količina dnevne vnosa PhIP je ocenjena na od nekaj nanogramov do več 10 mg/dan (Layton in sod., 1995). Karcinogenost PhIP je potrjena na številnih eksperimentalnih modelih. Pri miših, ki so bile hranjene s PhIP, se je limfom razvil pri obeh spolih, rak na tankem črevesu pa le pri samcih. Pri podganah se je pri

samcih razvil limfom in rak na prostati ter tankem in debelem črevesu, samice pa so bile dovzetne za tumor na mlečnih žlezah (NTP, 2002). PhIP kaže povečano tveganje za nastanek raka na prsni in želodcu (De Stefani in sod., 1997 in 1998; Delfino in sod., 2000; Sinha in sod., 2000a) nima pa vpliva na razvoj raka na mehurju, ledvicah, pljučih ter prostati in črevesju (Augustsson in sod., 1999; Norrish in sod., 1999; Sinha in sod., 2000b).

Biotransformacija je za mutagen in karcinogen učinek molekule PhIP nujno potrebna (Slika 6). Začetno bioaktivacijo vršijo encimi I. faze metabolizma, družina citokromov P450. CYP1A2 in 1A1 pretvorita PhIP v hidroksiliran produkt, HONH-PhIP, ki je sam po sebi mutagen (Holme in sod., 1989; Kaderlik in Kadlubar, 1995). V nadaljnjem procesu aktivacije je vmesni metabolit podvržen encimu NAT ali SULT in nastane biološko še bolj reaktivna oblika molekule. Produkta zaestritve sta O-sulfonil ali O-acetilester, ki imata zaradi svoje elektrofilne narave sposobnost vezave na DNA in celične proteine (Buonarati in sod., 1990). PhIP povzroča verižne prelome DNA, izmenjavo sestrskih kromatid in tvori DNA adukte v *in vitro* in *in vivo* pogojih (Buonarati in sod., 1990 in 1991; Synderwine in sod., 1994; Fan in sod., 1995; Dragsted in sod., 1995; Thompson in sod., 1998).



Slika 6: Glavne poti v procesu metabolizma molekule PhIP (Turesky, 2010: 55).

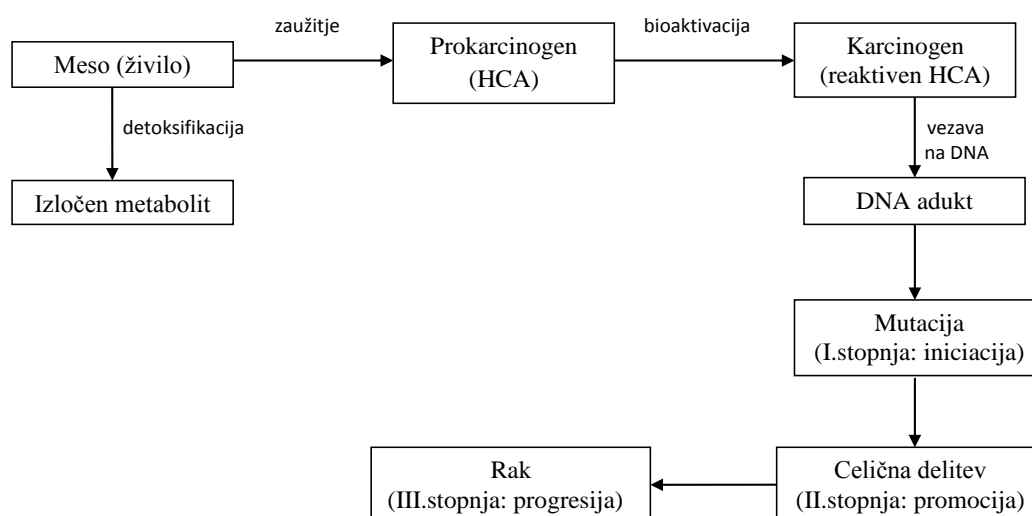
MeIQx in PhIP povzročata mutacije *in vivo* na glodavcih ter *in vivo* na bakterijskih, sesalčjih in človeških celičnih kulturah. V primerjavi z drugimi dobro poznanimi mutageni, npr. BaP – benzo(a)pirenom, HCA izražata večji potencial za nastanek dednih sprememb. Spojini povzročata zamenjave sestrskih kromatid, oblikovanje mikrojedr, nepredvidljivo sintezo DNA in spremembe v številu ali strukturi kromosomov (IARC, 1993; NTP, 2002). Skozi proces bioaktivacije se MeIQx in PhIP pretvorita v reaktivne ione, ki v interakciji z DNA tvorijo adukte. Frekvenca pojavljanja DNA aduktov pri enaki dozi izpostavitve je pri človeku v primerjavi z glodavci višja. Izkupiček induciranih aduktov je odvisen od količine MeIQx in PhIP in je povezan z nastankom karcinogeneze na eksperimentalnih živalih (NTP, 2002).

2.5.2.3 MUTAGENOST IN KARCINOGENOST DiMeIQx

DiMeIQx je eden izmed HCA, ki tvori DNA adukte (Frandsen in sod., 1994) in kaže vpliv na povečano napredovanje karcinogenega procesa na pankreatičnih vodih (Yoshimoto in sod., 1999). Nastane pri toplotni obdelavi mesa, prav tako pa je prisoten tudi v hlapih, ki se sproščajo pri pečenju govejega in svinjskega mesa (Sinikka in sod., 1993). V Ames testu na bakteriji *S. typhimurium* sev TA1538 spojina kaže izjemno visok mutagen potencial, v prisotnosti povečanega izražanja N-acetiltransferaze (NAT) pa se število mutacij še poveča (*S. typhimurium* sev YG1019). V testu mikrojedr na celicah človeškega limfoblasta DiMeIQx izkazuje največjo aktivnost v tvorbi mikrojedr in tudi citotoksičnemu vplivu v primerjavi z aktivnostjo MeIQx in PhIP ter nekaterimi drugih HCA (Pfau in sod., 1999). DiMeIQx so identificirali tudi v nekaterih izdelkih pečenega piščančjega in svinjskega mesa, v koncentraciji 0.4 do 0.35 ng/g mesa, vendar v Ames testu na bakteriji *S. typhimurium* sev TA98 ni bilo opazne povezave z mutagenim učinkom (Tikkanen in sod., 1993).

2.6 RAK IN HCA

Človek je s hrano izpostavljen številnim snovem, ki so lahko koristne in potrebne za ohranjanje zdravja, ali škodljive in vplivajo na nastanek različnih bolezni. Trditev, da toplotno obdelani prehranski izdelki vsebujejo mutagene snovi, je napačna. Toplotno obdelana hrana vsebuje promutagene spojine, ki se kasneje v metabolizmu s pomočjo številnih encimov pretvorijo v eno ali več reaktivnih mutagenih oblik (Felton, 1995a). Pojav mutacij v somatskih celicah je ključni dejavnik v začetnih stopnjah nastanka raka (Gatehouse in sod., 1990; Mortelmans in Zieger, 2000; MacGregor in sod., 2000; Flamand in sod., 2001). Številne epidemiološke in populacijske študije so izpostavile hrano in prehranske navade kot enega izmed ključnih dejavnikov, ki pripomorejo k nastanku rakavih obolenj (Luch, 2005).



Slika 7: Potek nastanka raka preko zaužitja in metabolne pretvorbe prokarcinogena (HCA) (prirejeno po Felton, 1995b: 8).

Pot, ki vodi v nastanek rakavega obolenja zaradi izpostavitve HCA (Slika 7), je kompleksna in dolgotrajna ter vključuje številne kemijske reakcije, encime, metabolite, inhibitorje in gene, ki vplivajo na to, ali bo posameznik nagnjen k nastanku tumorja, ali ne (Felton, 1995b). Proces nastanka raka vključuje več stopenj:

- zaužitje; človek zaužije oz. se prehranjuje s hrano, kot je npr. pečeno meso, ki vsebuje promotagene HCA,
- bioaktivacija; po vstopu in absorpciji skuša organizem izločiti tuje snovi iz telesa. Aktivirajo se znotrajcelični encimi, ki katalizirajo reakcije pretvorbe spojin. Nastali metaboliti imajo visok potencial reagiranja s celičnimi komponentami,
- DNA adukti; reaktivne molekule se kovalentno vežejo na specifične atome v molekuli DNA in tvorijo DNA adukte,
- mutacije; strukturne spremembe, ki jih povzročijo nastale poškodbe, lahko vplivajo na nastanek napak pri podvajanju DNA. V proces se vključijo popravljalni mehanizmi. Poškodbe se popravijo, ali ostanejo in se prenesejo na hčerinske celice,
- celična delitev; v nekaterih primerih se mutacije pojavijo v genih, ki regulirajo podvajanje DNA in celično delitev, kar vodi v nastanek tumorja. Pomembne gene predstavljajo tumor-supresorski geni in proto-onkogeni (Felton, 1995b).

Za nastanek in razvoj raka so pomembni številni dejavniki, med katere spada genetska predispozicija, življenjski slog posameznika in mnogi okoljski dejavniki (Luch, 2005). Podedovane lastnosti lahko vplivajo na obseg bioaktivacije in detoksifikacije ksenobiotikov po absorpciji v telo, sposobnosti popravljalnih mehanizmov, ki vplivajo na končni obseg DNA poškodb, in stopnji delitve celic tarčnega tkiva (Felton, 1995b).

Pri ocenjevanju tveganja za nastanek različnih bolezni povezanih z uživanjem HCA so potrebni podatki o njihovi količini v živilu (Ristic in sod., 2004). Koncentracije policikličnih aromatskih aminov v pečenem mesu so odvisne od vrste mesa in načina priprave živila (Sinha in sod., 1995; Sinha in sod., 1998). Glavni pomen pri kuhanju ima temperatura in čas toplotne obdelave hrane. Dejavnika, ki lahko pripomoreta k tveganju za nastanek raka sta tudi pogostost uživanja mesa in v hrani prisotne sestavine, kot so antioksidanti, vitamini, fenoli, karotenoidi, ipd. (Bacon in sod., 2003; Cheng in sod., 2006). Pečeno meso vsebuje poleg HCA tudi druge karcinogene spojine. V nizkih koncentracijah so prisotni policiklični aromatski ogljikovodiki, N-nitrozo spojine, maščobni peroksidi in druge prooksidativne spojine. Karcinogen potencial pečenega mesa zato ni odvisen zgolj od vsebnosti HCA, temveč tudi od kompleksne mešanice genotoksičnih komponent (Cross in Sinha, 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA

3.1.1 KEMIKALIJE

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij

kemikalija	Proizvajalec, država	kataloška številka
Benzo(a)piren (BaP)	Sigma, St. Louis, ZDA	B-1760
DMSO	Sigma, St. Louis, ZDA	154938-1L
EDTA	Sigma, St. Louis, ZDA	E5134-500G
etanol	Sigma, St. Louis, ZDA	32221
etidijev bromid	Gibco BRL, VB	15585-011
FBS	Euro Clone, Italija	EC S0180L
glukoza-6-fosfat	Sigma, St. Louis, ZDA	G-7879
HCl	Merck, Nemčija	1.09063.1000
KCl	Fluka, Nemčija	60130
4 mM (2%) L-glutamin	Euro Clone, Italija	EC B3000D
LMP agaroz	Invitrogen, VB	15517-022
MgCl ₂ x6H ₂ O	Fluka, Nemčija	63072
MgSO ₄ x7H ₂ O	Fulka, nemčija	63140
MTT	Sigma, St. Louis, ZDA	M-5655
NaCl	Merck, Nemčija	1.06404.100
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	Merck, Nemčija	1.06346.0500
Na ₂ HPO ₄	Fluka, Nemčija	71640
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	Merck, Nemčija	1.06580.1000
Na ₂ CO ₃	Sigma, St. Louis, ZDA	S-2127
NaOH	Merck, Nemčija	1.06482.1000
NMP agaroz	Invitrogen, VB	16500-100
PBS (10x)	PAA, Pasching, Avstrija	H15-011
penicilin/streptomycin	Euro Clone, Italija	EC B3001D
S9	Moltox, ZDA	11-01L.2
tripansko modrilo	Sigma, St. Louis, ZDA	T-8154
tripsin	Sigma, St. Louis, ZDA	T-4174
TRIS	Merck, Nemčija	1.08382.1000
Triton X-100	Fluka, Nemčija	93420
Williamsov medij	Sigma, St. Louis, ZDA	W1878
MeIQx	Toronto Research Chemicals, North York	A606600
PhIP	Toronto Research Chemicals, North York	A617000

Citohalazin B	Sigma, St. Louis, ZDA	C-6762
Formaldehid	Sigma, St. Louis, ZDA	533998-500ML
Metanol	Sigma, St. Louis, ZDA	M1775-1GA
Nutrient Broth N°2 Oxoid	Oxoid, VB	CM0067
Fosfatni pufer	PAA, Pasching, Avstrija	H15-011
Trizol reagent	Invitrogen, VB	15596-018
Kloroform	Sigma, St. Louis, ZDA	366919-1L
Glikogen	Sigma, St. Louis, ZDA	6-8751
Izopropilalkohol	Sigma, St. Louis, ZDA	19,076-4
High capacativ cDNA	Applied Biosystem, ZDA	4368813
TaqMan PCR Master mix	Applied Biosystem, ZDA	4304437
Ocetna kislina	Merck, Nemčija	607:002-00-6
Akridin oranž	Sigma, St. Louis, ZDA	318337-16
Primer kit <i>CYP1A1</i> , <i>CYP1A2</i> , <i>NAT2</i> , <i>UGT</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> , <i>MDM2</i> , <i>CDKN1A</i> <i>GAPDH</i>	Applied Biosystem, ZDA	Hs00153120_m1, Hs01070374_m1, Hs006605099_m1, Hs02511055_s1, Hs99999001_ml, Hs00608023_m1, Hs00234753_m1, Hs00355782_m1, 4310884E,

3.2 METODE DELA

3.2.1 PRIPRAVA HCA IZVLEČKA PIŠČANČJEGA MESA

HCA izvlečke iz pečene perutnine je pripravil dr. Tomaž Polak z Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Zrezke piščančjega mesa, debeline 20 mm, so toplotno obdelali na dvoploščnem žaru pri temperaturi 220°C, do dveh središčnih temperatur, 70°C in 90°C. HCA so ekstrahirali iz 3 mm debele skorje in iz sredice piščančjega zrezka. Homogenizirane vzorce so raztopili v 1 M NaOH in jih 12 ur mešali na magnetnem mešalu pri 500 obratih/min. Prvo ekstrakcijo so izvedli na diatomejski zemlji Extrelut z etilacetatom kot ekstrakcijskim topilom. Sledila sta čiščenje vzorcev z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE; iz angl. solid phase extraction) in evaporacija končnega izvlečka v toku dušika. SPE metoda je potekala na kolonah Oasis MCX z etilacetatom, kot ekstrakcijskim topilom.

3.2.1.1 DOLOČANJE HCA V MESNEM IZVLEČKU

Vsebnost HCA v izvlečkih so določili dr. Tomaž Polak in sod. v skladu z metodami: Murkovic, Weber, Geiszler, Frohlich in Pfannhauser (1999), Zöchling in Murkovic (2002) in Messner in Murkovic (2004), z manjšimi spremembami, ki so opisane v člankih Polak in sod. (2008 in 2009).

Del izvlečkov so pred analizo na LC-MS/MS (tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo) raztopili v metanolu. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je potekala na sistemu Adilent 1100. Uporabili so gelsko kolono z reverzno fazo, podjetja Tosho Bioscience GmbH. Kromatografija je potekala z gradientom mobilne faze A: 20 mM amonijev formiat s pH 3.2 in mobilne faze B: acetonitril, pri konstantnem pretoku 0.3 mL/min. Program gradienta je bil: 95% A, 0–0,5 min; 95%–80% A, 0,5–15 min; 80%–40% A, 15–18 min; 40% A, 18–24 min; 40%–95% A, 24–27 min; 95% A, 27–40 min. HCA so določili na podlagi retencijskih časov in m/z posameznih standardov HCA. Za detekcijo posameznih HCA so uporabili masnoselektivni detektor (Waters, Quattro micro API) v ESI+ načinu. Sušenje v toku dušika je potekalo pri temperaturi 350 °C in pretoku 10 L/min. Detekcija na masnem detektorju je potekala v SIR načinu.

3.2.2 TESTI NA BAKTERIJAH - AMESOV TEST

3.2.2.1 OPIS METODE

Amesov test je široko uporabljena metoda za zaznavanje dejavnikov, ki povzročajo mutacije v genih. Za ugotavljanje mutagenosti preiskovane snovi se uporablja različne od histidina odvisne seve bakterije *S. typhimurium* ali od triptofana odvisne seve *Escherichia coli*. Vsak testni sev ima drugačno mutacijo v histidinskem oz. triptofanskem operonu, zaradi česar ni

sposoben sintetizirati posamezne aminokislino, ki je nujno potrebna za rast. Sevi so tudi specifično občutljivi na delovanje različnih mutagenov, kar nam omogoča identifikacijo posameznih razredov mutagenih spojin. Amesov test z bakterijo *S. typhimurium* sta razvila B. N. Ames in Maron okrog leta 1970 (Maron in Ames, 1983). Sprva so test uporabljali za testiranje mutagenosti različnih vrst čistih kemikalij, danes pa ga uporabljamo tudi za preverjanje genotoksičnega učinka različnih kompleksnih vzorcev. Mutacije na mestu predhodnih mutacij, ali v njihovi bližini, lahko obnovijo funkcijo gena in na ta način bakterijam omogočajo ponovno sintezo aminokislin. Take bakterije imenujemo prototrofi (His+/Trp+) in v gojišču brez histidina oz. triptofana tvorijo kolonije. Bolj kot je neka snov mutagena, večje je število povratnih mutacij, kar posledično poveča število razraslih revertantnih kolonij.

Prednosti Ames testa so hitrost, zanesljivost, nizek strošek in obsežna podatkovna baza, pomankljivosti pa predstavljajo razlike med zgradbo in delovanjem evkariontske in prokariontske celice ter predvsem odsotnost nekaterih metabolnih encimov. Pomankljivost se nanaša predvsem na ekstrapolacijo morebitnega mutagenega potenciala testirane snovi na človeka.

3.2.2.2 *SALMONELLA TYPHIMURIUM* sev TA98

Sev bakterije *S. typhimurium* TA98, ki smo ga uporabili v Amesovem testu, je pridobljen iz bakterije *S. typhimurium* LT2. Sev TA98 ima prisotne mutacije v različnih genih na histidinskem operonu in je odvisen od aminokislino histidin. Specifična tarčna sekvenca *S. typhimurium* TA98 je hisD3052. S tem sevom prepoznavamo mutacije, kjer pride do -1 premika bralnega okvirja blizu ponavljajočega se zaporedja -C-G-C-G-C-G-C-G- (»hot spots«). Če pride do mutacije, ki povzroči delecijo baznega para, se ponovno vzpostavi normalno stanje (divji tip) in pravilno bralno zaporedje bakterijam omogoča rast na minimalnem glukoznem gojišču brez His.

3.2.2.2.1 GOJENJE *S. typhimurium*

Bakterijo *S. typhimurium* smo dan pred izvedbo Amesovega testa nagojili v hranilnem gojišču. Sev TA98 hranimo na -80°C. Odtaljeno kulturo smo inokulirali v hranilni bujon (Nutrint Broth N°2 Oxoid) z ampicilinom (25 µg/ml) in centrifugirko inkubirali čez noč na 37°C z rahlo odvitim pokrovčkom, s čemer smo zagotovili dostop zraka in s tem zadostno prezračenje. Pred izvedbo testa smo bakterijsko kulturo 1.5 do 2 uri stresali na stresalniku pri 600 obratih/minuto na 37°C.

3.2.2.3 **METABOLNA AKTIVACIJA S9**

Številne karcinogene snovi, med katere spadajo tudi HCA, se primarno nahajajo v biološko neaktivni obliki. Proces, pri katerem prihaja do pretvorbe neškodljivih snovi v njihovo strupeno obliko, imenujemo biotransformacija. Transformacijo karcinogenih snovi vršijo številni metabolni encimi. Pri ljudeh in živalih takšne reakcije omogoča metabolni oksidacijski sistem citokrom P450, ki se nahaja večinoma v jetrih in do določene mere tudi v drugih tkivih. Encimi metabolizirajo kemikalije v reaktivne elektrofilne oblike, ki se lahko kovalentno povežejo s celičnimi sestavinami in povzročajo mutacije. Bakterije takšnega metabolnega sistema nimajo, zato biološka aktivacija brez dodanega ustreznega kompleksa encimov ni mogoča. V testu smo uporabili eksogen metabolni aktivacijski sistem S9 glodalskega izvora (Moltox, ZDA). S9 je mikrosomalna frakcija pridobljena iz podganjih jeter, v kateri so ohranjeni encimi metabolne aktivacije. Živali navadno tretirajo s polikloriniranim bifenilom (Aroklor 1254) s čimer povečajo raven presnovnih encimov. Podgane po 5 dneh žrtvujejo, jetra pa homogenizirajo in raztopijo v pufru. Tako pripravljeno frakcijo S9 hranimo v skrinji na -20°C (Maron in Ames, 1984).

Slabosti zunanjega aktivacijkega sistema pri interpretaciji škodljivega potenciala trestirane snovi predstavljajo: ločeno mesto bioaktivacije mutagena in bakterijskega dednega materiala (bariera v obliki bakterijske celične stene), razlike med bioaktivacijskimi procesi glodalcev in človeka (Josephy in sod., 1997) ter razlike v delovanju prokariontske in evkariontske celice (absorbcija, izločanje, metabolizem, porazdelitev) (Gatehouse in sod., 1990).

3.2.2.4 **PRIPRAVA GOJIŠČ**

Plošče minimalnega glukoznega gojišča

Preglednica 2: Minimalno glukožno gojišče.

Sestavine za 1000 mL:	
Agar	15 mL
Destilirana voda	930 mL
50x VB soli	20 mL
40% glukoza	50 mL

Agar smo dodali v steklenice za avtoklaviranje v destilirano vodo ter mešali z magnetnim mešalom ob segrevanju ($\approx 50^{\circ}\text{C}$) dokler se agar ni raztopil. Raztopino smo avtoklavirali 20 min pri 121°C . Nato smo sterilno dodali sterilno raztopino 50x VB soli in 40% glukozo (ti smo avtoklavirali ločeno). Raztopino smo premešali, razlili v petrijevke (v vsako približno 30 ml gojišča) in počakali, da se je agar strdil. Plošče smo hranili v obrnjenem položaju v plastičnih vrečkah na hladnem.

Vogel-Bonner soli (50x VB soli)

Preglednica 3: Vogel-Bonner soli (50x VB soli).

Sestavine za 1000 mL:	
Destilirana voda	670 mL
Magnezijev sulfat ($MgSO_4 \times 7 H_2O$)	10 g
Citronska kislina monohidrat	100 g
Kalijev fosfat anhidrid (K_2HPO_4)	500 g
Natrijev amonijev fosfat ($NaH_2N_2PO_4 \times 4 H_2O$)	175 g

Soli smo dodali v toplo destilirano vodo v navedenem vrstnem redu (vedno smo počakali, da se je ena sol raztopila in šele nato smo dodali naslednjo). Raztopino smo avtoklavirali 20 min pri 121°C, nato pa smo jo hranili v hladilniku.

40% glukoza

Preglednica 4: 40% glukoza.

Sestavine za 100 mL:	
Destilirana voda	100 mL
Glukoza	40 g

Glukozo smo raztopili v destilirani vodi ob mešanju z magnetnim mešalom in segrevanjem ($\approx 50^\circ C$). Raztopino 40% glukoze smo avtoklavirali 20 min pri 121°C, nato pa smo jo hranili v hladilniku.

Top agar

Preglednica 5: Top agar.

Sestavine za 1000 mL:	
Agar	6 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	1000 mL

Agar in sol smo raztopili v destilirani vodi ob mešanju z magnetnim mešalom in segrevanju ($\approx 50^\circ C$). Raztopino smo avtoklavirali 20 min pri 121°C, nato pa smo jo hranili v hladilniku. Pred uporabo smo dodali histidin/biotin (5 mM) s končno koncentracijo 0.05 mM.

Raztopina histidin/biotin (5 mM)

Preglednica 6: Raztopina histidin/biotin (5 mM)

Sestavine za 50 mL:	
D-biotin	61.8 mg
L-histidin	48 mg
Destilirana voda	50 mL

Biotin smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici, raztopili smo tudi histidin. Raztopino smo avtoklavirali 20 min pri 121°C, nato pa smo jo hranili v hladilniku.

Hranilno gojišče za bakterije

Preglednica 7: Hranilno gojišče za bakterije

Sestavine za 1000 mL:	
Nutrint Broth N°2 Oxoid	25 mL
Destilirana voda	1000 mL

Hranilni agar smo raztopili v destilirani vodi ob mešanju z magnetnim mešalom in segrevanju (~50°C). Raztopino smo avtoklavirali 20 min pri 121°C, nato pa smo jo hranili v hladilniku.

Fosfatni pufer (NaHPO₄, pH 7.4)

Preglednica 8: Fosfatni pufer (NaHPO₄, pH 7.4).

Sestavine za 500 mL:	
0.2 M natrijev dihidrogen fosfat	60 mL
0.2 M dinatrijev hidrogen fosfat	500 mL

0.2 M raztopini natrijevega dihidrogen fosfata in dinatrijevega hidrogen fosfata smo zmešali v navedenih volumnih in umerili pH na 7.4 (če je bil pH prenizek, smo dodali 0.2 M dinatrijev hidrogen fosfat). Pufer smo avtoklavirali 20 min pri 121°C.

Metabolna aktivacija S9

Preglednica 9: 4% metabolno aktivna frakcija S9.

Sestavine za 10 mL:	
1 M KCl	330 µL
0.2 M MgCl ₂ x 6H ₂ O	320 µL
0.2 M glukoza-6-fosfat	250 µL
0.2 M NADPH	1000 µL
0.2 M NaHPO ₄	500 µL
sterilna H ₂ O	2700 µL
raztopina S9	400 µL

Sprva smo pripravili mešanico vseh raztopin, razen sterilne vode in S9 jetrne frakcije. Raztopino soli smo sterilizirali s filtriranjem skozi z 0.22 µm membranski filter (Corning Costar Corporation, New York, ZDA). Tik pred uporabo smo sterilno dodali še ustrezen volumen sterilne vode in S9 frakcije. Med testom smo pripravljeno S9 mešanico imeli ves čas na ledu.

3.2.2.5 **POTEK DELA**

Amesov test, s katerim smo preverili mutagen vpliv HCA iz izvlečka skorje in sredice pečene perutnine, smo izvedli po protokolu standardnega testa z vgradnjo v ploščo. Uporabili smo bakterijo *S. typhimurium* sev TA98, ki je občutljiv na -1 premike bralnega okvirja in v primerjavi z ostalimi sevi, kaže večjo občutljivost na HCA.

Bakterije *S. typhimurium* TA98, ki smo jih čez noč gojili pri 37°C, smo dve uri pred začetkom testa stresali na stresalniku pri 600 obratih/minuto na 37°C. Bakterije so v času inkubacije prešle v eksponentno fazo rasti, mi pa smo si v tem času pripravili redčine vzorcev, aktivacijsko mešanico S9 in top agar. Izvlečka HCA pečene perutnine smo redčili 10, 20, 40 in 80-krat za vzorec sredice in 100, 200, 400 in 800-krat za vzorec skorje. Na ta način smo dobili končne koncentracije 10, 5, 2.5 in 1.25 µL izvlečka/ploščo za vzorec sredice in 1, 0.5, 0.25 in 0.125 µL izvlečka/ploščo za vzorec skorje. Izvleček smo redčili v destilirani vodi z 1% metanolom, ki smo ga ohranjali pri vseh redčitvah. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 400.3 nM MeIQx (8.536 ng/ploščo) in 10 µg/ploščo BaP. Topilo pozitivnih kontrol, MeIQx in BaP, je bilo DMSO.

Top agar smo segreli in mu dodali 5 mM raztopino histidin/biotin (1 mL his/bio na 100 mL top agarja). V termobloku smo si na 43°C pripravili ustrezno število epruvetk in vanje odpipetirali 2 mL top agarja. V vsako od epruvetk smo nato dodali 100 µL vzorca čistega MeIQx ali BaP oz. ustrezno redčino izvlečka, 100 µL bakterijske suspenzije in 500 µL mešanice S9. Vsebinsko epruvetke smo na kratko premešali na mešalniku in razlili na plošče z minimalnim glukoznim gojiščem, da se je top agar enakomerno porazdelil po plošči. Vsako koncentracijo posameznega izvlečka in čistega MeIQx oz. BaP smo testirali na 3 ploščah. Plošče smo inkubirali 3 dni na 37°C. Po končani inkubaciji smo prešteli število revertiranih kolonij in izračunali povprečje vseh treh paralelk. Preverili smo tudi ozadje plošč, s čimer smo izključili morebitno strupeno delovanje vzorcev in mutagenov (povzeto po navodilih 10G-Pos02-02, Ames (*S. typhimurium*), laboratorija GEN).

3.2.3 **TESTI NA MODELU SESALČJIH CELIC ČLOVEŠKEGA HEPATOMA (HepG2 celice)**

3.2.3.1 **CELICE HepG2**

Celice HepG2 so celična linija človeškega jetrnega karcinoma. Ker so jetra glavni organ v katerem prihaja do biotransformacije strupenih snovi, se celične kulture, pridobljene iz jetrnih celic, pogosto uporabljajo za modele proučevanja citotoksičnih in genotoksičnih učinkov ksenobiotikov. Celično linijo HepG2 so leta 1979 izolirali iz primarnega hepatoblastoma 11-letnega argentinskega dečka (Aden s sod., 1979). Glavne značilnosti celic so, da imajo ohranjene encime I. in II. faze metabolne aktivacije in da izločajo številne plazemske proteine. Encimi, kot so npr. citokrom P450 1A1 in 1A2, glutation-S-transferaza, N-acetil

transferaza in drugi, so bistveni pri aktivaciji in detoksifikaciji genotoksičnih prokarcinogenov, ki delujejo na DNA. Aktivnost encimov je podobna oziroma nekoliko nižja kot aktivnost sveže izoliranih primarnih človeških hepatocitov (Knasmüller in sod., 1998).

3.2.3.1.1 GOJENJE CELIC HepG2 IN PRESAJANJE

Celično linijo HepG2 smo imeli shranjeno v tekočem dušiku. Po odmrznitvi smo celice uporabljali do največ enajste pasaže, saj se s časom gojenja in pri višjih pasajah spremenijo tako morfogogenetske lastnosti celic kot aktivnost njihovih encimov. Celice HepG2 smo gojili v platenkah za gojenje celičnih kultur različnih velikosti (Corning Costar Corporation, New York, USA) v gojišču za celično kulturo HepG2 (Preglednica 10) pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Pri 80% preraščenosti plošče smo celice presadili na nove platenke in jim zamenjali gojišče (i.t. pasaža celic).

Pri presajanju smo iz platenke sprva odstranili medij in celice sprali s 5 mL 1x PBS. Dodali smo 1.5 mL 0.1% tripsina za celice HepG2 in ploščo inkubirali 2 do 3 minute. Po inkubaciji smo plošče s celicami rahlo potresli, da so se celice odlepile od podlage in delovanje tripsina zaustavili s 5 mL celičnega medija (vsaj 2-kratni volumen tripsina). Serum v gojišču zavre delovanje tripsina in tako prepreči morebitne dodatne poškodbe, ki bi nastale zaradi predolge izpostavljenosti celic tripsinu. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Odstranili smo supernatant, celično usedlino resuspendirali v 5 mL svežega medija in vse skupaj prenesli v novo centrifugirko. Celice smo nato 7 do 10-krat previdno in počasi potegnili s pomočjo brizge skozi injekcijsko iglo in na ta način dobili suspenzijo posameznih celic.

Želena gostoto celic, s katero smo nato nasajali nove manjše platenke T25 ali druge mikrotitrne plošče, smo preračunali s pomočjo štetja celic v Burker-Türkovi komori. 10 µL celične suspenzije smo obarvali s 40 µL 0.4% tripan modrega (razmerje 1:5) in 10 µL obarvane celične suspenzije nanесли na objektno stekelce. Celice smo prešteli v vseh kvadratih komore (mreže) in izračunali povprečno število. Gostoto celic na mililiter smo ocenili po formuli:

$$\rho = X(\text{povprečno število celic na kvadrat}) * 5(\text{redčitev celične suspenzije}) * 10\,000 (\text{površina})$$

Preglednica 10: Celični medij za celično kulturo HepG2.

Sestavine za 250 mL:	
William's medij	205 mL
15% FBS	37,5 mL
Penicilin/Streptomycin	2,5 mL
L-glutamin	5 mL

3.2.3.2 TEST 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIJEV BROMID

3.2.3.2.1 OPIS METODE

S testom MTT smo na HepG2 celicah testirali potencialno citotoksičen učinek izvlečkov skorje in sredice, izoliranih iz pečenega piščančjega mesa. Test MTT je enostavna in natančna metoda, pri kateri preživetje celic spremljamo na podlagi pretvorbe substrata v barvni produkt.

MTT ali 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolijev bromid je rumena vodoodporna substanca, ki jo mitohondrijska sukcinat-dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličate nevodotopne kristale formazana. Kristali formazana so topni v dimetil sulfoksidu (DMSO), izopropanolu in drugih podobnih organskih topilih. Optično gostoto, ki nam pove kolikšen je izplen nastalega produkta, merimo spektrofotometrično pri svetlobi z valovno dolžino 570 nm in z referenčnim filtrom 690 nm. Razmerje med količino formazana in številom živih celic je linearno.

3.2.3.2.2 POTEK DELA

Za test MTT smo celice HepG2 po odlepljanju nasadili na mikrotitrsko ploščo s 96-timi vdolbinicami (Nunc, Naperville, ZDA) s prozornim dnem. V vsako vdolbinico smo nasadili 8000 celic/200 μ L celičnega medija. Ploščo smo inkubirali 24 ur pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni amosferi. Naslednji dan smo celični medij odstranili in dodali svež medij z ustreznimi koncentracijami izvlečka skorje in sredice izoliranega iz pečenega piščančjega mesa. Testirali smo 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 in 1 vol% vzorca skorje in sredice. V vseh vzorcih smo ohranili koncentracijo topila (metanola) na 1%. Za pozitivno kontrolo smo uporabili heterociklični amin MeIQx (500 μ M). Naredili smo tudi kontrolo gojišča in topila (1% metanol), da smo izločili morebiten vpliv topila na celice. Vsako koncentracijo vzorca smo testirali v petih paralelkah. Celice smo izpostavili vzorcem za 24 ur, nato pa smo dodali 20 μ l MTT (5 mg/mL). Po 3 urah smo odstranili celični medij in kristale formazana raztopili v DMSO. Absorbanco smo izmerili s spektrofotometrom (Tecan, Genios) pri 570 nm in z referenčnim filtrom 690 nm (povzeto po navodilih 10G-Pos03-01, MTT test, laboratorija GEN).

3.2.3.3 *ALKALNI TEST KOMET*

3.2.3.3.1 OPIS METODE

Alkalni test komet, imenovan tudi test elektroforeze posameznih celic (SCGE; iz angl. single cell gel electrophoresis), je različica testa komet, ki ga danes uporabljamo za določanje poškodb DNA in s tem odkrivanje in dokazovanje genotoksičnega vpliva testiranih snovi. Test komet sta leta 1984 razvila Östling in Johanson za ugotavljanje poškodb dednega materiala na ravni posamezne celice. Celice, obsevane z X-žarki, sta vklopila v agarozo in jih v tankem sloju nanese na objektna stekelca. Celice sta nato lizirala s pomočjo detergentov in visokih koncentracij soli ter jih izpostavila elektroforezi pri nevtralnem pH. Takšni pogoji so omogočili zaznavo dvoverižnih prelomov DNA (DSB; iz angl. double-strand breaks). Nekaj let zatem (1988) so Singh in sod. pri elektroforezi uporabili alkalne pogoje (pH>13). Občutljivost testa se je povečala in omogočila zaznavanje tako enoverižnih (SSB; iz angl. single-strand breaks) kot dvoverižnih prelomov (DSB) ter alkalno labilnih mest (ALS; iz angl. alkali labile sites).

Poškodbe DNA, ki jih lahko zaznamo pri alkalni različici testa komet so dvojni in enojni prelomi DNA verige, ter poškodbe, ki nastanejo kot produkt celičnega popravljanja napak DNA in so prehodnega značaja. Te predstavljajo prelome DNA, ki so nastali kot vmesna stopnja baznega ali nukleotidnega izrezovanja popravljalnega mehanizma, ali pa gre za alkalno labilna mesta. Večina genotoksičnih agensov povzroči več enoverižnih prelomov DNA ter alkalno labilnih mest kot pa dvoverižnih. Ker se pri pH>12.6 alkalno labilna mesta izrazijo kot enoverižni prelomi, je alkalna različica testa najprimernejša za določanje genotoksičnega delovanja, saj na ta način zaznamo največ poškodb (Tice s sod., 2000).

V primerjavi z drugimi metodami za ugotavljanje genotoksičnega potenciala ima test komet številne prednosti. Metoda je enostavna, hitra in zanesljiva, poleg tega pa izkazuje visoko občutljivost na majhne količine DNA poškodb, poraba testirane snovi je relativno majhna, zahteva majhno število celic na poskus in je razen računalniške obdelave slik relativno poceni. Za test komet lahko uporabljamo vse vrste evkariontskih celic.

Pri testu komet suspenzijo posameznih celic pomešamo z agarozo, jo nanese na objektna stekelca in celice liziramo pri pH 10 najmanj 1 uro. Detergenti in visoka koncentracija soli v raztopini za liziranje povzročijo razgradnjo membrane in celične vsebine, zaradi česar ostanejo le poškodovana in nepoškodovana jedra celic (DNA). Stopnji liziranja sledi odvijanje DNA in elektroforeza v alkalnih pogojih (pH>13). Visok pH omogoča hidrolizo alkalno labilnih aduktov, DNA se odvijne in izrazijo se enoverižni prelomi DNA. V procesu elektroforeze prelomljeni in odvitni fragmenti DNA potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Hitrost potovanja je odvisna od poškodovanosti DNA; več poškodb kot vsebuje dedni material in manjši kot so fragmenti, večja je hitrost. To opazimo kot potovanje DNA iz jedra in po videzu nastala oblika jedra spominja na komet.

Nepoškodovana jedra celic ostanejo okrogla. Po elektroforezi stekelca položimo v raztopino za nevtralizacijo. Sledi barvanje DNA s fluorescenčnim barvilom (etidijev bromid; 5 µg/mL) in vizualizacija s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (povzeto po Žegura in Filipič, 2004).

Barvila, ki jih najpogosteje uporabljamo za obarvanje DNA, so etidijev bromid, propidijev jodid in DAPI (4,6-diamidin-2-fenilindol) (povzeto po Žegura in Filipič, 2004). Barvila, ki se vrinejo med bazne pare DNA, fluorescirajo in tako omogočajo opazovanje s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (Collins in sod., 1995).

Za ocenitev poškodb DNA, ki jih zaznamo s testom komet, se uporabljajo različni parametri. Najpogosteje uporabljen je odstotek DNA, ki je potovala iz glave v rep komet, dolžina repa (najdaljša razdalja, ki so jo prepotovali delci DNA od glave komet), Olivin repni moment (produkt odstotka DNA v repu in razdalje od centra repa do centra glave komet) ter razširjen repni moment (produkt DNA v repu in dolžine repa) (Žegura in Filipič, 2004). Če s testom komet zazamo veliko poškodb DNA, lahko to pomeni bodisi močno poškodovanost dednega materiala ali pa učinkovito popraviljanje poškodb DNA (Collins, 2004).

3.2.3.3.2 PRIPRAVA REAGENTOV IN RAZTOPIN ZA TEST KOMET

Agaroz

Preglednica 11: NMP in LMP agaroz.

Sestavine za 20 mL:	
NMP ali LMP agaroz	0.20 g
1x PBS	20 mL

Pripravili smo 1% NMP in 1% LMP agarozo. Pred nanosom na objektna stekelca smo agarozo v mikrovalovni pečici segreti do vrelišča in mešali na magnetnem mešalu. Po potrebi smo jo med poskusom ponovno raztopili.

Raztopina za odvijanje DNA in elektroforezo

Preglednica 12: Raztopina za odvijanje DNA in elektroforezo (pH 13).

Za 1000 mL:	
10 M NaOH	30 mL
0.2 M EDTA	5 mL
Destilirana voda	965 mL

Za vsak poskus smo pripravili svežo raztopino in jo do uporabe hranili pri 4°C.

Raztopina za lizo

Preglednica 13: Raztopina za lizo (pH 10).

Za 100 mL:	
2.5 M NaCl	14.64 g
100 mM EDTA	3.72 g
10 mM Tris	0.121 g
Destilirana voda	do 100 mL

Za vsak poskus smo pripravili svežo raztopino. Na dan poskusa smo uravnavali pH na vrednost 10 z 10 M NaOH ali s HCl (33%). Raztopino smo ohladili na 4°C. Tik pred uporabo smo dodali še 1 mL Triton X-100 (1%) in dobro premešali.

Raztopina za nevtralizacijo

Preglednica 14: Raztopina za nevtralizacijo.

Za 100 mL:	
Tris	4.844 g
Destilirana voda	100 mL

Za vsak poskus smo pripravili svežo raztopino in ji uravnali pH na 7.5 z 10 M NaOH ali s HCl (33%). Do uporabe smo jo hranili pri 4°C (povzeto po navodilih Alkalni komet test, laboratorija GEN).

3.2.3.3.3 POTEK DELA

Priprava celic HepG2

Celice HepG2 smo nasadili na prozorno ploščo z 12-timi vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo nasadili 40.000 celic/luknjico celičnega medija in ploščo inkubirali 24 ur pri 37°C in 5% CO₂ vlažni atmosferi. Naslednji dan smo serumski medij odstranili in dodali novega z različnimi redčinami vzorca pečenega piščančjega mesa. Testrali smo štiri koncentracije izvlečka skorje in sredice: 1, 0.2, 0.04 in 0.008 vol% ter ves čas ohranjali 1% koncentracijo metanola v mediju. Za pozitivno kontrolo smo uporabili mutagen benzo(a)piren (BaP) s 30 µM koncentracijo in MeIQx s 250 µM koncentracijo. Po tretiranju smo celice ponovno inkubirali za 24 ur pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Po inkubaciji smo celice poželi in jih v svežem mediju centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant, dodali celicam 60-80 µL svežega medija in resuspendirano celično suspenzijo razdelili po 30 µL v dve epici.

Priprava stekelc

Za test smo uporabili objektna stekelca peskana po celi površini (Surgipath, ZDA). Čez noč smo stekelca razmastili z namakanjem v metanolu in jih pred uporabo posušili z obžiganjem. Na stekelca smo nanесли 1% NMP agarozo, 2-krat po 80 µL ločeno, jih pokrili s krovniki in za

5-10 minut položili v hladilnik (4°C). Ko se je agarozna strdila, smo previdno odstranili krovna stekelca. 30 µL celične suspenzije smo premešali s 70 µL 1% LMP agaroze in 70 µL nanesli na prvo plast NMP agaroze. Objektneke smo ponovno pokrili s krovnimi stekelci in položili za 5-10 minut na hladno.

Alkalna liza celic

Objektna stekelca, ki smo jim odstranili krovneke, smo položili v raztopino za liziranje (pH 10) in jih inkubirali za 1 uro na hladnem (4°C) v temi.

Odvijanje DNA in elektroforeza

Po končanem liziranju celic smo objektna stekelca preložili v elektroforetsko kadičko in jo napolnili z elektroforetskim pufrom z visokim pH (13). Alkalno odvijanje je poteklo v 20 minut pri 4°C v temi. Po odvijanju je sledila 20 minutna elektroforeza (25 V, 300 mA) pri napetosti 0.5-1 V/cm.

Nevtralizacija

Po elektroforezi je sledila 15 minutna nevtralizacija (pH 7.5) pri 4°C v temi.

Shranjevanje stekelc

Preparate smo do obdelave shranjevali na 4°C v kadičkah na vlažni staničevini, da smo ohranili zadostno vlago.

Barvanje

Preparate smo pred mikroskopiranjem barvali z etidijevim bromidom (EtBr). Na vsak gel objektnega stekelca smo nanesli po 20 µL EtBr (s koncentracijo 5 µg/mL).

Zajemanje slike in obdelava rezultatov

Komete smo opazovali z mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescentno svetlobo (Nikon HB-10104AF, Japonska) pri 400-kratni povečavi. Slike jeder celic smo zajemali s pomočjo kamere (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies, Velika Britanija). Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515-560 nm, zaporni pa 590 nm. Na vsakem stekelcu smo poslikali 50 kometov, pri čemer je glava kometa predstavljala jedro celice, rep pa DNA, ki je potovala iz jedra. Izogibali smo se obrobim delom gela.

Slike smo obdelali s pomočjo programa Comet Assay IV (Perceptive Instruments, Velika Britanija). Program je izmeril več parametrov, za prikaz rezultatov pa smo izbrali % DNA v repu kometa. Rezultate smo obdelali s statističnim programom GraphPad Prism5, kjer smo za analizo razlik med skupinami uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo vrednosti median % DNA v repu znotraj poskusov smo uporabili test Dunnet; $p < 0.05$ smo določili kot statistično značilno razliko. Vsako izvedbo testa smo ponovili v treh neodvisnih poskusih.

3.2.3.4 TEST MIKROJEDER

3.2.3.4.1 OPIS METODE

Test mikrojedr je citogenetski test, s pomočjo katerega ocenjujemo genotoksičen vpliv testirane snovi na celice. Metoda je enostavna in občutljiva ter nam omogoča prepoznavanje genomske nestabilnosti na nivoju kromosoma. Ali določen agens povzroča poškodbe dednine, lahko opazimo z nastankom različnih izvenjedrnih struktur kromatinskega materiala. V *in vitro* pogojih se poškodbe kromosomov odražajo v nastajanju prelomov, prerazporeditvi, izgubi ali neločevanju kromosomov v mitози, amplifikaciji genov ter nekrozi oz. apoptozi. Spremembe na molekularnem nivoju v celicah opazimo s tvorbo mikrojedr, nukleoplazmatskih mostičkov ali jedrnih brstov. Za oblikovanje takih struktur, ki so posledica citogenetskih poškodb, je citokineza ključnega pomena. Celično delitev inhibiramo z uporabo citohalazina B, celice pa imajo značilen dvojedrni izgled (Fenech, 1993 in 2000).

Test CBMN (iz angl. the cytokinesis-block micronucleus assay) je danes med najpogosteje uporabljenimi metodami za ugotavljanje poškodb DNA pri človeku. Pri tej metodi po določenem času z uporabo citohalazina B zaustavimo celično delitev ter mikrojedra preštujemo le v dvojedrnih celicah, ki so se po izpostavljenosti testirani kemikaliji enkrat delile. Štetje mikrojedr se je izkazalo za mnogo enostavnejši način ocenjevanja, kot jih uporabljajo drugi genotoksikološki testi (npr. test kromosomskih aberacij) (Randa in sod., 2006).

Mikrojedro (MN; iz angl. mikronukleus)

Mikrojedro predstavlja skupek jedrne vsebine in je po obliki in strukturi podobno jedru. Nastane kot posledica preloma kromosoma ali nepravilnega delovanja delitvenega vretena. Pod vplivom klastogenega dejavnika mikrojedro vsebuje kromosomski fragment, imenovan tudi acentrični fragment oz. delec brez centromere, pod vplivom anevgenega dejavnika pa je v mikrojedro vključen celoten kromosom (Uhl in sod., 2003). Tako fragment kot cel kromosom, ki ni pripet na delitveno vreteno, v anafazi celične delitve ne more usmerjeno potovati na pol celice. Strukturi ostaneta zunaj glavnega jedra in kasneje oblikujeta novo jedro. V redkih primerih se zgodi, da delca prispeta do pola in postaneta del novo nastajajočega hčerinskega jedra. Ta dogodek je odvisen od velikosti fragmenta ali kromosoma in velikosti same celice. Manjši fragment se v majhni celici lažje vključi v nastajajoče glavno jedro, medtem ko veliki običajno ostane zunaj in tvori mikrojedro. V večji celici kromosomi v anafazi prepotujejo daljšo razdaljo, zaradi česar obstaja majhna verjetnost, da bo odlomljeni fragment ravno v bližini novo nastajajočega jedra.

Nukleoplazmatski mostički (NPBs; iz angl. nucleoplasmic bridges)

Tretirane celice se nahajajo v dvojedrnem stanju, kar omogoča zaznavanje nukleoplazmatskih mostičkov. Mostički izražajo asimetrične prerazporeditve kromosomov (in/ali spajanje telomeraznih koncev) (Randa in sod., 2006) in nastanejo, ko centromere dicentričnih kromosomov ali kromatid v anafazi celične delitve potujejo na nasprotni pold. Z inhibirano

citokinezo celic se prepreči prekinitev anafaznega mostička. Povezavo med dvema jedroma obda jedrna membrana in nastane nukleoplazmatski mostiček.

Jedrni brsti (NB; iz angl. nuclear buds)

Poleg mikrojedder in nukleoplazmatskih mostičkov metoda CBMN omogoča zaznavanja tudi jedrnih brstov. Jedrni brsti predstavljajo mehanizem, s katerim celice izločijo pomnoženo DNA. Skupek pomnoženih genov je selektivno lociran na obrobju jedra in je z njim povezan z ozkim ali širokim pecljem nukleoplazmatskega materiala.

Kriteriji za štetje mikrojedder v CBMN testu:

- MN se šteje samo v dvojedrnih celicah,
- barva MN mora biti enaka ali temnejša kot barva glavnih jeder,
- MN morajo biti okrogle ali ovalne oblike,
- MN mora biti od jedra popolnoma ločen,
- MN naj ne bi bil oddaljen od glavnih jeder več kot dva premera glavnega jedra,
- če ima celica glavni jedri in veliko manjših jeder je verjetno apoptotska, tega ne štejemo
- MN mora biti manjši kot $\frac{1}{4}$ velikosti glavnega jedra
- šteje se lahko tudi celice, ki so v skupkih, vendar morajo biti meje med citoplazmo vidne
- šteje se mikrojedra, nukleoplazmatske mostičke in jedrne brste.

Poleg mikrojedder se v testu CBMN vedno upošteva tudi število eno- (M1), dvo- (M2) in večjedrnih celic (M3). S tem se določi delitveni indeks celic (NDI; iz angl. nuclear division index) in morebitni vpliv preiskovane snovi na delitveni cikel. Na vzorec se prešteje 1000 dvojedrnih celic (N), z različnimi oblikami poškodb (MN, NPB,..) ter dodatnih 500 celic, kjer se upošteva le število eno-, dvo- in tro- oziroma večjedrnih celic (Fenech, 1993 in 2000).

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

3.2.3.4.2 POTEK DELA

Priprava celic HepG2

Celice HepG2 smo nasadili na platenke za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm² (T25). Nasajali smo z gostoto 800.000 celic/ploščo, dodali 5 mL celičnega medija in inkubirali 24 ur, pri 37°C in vlažni 5% CO₂ atmosferi. Po inkubaciji smo serumski medij celicam odstranili in dodali novega z različnimi koncentracijami HCA iz izvlečka skorje in sredice pečene perutnine ter kontrolami. Koncentracije izvlečka skorje in sredice so bile 1, 0.2 in 0.04 vol% in pri tem v mediju ves čas ohranjali 1% koncentracijo metanola. Za kontrolo topila smo uporabili celični medij z 1% metanolom, za pozitivni kontroli pa sta nam služila 10 μM BaP ter 250 μM MeIQx. Tretirane celice smo inkubirali 24 ur, pri 37°C in 5% CO₂ atmosferi. Po pretečeni inkubaciji smo medij z mutageni odstranili, celice 2-krat sprali s 1% PBS in dodali sveže gojišče s citohalazinom B, v končni koncentraciji 2 μg/mL. HepG2 celice smo

inkubirali 26 ur, saj se v tem času 40-60% celic v kontrolni populaciji nahaja v dvojedrnem stanju. Po inkubaciji smo celicam odstranili gojišča in ta spravili v ločene epruvete. Plošče smo nato sprali s 4 mL 1x PBS-a, ga odstranili in dodali v epruveto z odstranjenim medijem istega vzorca. Celice smo tripsinizirali z 1 mL tripsina in inkubirali 2-3 minute. Po inkubaciji, ko so se vse celice odlepile od podlage, smo plošče sprali z raztopino medija in PBS-a, ki smo jo hranili v epruveti. Suspenzijo smo s pomočjo stripete resuspendirali in jo nato centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto in 4°C. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali 1 mL 1x PBS. S pipeto s plastičnim nastavkom smo razbili usedlino, suspenziji dodali novih 3 mL PBS in raztopino centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto in 4°C. Po centrifugiranju smo vzorcem odstranili toliko supernatanta, da ga je v centrifugirki ostalo malo nad delom, kjer le-ta postane koničasta. S plastično, pasteurjevo pipeto smo usedlino resuspendirali, v nagnjeno centrifugirko pa na rob počasi dodali 5 mL hladne hipotonične raztopine (4°C) 75 mM KCl. Centrifugirko smo 2-krat previdno obrnili med prsti (gor in dol med palcem in kazalcem). Po 5 minutah smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 600 obratih/minuto in 4°C. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, tokrat pod črto, ki označuje začetek koničastega dela centrifugirke. Ob zgornji rob smo počasi dolivali 1 mL Karnojevega fiksativa (metanol-očetna raztopina v razmerju 3:1), s prsti potresli po centrifugirki, da se je usedlina odlepila od površine in dodali še 4 mL Karnojevega fiksativa. Takoj po dodanem fiksativu smo vzorcem dodali še 3 kapljice formaldehida in centrifugirke 2-krat obrnili med prsti. Vzorce smo nato za 5 minut centrifugirali pri 600 obratih/minuto in 4°C. Postopek fiksacij s Karnojevim fiksativom smo ponovili še 2-krat, le da v naslednjih korakih nismo več dodajali formaldehida. Po zadnjem fiksiranju smo odstranili supernatant do približno 3 mm nad usedlino in le-to razbili z nežnimi udarci s prsti po centrifugirki. Suspenzijo celic smo s Karnojevim fiksativom nato razredčili na ustrezno gostoto.

Priprava stekelc

Za test mikrojedr smo uporabili običajna objektna stekelca, ki smo jih čez noč namakali v etru. Pred uporabo smo stekelca posušili z obžiganjem. Na objektnike smo nanašali 15 µL celične suspenzije in jo skušali porazdeliti po celotni površini stekelca. Za vsak vzorec smo naredili štiri stekelca, jih posušili na sobni temperaturi in shranili v škatlico za preparate. Preparate smo imeli med ovrednotenjem zakodirane.

Barvanje stekelc

Preparate smo pred mikroskopiranjem v zatemnjenem prostoru barvali z barvilom akridin oranž (AO), v koncentraciji 10 µg/mL. Na preparate smo nanašali približno 50 µl barvila in jih pokrili s krovnimi stekelci.

Štetje mikrojedr

Mikrojedra celic smo opazovali in šteli s pomočjo mikroskopa (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescentno svetlobo (Nikon HB-10104AF, Japonska) pri 400-kratni povečavi. Za vsak posamezen vzorec smo prešteli 1000 dvojedrnih celic, ki smo jih glede na vrsto poškodbe uvrstili v skupino z enim, dvema ali tremi mikrojedri, nukleoplazmatskim mostičkom, jedrnim brstom, mikrojedrom in jedrnim brstom ali mikrojedrom in

nukleoplazmatskim mostičkom in dodatnih 500, pri čemer smo upoštevali le to, ali ima celica eno, dve ali več jeder. S pomočjo razmerja med enojedrnimi, dvojedrnimi in večjedrnimi celicami smo določili delitveni indeks celic (povzeto po navodilih 10G-Pos, Test mikro jeder, laboratorija GEN).

Analiza rezultatov

Rezultate smo analizirali s statističnim programom GraphPad Prism 5 in jih ovrednotili s Student t-testom ($p < 0.05$).

3.2.3.5 IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV, KI SO VKLJUČENI V METABOLNO PRETVORBO KSENOBIOTIKOV, ODGOVOR CELICE NA POŠKODBE DNA IN APOPTOZO

3.2.3.5.1 PRIPRAVA IN TRETIRANJE CELIC HEPG2

Celice HepG2 smo nasadili na platenke s površino 25 cm² (T25) z gostoto 800.000 celic/mL, dodali 5 mL celičnega medija in inkubirali 24 ur pri 37°C in vlažni 5% CO₂ atmosferi. Po inkubaciji smo serumski medij odstranili in celicam dodali svež medij z dodanimi vzorci. Testirali smo 1 vol% izvlečka skorje in 1 vol% izvlečka sredice pečene perutnine, PhIP (količino heterocikličnega amina PhIP, ki jo vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.647 µg/mL), MeIQx (količino heterocikličnega amina MeIQx, ki jo vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.6721 µg/mL), PhIP z MeIQx (količino obeh heterocikličnih aminov, ki ju vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.647 µg/mL in 0.6721 µg/mL), 250 µM MeIQx (53.31 µg/mL) in 30 µM benzo(a)piren (BaP) kot pozitivno kontrolo poskusov. Testirali smo tudi kontrolo celičnega medija in kontrolo topila, kjer je serumski medij vseboval 1% metanol. Celice smo po tretiranju inkubirali za 24 ur, pri 37°C in 5% CO₂ atmosferi.

3.2.3.5.2 IZOLACIJA mRNA S TRIZOL[®] REAGENTOM

Izolacija mRNA s Trizol[®] reagentom omogoča pridobivanje celokupne RNA iz celičnih kultur ali tkiv. Ta način izolacije uporabljamo v primeru, kadar želimo izolirati večje količine RNA, od 50 mg do 1 g, ali krajše fragmente ribonukleinskih kislin. Trizol[®] reagent (GibcoBRL Life Tehnology) je monofazna raztopina fenola in gvanidin izotiocianata, ki na vzorec deluje na več načinov. Med homogenizacijo in lizo vzorca vzdržuje integriteto RNA, celice, njene komponente pa razgradi. Po dodatku kloroforma v vzorce, se raztopina loči na zgornjo vodno fazo in spodnjo organsko fazo. RNA se nahaja v vodni fazi, ekstrahira pa se jo z izopropilalkoholom. Potopek izolacije RNA je v našem eksperimentu služil kot predhodnji korak za analizo izražanja genov z qrtPCR.

3.2.3.5.2.1 *POTEK IZOLACIJE mRNA*

Po inkubaciji smo tretiranim celicam medij z mutageni odstranili. Celice smo 2-krat sprali s 1x PBS in plošče prestavili v digestorij. Vsakemu vzorcu smo dodali 1.5 mL Trizol[®] reagenta in celice inkubirali, dokler se niso odlepile od podlage. S 5 mL stripeto smo viskozno raztopino prenesli v epice in vzorce razdelili na dva dela (2x750 μ L). Po homogenizaciji smo v vsako epico odpipetirali 150 μ L kloroforma in 8 μ L glikogena (v začetni koncentraciji 2 mg/mL). Epice v stojalu smo prekrili z brisačko, jih močno pretresli in centrifugirali 15 minut, pri 12000 g in 4°C. V nadaljnjih korakih testa smo ves material in pripomočke pred uporabo razkužili z RNA inhibitorji. S tem smo želeli preprečiti morebitno kontaminacijo in razgradnjo občutljive ribonukleinske kisline. Po centrifugiranju smo vodno fazo raztopin, v kateri se je nahajala RNA, prenesli v nove epice. V vsak vzorec smo dodali 0.375 ml izopropilalkohola, ga premešali na vibracijskem stresalniku in shranili čez noč na -20°C. Naslednji dan smo vzorce RNA na sobni temperaturi odtalili in jih za 10 minut centrifugirali pri 12000 g in 4°C. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, dodali vzorcem 750 μ L 75% etanola in jih premešali na vorteksu, da se je RNA v obliki usedline odlepila od površine epice. Vzorce smo nato centrifugirali 5 minut, pri 7500 g in 4°C in postopek spiranja še 1-krat ponovili. Po centrifugiranju smo vzorcem previdno odstranil supernatant in usedlino RNA vzorcev posušili v laminariju. Čas sušenja je trajal od 10 do 30 minut. V tem času smo bili pozorni, da se usedlina ni popolnoma izsušila, saj bi s tem močno zmanjšali njeno topnost. Ko se je RNA posušila, smo vzorce raztopili v 10 μ L DEPC (iz angl. diethyl pyrocarbonate-phosphate buffer) vode (voda brez RN-az) in jih položili na led (povzeto po navodilih 10G-Pos07-02, Izolacija RNA in DNA s Trizol[®] reagentom, laboratorija GEN).

3.2.3.5.2.2 *MERJENJE KONCENTRACIJE mRNA*

Merjenje koncentracije mRNA služi za določitev celokupne količine ribonukleinske kisline v vzorcu. S postopkom smo želeli preveriti uspešnosti izolacije mRNA. Izračunali smo koncentracijo mRNA in jo v vseh vzorcih uravnali na 1 μ g za reverzno transkripcijo. Koncentracijo mRNA smo merili na aparaturi NanoDrop 1000 (NanoDrop Tehnologis, ZDA). Podatke smo spremljali v računalniškem programu ND-1000 V3.3.0, kjer smo označili možnost za zaznavanje nukleinskih kislin.

3.2.3.5.2.2.1 *POTEK MERJENJA KONCENTRACIJE mRNA*

Epice z vzorci smo položili v termoblok na 55-60°C in jih inkubirali 10 minut. Usedlina RNA se je v vodi brez RN-az tako bolje raztopila, takoj zatem pa smo epice položili nazaj na led. Z 10 μ L pipeto smo posamezne vzorce premešali in vzorec, ki smo ga na začetku izolacije mRNA razdelili na dva dela, združili v skupno epico. Vzorce smo centrifugirali z namizno centrifugo (short spin), 2-krat do 3000 obratov, in jih položili na led. Aparat NanoDrop 1000 smo umerili z 1 μ L DEPC vode nato pa pričeli z analizami koncentracij RNA posameznih vzorcev.

Na aparat smo nanašali po 1 μL vzorca. Po končani analizi smo vzorčke razredčili z DEPC vodo na približno 1000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in postopek merjenja ponovili. Vsak vzorec smo na koncu razdelili na tri dele in jih shranili na -80°C .

3.2.3.5.3 PREPIS mRNA V cDNA

Reverzna transkripcija je postopek, s katerim iz matrične RNA sintetiziramo njej komplementarno verigo, imenovano komplementarna DNA (cDNA). Reakcija pridobivanja DNA poteka v nasprotni smeri kot običajni prepis, zaradi česar je postopek dobil ime reverzna oz. obratna transkripcija. Molekula RNA je zelo nestabilna, enoverižna in tvori sekundarne strukture. Z reverzno transkripcijo smo celokupno mRNA prepisali v cDNA. Veriga cDNA je stabilnejša in nam poleg tega služi za nadaljnjo uporabo v kvantitativnem rtPCR. Postopek verižne reakcije s polimerazo uporablja encim DNA polimerazo, zaradi česar je zapis z deoksiribonukleotidnimi gradniki za analizo izražanja genov nujno potreben. Reakcijo obratnega prepisovanja smo izvedli z nespecifičnimi, naključnimi oligonukleotidnimi začetniki, ki so nam omogočili prepisovanje celotne RNA, neodvisno od nukleotidnega zaporedja matrične verige.

3.2.3.5.3.1 PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI ZA REVERZNO TRANSKRIPCijo (RT)

Preglednica 15: Reakcijska mešanica za RT.

Volumni za 1 vzorec (μL):	
10x RT pufer	5 μL
25X dNTP mešanica	2 μL
10x naključni oligonukleotidni začetniki	5 μL
Multi scribe RT (50 U/ μL)	2.5 μL
RNAzni inhibitor (20 U/ μL)	2.5 μL
DEPC voda	8 μL
VSOTA	25 μL

Sestavine potrebne za reakcijsko mešanico za RT smo odtajali na sobni temperaturi in centrifugirali z namizno centrifugo. V 1.5 ml epico smo odpipetirali volumne zmesi, preračunane na vsoto števila vzorcev plus dva, za morebitne napake pipetiranja. Reakcijsko zmes smo premešali na vibracijskem stresalniku in centrifugirali z namizno centrifugo.

3.2.3.5.3.2 POTEK PREPISA mRNA v cDNA (reverzna transkripcija)

Vzorci mRNA smo odtajali na sobni temperaturi in centrifugirali z namizno centrifugo. V mikrocentrifugirkih smo pripravili 25 μL redčine vzorcev mRNA, katere koncentracija za prepis je bila uravnana na 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. mRNA smo redčili z DEPC vodo v razmerju 1:25 (1 μL mRNA v 24 μL DEPC vode) in vzorce centrifugirali z namizno centrifugo od 3 do 5 sekund (do 3000 obratov). V redčine vzorcev smo dodali 25 μL reakcijske mešanice za RT in vzorce ponovno centrifugirali. Sledila je reakcija reverzne transkripcije.

Obratno prepisovanje je potekalo v aparatu GeneAmp System 9700 (Applied Biosystem, ZDA). Pogoji reverzne transkripcije v termobloku so bili:

- 10 minut pri 25°C (prileganje naključnih oligonukleotidnih začetnikov)
- 120 minut pri 37°C (sinteza cDNA).

3.2.3.5.4 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (qPCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR; iz angl. polymerase chain reaction) je *in vitro* metoda, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij željenega odseka DNA. Metodo je leta 1983 razvil Kary B. Mullis in 10 let kasneje zanjo prejel Nobelovo nagrado. Z leti so razvili več različic PCR. Danes je metoda ena od osnovnih laboratorijskih tehnik, ki jo različni raziskovalni inštituti uporabljajo z mnogimi aplikacijami (DNA sekvenciranje, analiza genov, klinična diagnostika, id.).

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času je zelo natančna in občutljiva metoda za določanje izražanja genov v vzorcu. V primerjavi z običajnim PCR nam ta oblika metode poleg zaznavanja prisotnosti vzorca in ločevanja segmentov omogoča tudi merjenje količine produkta v vsakem ciklu posamezne reakcije. S pomočjo slednjega podatka lahko v točno določeni stopnji reakcije (eksponentni fazi) sklepamo na začetno število kopij zapisa, ki ga analiziramo. Teoretično lahko s kvantitativnim PCR v realnem času zaznamo eno samo kopijo gena, v praksi pa je najnižja vrednost, ki jo zanesljivo določimo, ocenjena na 5 kopij (Wong in sod., 2005).

Reakcijsko zmes PCR reakcije sestavljajo matrična DNA, kratki začetni oligonukleotidi, DNA polimeraza, deoksiribonukleozid-trifosfati in pufer. Reakcija poteka ciklično in v večih fazah. V prvi, ki jo imenujemo stopnja denaturacije, se zaradi segrevanja do približno 95°C razklene dvoverižna matrična DNA. Temperatura reakcije se v drugi fazi zniža na 40-60°C, kar omogoča vezavo začetnih oligonukleotidov (stopnja prileganja). V zadnji fazi temperatura ponovno naraste, tokrat na 72°C, kar je optimum delovanja DNA polimeraze (stopnja podaljševanja). Polimeraza izgradi novo, komplementarno DNA v smeri od 5' proti 3' koncu verige, ki nato v nadaljnjih ciklih reakcije predstavlja matrico za pomnoževanje. Običajno število ciklov pomnoževanja je od 20 do 40 (Arko, 2004).

TaqMan metoda (Applied Biosystems, ZDA) je ena izmed oblik kvantitativnega PCR. V različici se poleg vseh sestavin reakcijske zmesi uporablja še s fluorofori označeno sondo, ki se veže na del zaporedja med začetnimi oligonukleotidi, ki se pomnožuje. Metoda TaqMan temelji na tem, da aparat po vsakem ciklu pomnoževanja zazna fluorescentni signal, ki nastaja med pomnoževanjem produkta PCR. Za meritev le-tega izkorišča princip fluorescentnega resonančnega prenosa energije (FRET; iz angl. fluorescence resonance energy transfer) iz donorske (reportersko barvilo) na akceptorsko molekulo (dušilec). Sonda, ki se uporablja, je enoverižni oligonukleotidni fragment. Ta se komplementarno prilega eni verigi ampikona in se pomnožuje (specifičnost sonde). Na 5' koncu je označena z reporterskim fluorescentnim barvilom (FAM), na 3' koncu pa z zaviralcem signala (fluorescentno barvilo TAMRA)

(Eurogentec, 2004; Arko, 2004). Dokler sta na sondo vezani obe molekuli v razdalji manjši od 0.1 nm, ekscitacija reporterskega barvila povzroči prenos energije na molekulo akceptorja (zaviralca). Donor se vrne v osnovno stanje in posledično zato ne oddaja fluorescentne svetlobe. Po prileganju in začetku podaljševanja Taq polimeraza s svojo 5' eksonukleazno aktivnostjo, sondo razgradi in barvili reporterja in dušilca se sprostita v raztopino. Prihaja do ireverzibilnega porasta fluorescence reporterja (FAM), kar se zazna kot signal sporočevalnega barvila. Pri prepisu ene molekule tarčnega zaporedja se sprostijo ena molekula fluorescentnega barvila. Količina fluorescence je tako sorazmerna količini produkta danega cikla, zaporedna številka cikla, pri katerem produkt preide določen prag detekcije, pa je sorazmeren s količino tarčne cDNA v vzorcu. Koncentracija cDNA služi za merilo relativne količine mRNA posameznega gena (Eurogentec, 2004; Bustin, 2004).

Analiza rezultatov poteka s pomočjo računalnika in ustreznih programov, ki med procesom pomnoževanja zbirajo podatke o fluorescenci in jih na koncu prikaže v grafični obliki. Graf rezultatov prikazuje spremembo med fluorescenco produkta in fluorescenco ozadja. Zaznava fluorescentnega signala se vrši v vsakem ciklu PCR reakcije. V zgodnjih ciklih, ko fluorescenca produkta ne preseže obarvanosti ozadja, določimo bazno linijo. Točka, kjer signal poročevalske molekule preide nad vrednost praga (bazne linije), predstavlja Ct vrednost (Giulietti in sod., 2001). Ct vrednost predstavlja intenziteto fluorescence, ki se značilno razlikuje od fluorescence ozadja. Med eksponentno fazo je pomnoževanje DNA optimalno. Pri 100% učinkovitosti pomnoževanja in v idealnih pogojih se z vsakim ciklom količina produkta podvoji. V zadnji stopnji reakcija doseže plato fazo. Produkt ne nastaja več, saj pride do porabe reagentov in drugih sestavin, kopičenja inhibitornih produktov in upada encimske aktivnosti polimeraze (Arko, 2004, Wong in Medrano, 2005).

Parametri, ki jih moramo poznati za interpretacijo rezultatov so sledeči:

- Bazna linija: pove število ciklov reakcije, pri katerih jakost fluorescence še ne doseže praga detekcije.
- ΔR_n : ΔR_n je razlika med emisijo fluorescence produkta (R_n) in fluorescentnim signalom bazne linije.
- Pražna vrednost: je vrednost, pri kateri signal nastalega produkta preseže signal ozadja. Vrednost je običajno izračunana kot 10-kratna standardna deviacija povprečnega signala bazne linije.
- Ct vrednost: je cikel, v katerem fluorescenca produkta preseže linijo pražne vrednosti. Ct vrednost je obratnosorazmerna z začetnim številom kopij matrice. Več kopij tarčnega zaporedja pomeni manjše število ciklov za pojav fluorescence (Walker, 2002),
- Standardna krivulja: je krivulja, ki prikazuje logaritem začetne količine vzorca v odvisnosti od vrednosti Ct. Pripravimo jo z redčitveno vrsto znanih koncentracij standarda.

Za analizo podatkov se uporabljata dve metodi: absolutna in relativna kvantifikacija. Če želimo podatek o točni koncentraciji specifičnega gena, uporabljamo absolutno kvantifikacijo. Analiza podatkov poteka s pomočjo standardne krivulje, pridobimo jo s serijskim redčenjem referenčnega gena znane koncentracije, kar omogoča določitev števila kopij iskanega gena na podlagi njegove Ct vrednosti. Z relativno kvantifikacijo določimo razmerje med koncentracijo gena, ki ga analiziramo in standardom (referenčni gen). Rezultate pridobimo na različne načine iz Ct vrednosti in učinkovitosti pomnoževanja (Wong in Medrano, 2005).

Pri izvedbi kvantitativnega PCR v realnem času smo uporabljali TaqMan metodo in specifične oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje genov *CYP1A1*, *CYP1A2*, *UGT1A1*, *NAT2*, *CDKN1A*, *MDM2*, *BAX* in *BCL-2*. Kot kontrolo, na katero smo normalizirali izražanje preiskovanih genov, smo uporabili gen *GAPDH*. Za univerzalno mešanico (za verižno reakcijo s polimerazo) smo uporabljali Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, ZDA), ki vsebuje Taq polimerazo in vse potrebne kofaktorje.

3.2.3.5.4.1 PRIPRAVA REAKCIJSKE MEŠANICE ZA PCR POSAMEZNEGA GENA

Preglednica 16: Reakcijska mešanica za PCR posameznega gena.

Volumni za 1 vzorec (μL):	
Master-Mix	5 μL
Prim.kit	0.5 μL
DEPC voda	3.5 μL
VSOTA	9.0 μL

Master-Mix in oligonukleotidne začetnike smo odtajali na sobni temperaturi, centrifugirali z namizno centrifugo in postavili na led. V ločene epice smo za vsak posamezen oligonukleotidni začetnik odpipetirali volumne reakcijske zmesi, preračunane na vsoto števila vzorcev plus dva, za morebitne napake pipetiranja. Epice z raztopinami smo premešali na vibracijskem stresalniku in centrifugirali z namizno centrifugo.

3.2.3.5.4.2 POTEK KVANTITATIVNE REAKCIJE Z VERIŽNO POLIMERAZO

Zamrznjene vzorce cDNA smo na sobni temperaturi odmrznili in jih centrifugirali ter postavili na led. Z večstopenjsko pipeto smo na prozorno ploščo s 384 luknjicami sprva nanašali po 9 μL reakcijske zmesi za posamezen gen, nato pa ji dodali 1 μL posameznega vzorca. Za vsak vzorec smo naredili dve paraleli. Po končanem nanašanju smo ploščico prelepili z adhezivno folijo, ki preprečuje izhlapevanje, in jo centrifugirali za 3 minute pri 3000 obratov/minuto. Po centrifugiranju smo ploščo prestavili v aparat za kvantitativni PCR - ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystem, ZDA), kjer se je izvajalo pomnoževanje specifičnih odsekov cDNA.

Reakcija qrtPCR je potekala pri standardnih temperaturnih pogojih:

- Začetna denaturacija vzorca:
 - 2 minuti pri 50°C,
 - 10 minut pri 95°C (aktivacija DNA polimeraze).
- Pomnoževanje (45 ciklov):
 - 15 sekund pri 95°C (denaturacija),
 - 1 minuta pri 60°C (pripenjanje začetnih oligonukleotidov in podvajanje DNA).

Analiza podatkov

Podatke smo analizirali z uporabo $\Delta\Delta C_t$ algoritma, ki razlike v izražanju prikaže kot delež spremembe izražanja tarčnega gena glede na kontrolni vzorec. Test smo izvedli v treh neodvisnih poskusih. Statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino smo ovrednotili s Student t-testom in $p < 0.05$.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE HCA V IZVLEČKU PIŠČANČJEGA MESA

Najprej smo v izvlečku iz pečenega piščančjega mesa z uporabo tekoče kromatografije-masne spektrometrije (LC-MS/MS) in masnoselektivnega detektorja (ESI+ način) določili vsebnost in sestavo HCA. Analizo izvlečkov so pripravili na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Piščančji izvleček (SKORJA)	µg/mL
PhIP	64.70
MeIQx	67.21
DiMeIQx	8.33
Vsota HCA	140.24
Piščančji izvleček (SREDICA)	n.d.

→

1 vol% izvlečka skorje	µg/mL
PhIP	0.647
MeIQx	0.6721
DiMeIQx	0.0833

Preglednica 17: Sestava in količina HCA v izvornem in 100-krat redčenem (1 vol%) izvlečku pečenega piščančjega mesa.

Piščančji izvleček je bil pripravljen iz 10.134 kg piščančjega mesa po postopku opisanem v metodah in materialih (3.2.1).

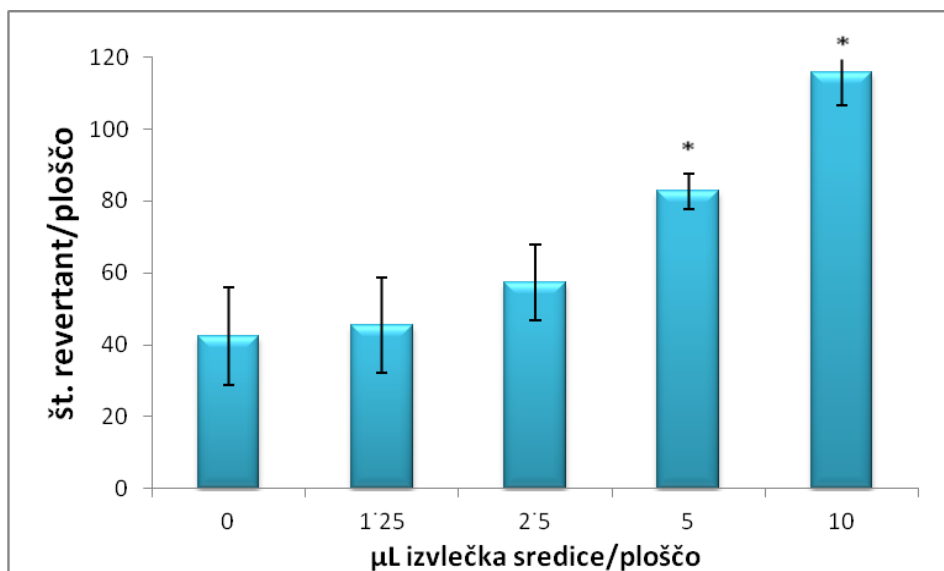
Rezultati analize mesnega izvlečka (Preglednica 17) so pokazali prisotnost treh heterocikličnih aminov, in sicer PhIP, MeIQx in DiMeIQx, v izvlečku skorje pečenega piščančjega mesa. Najvišjo koncentracijo ima MeIQx, z 67.21 µg/mL, sledi mu PhIP, z 64.70 µg/mL, v veliko nižji koncentraciji pa je prisoten DiMeIQx, z 8.33 µg/mL. Celokupna količina HCA v izvlečku skorje pečenega piščančjega mesa je 140.24 µg/mL. HCA v izvlečku sredice pečenega piščančjega mesa nismo zaznali. Spodnja meja zaznave pri analizi HCA je bila 0.001 µg/mL. Razpredelnica 1% koncentracije izvlečka skorje pečene perutnine predstavlja 100-kratno redčitev vzorca, ki smo jo v nadaljnjih poskusih uporabili kot najvišjo testirano koncentracijo.

4.2 TESTI NA BAKTERIJAH

V prvem delu diplomske naloge smo želeli preveriti ali imata izvlečka pečenega piščančjega mesa mutagen učinek na bakterije. Uporabili smo Amesov test na bakterijah vrste *S. typhimurium*, sev TA98.

4.2.1 AMESOV TEST

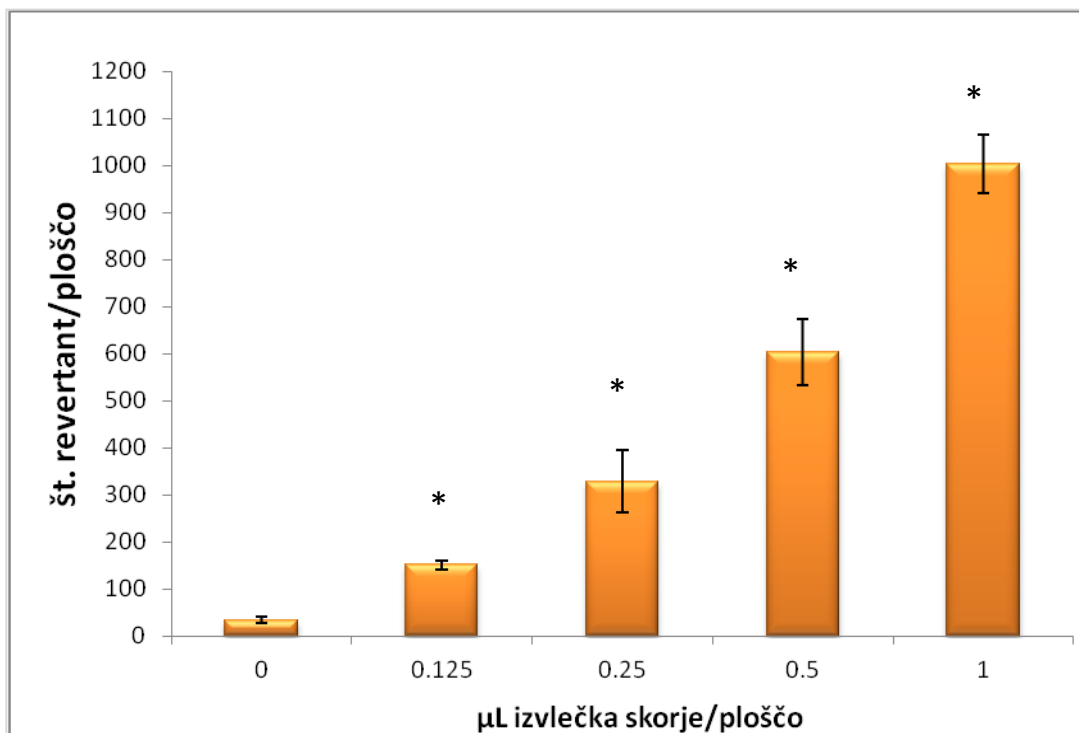
Z Amesovim testom smo ugotavljali potencialno mutageno delovanje izvlečkov skorje in sredice pečenega piščančjega mesa. Bakterije vrste *S. typhimurium*, sev TA98, smo izpostavili različnim koncentracijam izvlečka sredice pečenega piščančjega mesa (1.25, 2.5, 5 in 10 $\mu\text{L}/\text{ploščo}$) (Slika 9) in izvlečka skorje pečenega piščančjega mesa (0.125, 0.25, 0.5 in 1 $\mu\text{L}/\text{ploščo}$) (Slika 10), v prisotnosti metabolnih aktivatorjev S9 (4%). Pri testu smo naredili tudi kontrolo gojišča in kontrolo topila (1% metanol). Na sliki je prikazana kontrola topila, ki se ni razlikovala od kontrole gojišča.



Slika 8: Število revertiranih kolonij v odvisnosti od koncentracije izvlečka sredice pečenega piščančjega mesa.

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 smo izpostavili različnim koncentracijam izvlečka sredice (0, 1.25, 2.5, 5 in 10 $\mu\text{L}/\text{ploščo}$). Rezultati so prikazani kot odnos med številom spontanega revertanta glede na koncentracijo izvlečka sredice pečenega piščančjega mesa ($\pm\text{SD}$).

Pri Amesovem testu predstavlja pozitiven rezultat od doze odvisno in najmanj dvakratno povečanje števila revertiranih kolonij v primerjavi s kontrolo. Iz rezultatov (Slika 8) je razvidno, da je izvleček sredice pečenega piščančjega mesa povzročil statistično značilno povečanje števila revertant pri koncentracijah 5 in 10 $\mu\text{L}/\text{ploščo}$. Pri ostalih dveh koncentracijah (2.5 in 1.25 $\mu\text{L}/\text{ploščo}$) statistično značilnega povečanja števila kolonij nismo zasledili. Razvidno je naraščanje števila revertiranih kolonij v odvisnosti od naraščanja koncentracije izvlečka.



Slika 9: Število revertiranih kolonij v odvisnosti od koncentracije izvlečka skorje pečenega piščančjega mesa.

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 smo izpostavili različnim koncentracijam izvlečka skorje (0.125, 0.25, 0.5 in 1 µL/ploščo). Za kontrolno topilo (0 µL/ploščo) smo namesto izvlečka dodali 1% metanol. Vsako koncentracijo smo testirali v treh paralelkah. Rezultati so prikazani kot odnos med številom spontanih revertant in koncentracijo izvlečka skorje pečenega piščančjega mesa (\pm SD).

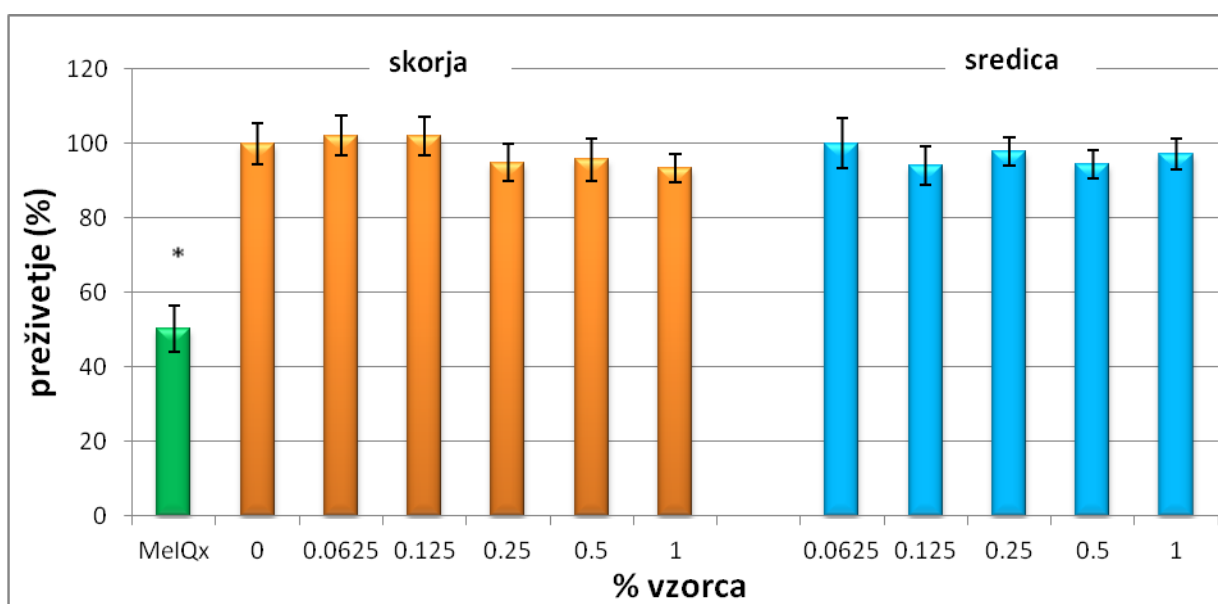
Vse testirane koncentracije izvlečka skorje pečenega piščančjega mesa kažejo statistično značilno povišanje števila revertant glede na kontrolo (Slika 9). Že pri najnižji testirani koncentraciji (0.125 µL izvlečka/ploščo) smo zaznali približno 4.5-kratno povišanje števila revertiranih kolonij, pri najvišji (1 µL izvlečka/ploščo) pa skoraj 30-kratno glede na kontrolno skupino. Iz rezultatov je razvidno od doze odvisno naraščanje mutagenega učinka izvlečka.

4.3 TESTI NA MODELU SESALČJIH CELIC ČLOVEŠKEGA HEPATOMA (HepG2)

V drugem delu diplomske naloge smo želeli ugotoviti ali imata izvlečka (skorja in sredica) pečenega piščančjega mesa citotoksičen in genotoksičen učinek na celice človeškega hepatoma, HepG2 celice. Za določanje citotoksičnosti smo uporabili test MTT, za določanje genotoksičnosti pa alkalni test komet in test mikrojedr. Spremembo izražanja genov zaradi delovanja izvlečkov smo ugotavljali s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qRT-PCR).

4.3.1 TEST MTT

S testom MTT smo najprej želeli preveriti morebitno citotoksično delovanje izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa. Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečka sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 in 1 vol% vzorca). Testirali smo tudi kontrolo topila, kjer smo gojišču celic dodali 1% metanol. Za pozitivno kontrolo smo uporabili MeIQx (500 μ M).



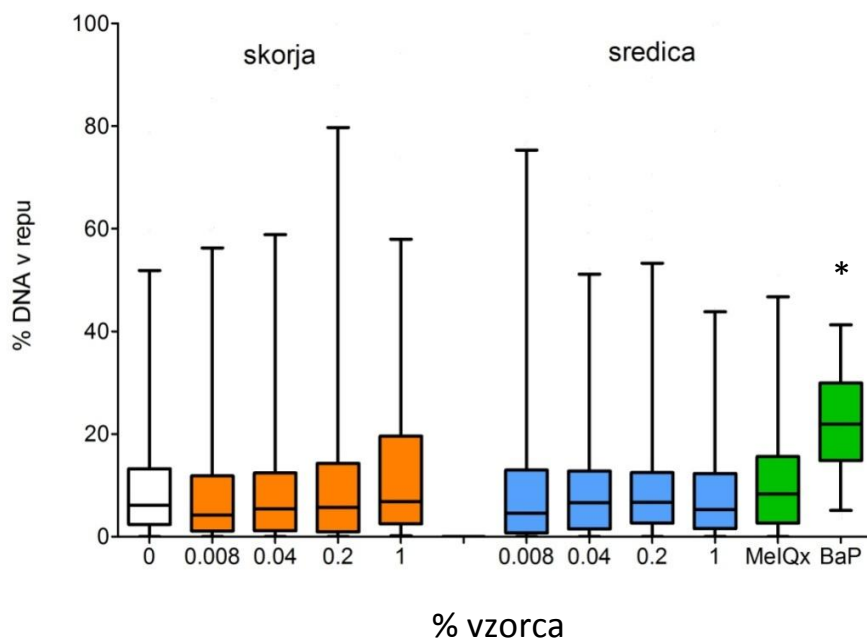
Slika 10: Določanje citotoksičnega delovanja različnih koncentracij izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa na celicah HepG2.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečka sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 in 1 vol%) in nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Za pozitivno kontrolo smo uporabili MeIQx (500 μ M). Rezultati so podani kot odstotek preživetja celic glede na kontrolo (\pm SD).

Nobena od testiranih koncentracij izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa ni zmanjšala preživetja celic HepG2 v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 10). Statistično značilno znižanje preživetja je povzročila le pozitivna kontrola MeIQx (500 μ M= 106.62 μ g/mL), ki vsebuje 158.64-krat višjo koncentracijo MeIQx, kot ga vsebuje 1 vol% izvlečka skorje pečene perutnine.

4.3.2 ALKALNI TEST KOMET

Z alkalno različico testa komet smo preverjali genotoksični učinek izvlečkov pečenega piščančjega mesa na podlagi nastanka prelomov v molekuli DNA. Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0.008, 0.04, 0.2 in 1 vol%). Za pozitivno kontrolo smo uporabili MeIQx (250 μ M) in BaP (30 μ M), za kontrolo topila pa 1% metanol.



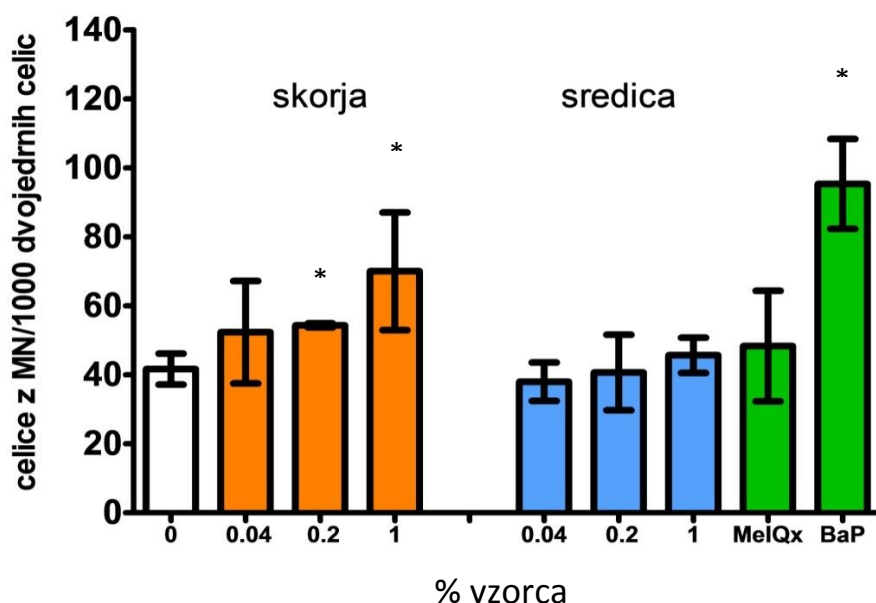
Slika 11: Določanje genotoksičnega delovanja različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredice pečenega piščančjega mesa na celicah HepG2.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.008, 0.04, 0.2 in 1 vol%). Celice pozitivne kontrole smo izpostavili MeIQx (250 μ M) in BaP (30 μ M) in genotoksično delovanje preverjali s testom komet. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder za vsak vzorec. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Razlike med celicami, tretiranimi z različnimi vzorci in kontrolnimi celicami, smo analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo vrednosti median % DNA v repu (črta, ki razmejuje kvantil) smo uporabili test Dunnet, s statistično značilno razliko $p < 0.05$.

Pri testiranju različnih koncentracij izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa nismo zaznali statistično značilnega genotoksičnega delovanja (Slika 11). Rahlo povišanje v količini poškodovane DNA opazimo pri 1 vol% izvlečka skorje pečene perutnine, vendar rezultat ne predstavlja statistično pomembnega povišanja. Statistično značilno povečanje opazimo pri pozitivni kontroli BaP (30 μ M), ki prikazuje 3.27-kratno povečanje količine poškodovane DNA v primerjavi s kontrolo, medtem ko povišanja nismo zaznali pri MeIQx.

4.3.3 TEST MIKROJEDER

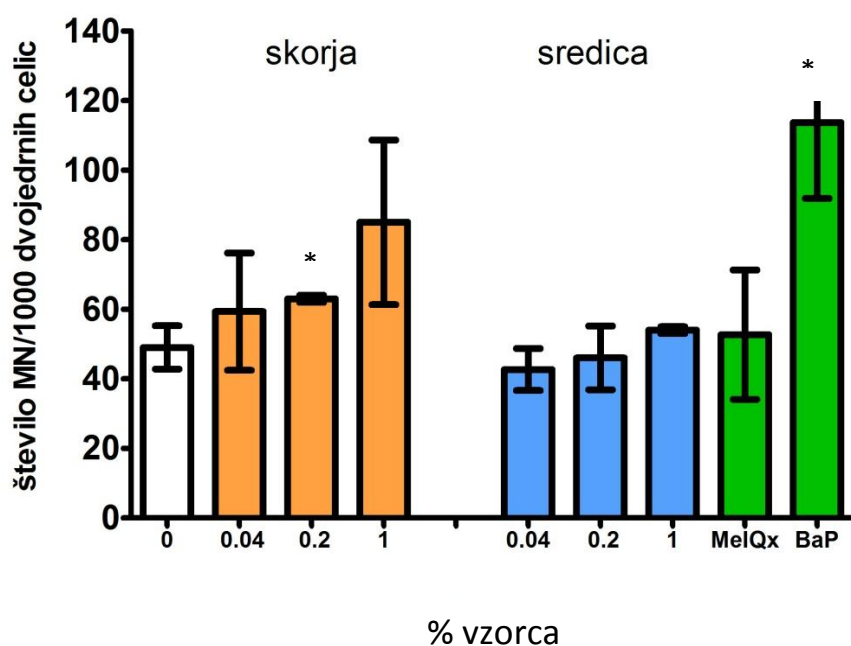
S testom mikrojeder smo želeli ugotoviti ali izvlečka pečenega piščančjega mesa povzročata nastanek DNA poškodb na nivoju kromosomov. Poškodbe, ki jih zaznamo s testom, se kažejo v nastanku mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičov in jedrnih brstov. Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega perutnine (0.04, 0.2 in 1 vol%). Pri kontroli topila smo celice izpostavili 1% metanolu. Za pozitivno kontrolo smo uporabili MeIQx (250 μ M) in BaP (10 μ M).



Slika 12: Število HepG2 celic z mikrojedri v odvisnosti od različnih koncentracij izvlečkov pečenega piščančjega mesa.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.04, 0.2 in 1 vol%). Celice pozitivne kontrole smo izpostavili delovanju MeIQx (250 μ M) in BaP (10 μ M). Genotoksično delovanje izvlečkov pečene perutnine na celice HepG2 smo preverjali s testom mikrojeder. Število celic z mikrojedri je bilo prešteto na 1000 dvojedrnih celic za vsak vzorec. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah. Za analizo rezultatov smo uporabili Studentov t-test s statistično značilno razliko $p < 0.05$. Podatki so prikazani kot število HepG2 celic z mikrojedri na 1000 dvojedrnih celic, po izpostavitvi različnim koncentracijam izvlečkov pečenega piščančjega mesa (\pm SD).

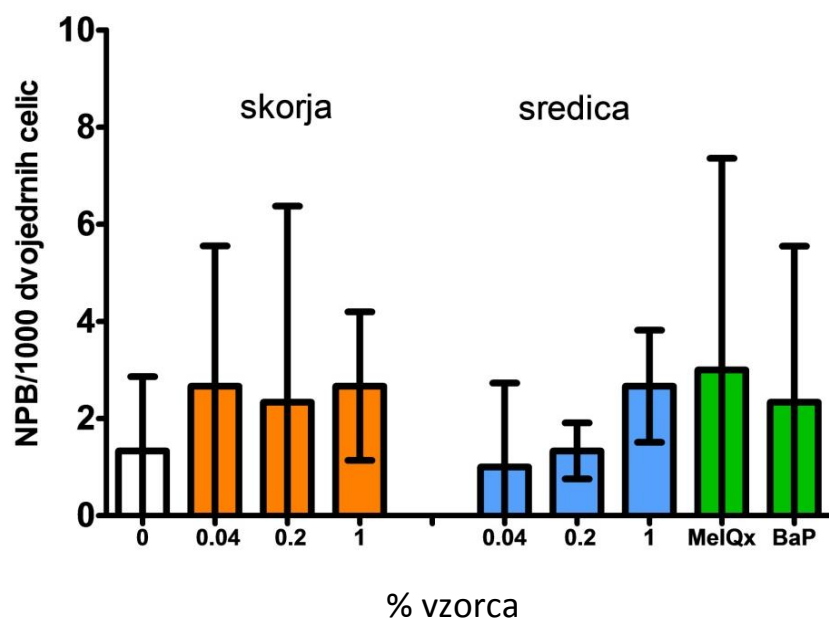
Pri testu mikrojeder smo zaznali od doze odvisno povišanje števila celic z mikrojedri, ki se je statistično značilno od kontrole razlikovalo pri 0.2 in 1 vol% izvlečka skorje pečenega piščančjega mesa (Slika 12). Statistično značilni učinek je imela tudi pozitivna kontrola BaP (10 μ M), medtem ko se ostali vzorci (izvleček sredice in MeIQx) niso razlikovali od kontrolne skupine.



Slika 13: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredica pečenega piščančjega mesa na nastanek vseh mikrojedr v HepG2 celicah.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.04, 0.2 in 1 vol%). Za pozitivno kontrolo smo celice izpostavili MeIQx (250 μ M) in BaP (10 μ M). Genotoksično delovanje izvlečkov pečenega piščančjega mesa na celice HepG2 smo preverjali s testom mikrojedr. Število mikrojedr je bilo prešteto na 1000 dvojedrnih celic za vsak vzorec. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah. Za analizo rezultatov smo uporabili Studentov t-test s statistično značilno razliko $p < 0.05$. Podatki so prikazani kot število mikrojedr na 1000 dvojedrnih celic HepG2, po izpostavitvi različnim koncentracijam izvlečkov pečenega piščančjega mesa (\pm SD).

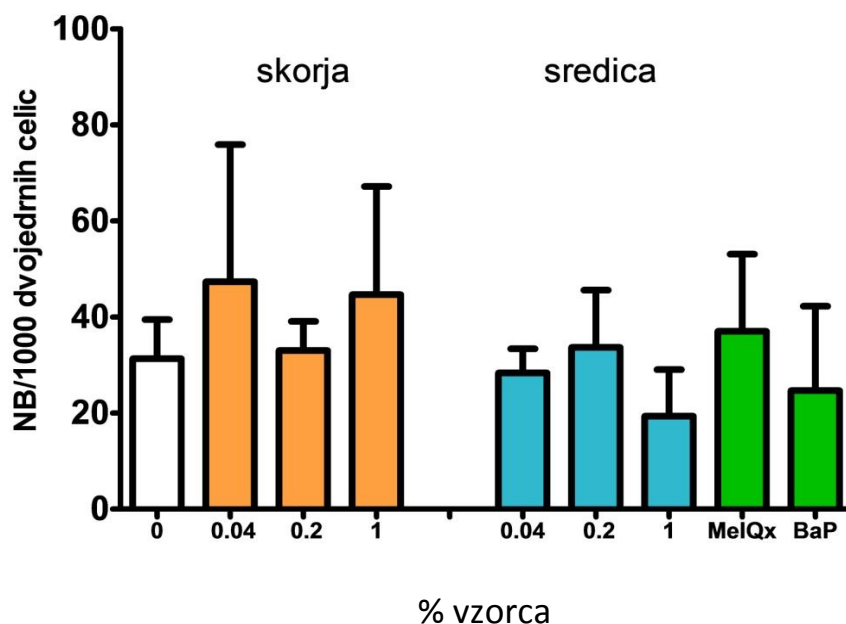
Iz rezultatov (Slika 13) je razvidno od doze vzorca (skorje piščančjega izvlečka) odvisno povišanje števila mikrojedr, ki pa se je statistično značilno razlikovalo od kontrolne skupine le pri koncentraciji 0.2 vol% vzorca. Vzorec sredice ni vplival na nastanek mikrojedr. MeIQx (250 μ M), ki smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo heterocikličnih aminov, ni povišal števila jedr, medtem ko je BaP (10 μ M) statistično značilno vplival na nastanek mikrojedr.



Slika 14: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredice pečenega piščančjega mesa na nastanek nukleoplazmatskih mostičkov v HepG2 celicah.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.04, 0.2 in 1 vol%). Celice pozitivne kontrole smo izpostavili delovanju MeIQx (250 μ M) in BaP (10 μ M). Genotoksično delovanje izvlečkov pečene perutnine na celice HepG2 smo preverjali s testom mikrojeder. Število nukleoplazmatskih mostičkov je bilo prešteto na 1000 dvojedrnih celic za vsak vzorec. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah. Za analizo rezultatov smo uporabili Studentov t-test s statistično značilno razliko $p < 0.05$. Podatki so prikazani kot število nukleoplazmatskih mostičkov na 1000 dvojedrnih celic, po izpostavitvi različnim koncentracijam izvlečkov pečenega piščančjega mesa (\pm SD).

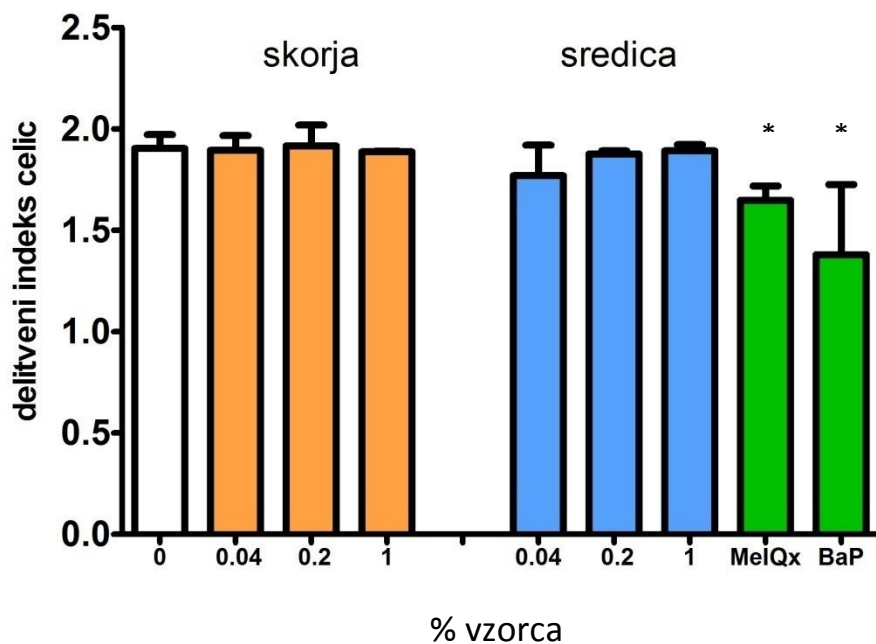
Izvečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa nista vplivala na nastanek nukleoplazmatskih mostičkov pri celicah HepG2 (Slika 14). Prav tako povišanja nismo zaznali v prisotnosti pozitivnih kontrol (MeIQx in BaP).



Slika 15: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredica pečenega piščančjega mesa na nastanek jedrnih brstov v HepG2 celicah.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.04, 0.2 in 1 vol%). Za pozitivno kontrolo smo celice izpostavili MeIQx (250 μM) in BaP (10 μM). Genotoksično delovanje izvlečkov pečenega piščančjega mesa na celice HepG2 smo preverjali s testom mikrojeder. Število jedrnih brstov je bilo prešteto na 1000 dvojedrnih celic za vsak vzorec. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah. Za analizo rezultatov smo uporabili Studentov t-test s statistično značilno razliko $p < 0.05$. Podatki so prikazani kot število jedrnih brstov na 1000 dvojedrnih celic po izpostavitvi različnim koncentracijam izvlečkov pečenega piščančjega mesa (\pm SD).

Izvečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa nista statistično značilno vplivala na nastanek jedrnih brstov v celicah HepG2 (Slika 15).



Slika 16: Vpliv različnih koncentracij izvlečkov skorje in sredica pečenega piščančjega mesa na delitev celic HepG2.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov sredice in skorje pečenega piščančjega mesa (0, 0.04, 0.2 in 1 vol%). Celice pozitivne kontrole smo izpostavili MeIQx (250 μ M) in BaP (10 μ M). Delitveni indeks celic smo ugotavljali tako, da smo v vsakem vzoru prešteli 500 celic, kjer smo upoštevali le število eno-, dvo- in tro- oziroma več-jedrnih celic. Delitveni indeks smo izračunali po formuli: $NDI = (M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / N$, kjer M1 predstavlja celico z enim jedrom, M2 celico z dvema jedri, M3 celico s tremi ali več-jedri in N 500 celic. Celoten poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah. Za analizo rezultatov smo uporabili Studentov t-test ($p < 0.05$). Podatki so prikazani kot število delitev HepG2 celic po izpostavitvi različnim koncentracijam izvlečkov pečenega piščančjega mesa (\pm SD).

Iz rezultatov (Slika 16) lahko razberemo, da izvlečka sredice kot tudi skorje pečenega piščančjega mesa po 24-urni izpostavitvi nista vplivala na delitev celic HepG2, medtem ko smo pri pozitivnih kontrolah (MeIQx in BaP) izračunali statistično značilno nižji delitveni indeks celic.

4.3.4 IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV, KI SO VKLJUČENI V METABOLNO PRETVORBO KSENOBIOTIKOV, ODGOVOR CELICE NA POŠKODBE DNA IN APOPTOZO

S kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo smo želeli preveriti ali izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa vplivata na izražanje izbranih genov, vključenih v metabolno pretvorbo ksenobiotikov (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *UGT1A1*, *NAT2*), odgovor celice na poškodbe DNA (*CDKN1A*, *MDM2*) in v apoptozo (*BAX*, *BCL-2*). Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili 1 vol% izvlečka sredice in skorje pečenega piščančjega mesa, heterocikličnemu aminu PhIP (količina PhIP, ki jo vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.647 µg/mL) in MeIQx (količina MeIQx, ki jo vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.6721 µg/mL) ter kombinaciji PhIP z MeIQx (količina obeh heterocikličnih aminov, ki ju vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.647 µg/mL PhIP in 0.6721 µg/mL MeIQx). Za pozitivno kontrolo smo uporabili MeIQx (250 µM=53.31 µg/mL) in BaP (30 µM), za kontrolo topila pa 1% metanol. Za kontrolo, na katero smo normalizirali izražanja preiskovanih genov, smo uporabili gen *GAPDH*.

GENI	kontrola	1 vol% sredice	1 vol% skorje	MeIQx (0.6721 µg/mL)	PhiP (0.647 µg/mL)	PhiP + MeIQx (0.6721 + 0.647 µg/mL)	250 µM MeIQx (53.31 µg/mL)	30 µM BaP (7.57 µg/mL)
<i>CYP1A1</i>	1.00 ± 0.00	1.21 ± 0.37	64.38 ± 4.09	15.76 ± 4.55	2.81 ± 0.22	12.43 ± 1.17	126.41 ± 15.20	96.76 ± 64.70
<i>CYP1A2</i>	1.00 ± 0.00	1.12 ± 0.37	43.04 ± 5.68	5.78 ± 2.19	1.18 ± 0.12	6.49 ± 0.19	106.26 ± 11.36	8.73 ± 2.35
<i>NAT2</i>	1.01 ± 0.01	1.07 ± 0.58	2.05 ± 1.03	2.83 ± 1.81	2.47 ± 0.74	2.38 ± 1.35	2.16 ± 1.49	3.01 ± 1.69
<i>UGT1A1</i>	1.00 ± 0.00	1.16 ± 0.03	3.19 ± 0.12	1.42 ± 0.02	1.04 ± 0.11	1.40 ± 0.04	5.06 ± 0.35	2.88 ± 0.08
<i>CDKN1A</i>	1.00 ± 0.00	0.90 ± 0.06	1.68 ± 0.04	1.07 ± 0.01	1.16 ± 0.14	1.05 ± 0.10	3.33 ± 0.01	2.02 ± 0.04
<i>MDM2</i>	1.00 ± 0.00	0.88 ± 0.06	1.03 ± 0.06	0.55 ± 0.01	0.74 ± 0.31	0.71 ± 0.02	1.07 ± 0.08	0.54 ± 0.05
<i>BCL-2</i>	1.00 ± 0.01	0.71 ± 0.08	0.81 ± 0.01	0.56 ± 0.03	0.91 ± 0.13	0.50 ± 0.07	0.84 ± 0.16	n.d.
<i>BAX</i>	1.00 ± 0.00	0.96 ± 0.32	0.96 ± 0.20	1.03 ± 0.43	0.88 ± 0.23	0.97 ± 0.19	1.00 ± 0.51	1.06 ± 0.58

Preglednica 18: Vpliv 1 vol% izvlečka sredice in skorje pečene perutnine, 0.6721 µg/mL MeIQx, 0.647 µg/mL PhIP, kombinacije PhIP (0.647 µg/mL) z MeIQx (0.6721 µg/mL), MeIQx (250 M) in BaP (30 M) na izražanje genov HepG2 celic.

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili 1 vol% izvlečka sredice in skorje pečenega piščančjega mesa, heterocikličnemu aminu PhIP (količina PhIP, ki jo vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.647 µg/mL) in MeIQx (količina MeIQx, ki jo vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.6721 µg/mL) ter kombinaciji PhIP z MeIQx (količina obeh heterocikličnih aminov, ki ju vsebuje 1 vol% izvlečka skorje in znaša 0.647 µg/mL PhIP in 0.6721 µg/mL MeIQx). Za pozitivno kontrolo smo uporabili 250 µM MeIQx in 30 µM BaP, za kontrolo topila pa 1% metanol. Prikazano je relativno izražanje mRNA vzorcev, normalizirano na gen *GAPDH*. Test smo izvedli v dveh paralelah v dveh neodvisnih poskusih in podatke analizirali z uporabo $\Delta\Delta C_t$ algoritma. Za statistično značilno razliko v izražanju, glede na kontrolno skupino, smo rezultate ovrednotili s Student t-testom in $p < 0.05$. Z zeleno barvo so označeni geni, ki se jim je izražanje po izpostavitvi značilno znižalo, z rdečo barvo pa geni, ki se jim je izražanje značilno zvišalo.

Iz rezultatov (Preglednica 18) lahko razberemo, da so izražanje gena *CYP1A1* statistično značilno povišali vsi testirani vzorci, razen 1 vol% izvlečka sredice pečenega piščančjega mesa. Opazimo lahko, da je heterociklični amin PhIP v koncentraciji 0.647 µg/mL kar ustreza 1 vol% vzorca skorje, povišal izražanje *CYP1A1* za 2.81-krat v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je MeIQx v koncentraciji 0.6721 µg/mL, kar ustreza 1 vol% vzorca skorje, povišal izražanje tega gena za 12.43. Kombinacija obeh heterocikličnih aminov v koncentracijah, ki so prisotne v 1 vol% izvlečka skorje (0.647 µg/mL PhIP in 0.6721 µg/mL MeIQx) je povišala izražanje *CYP1A1* za 12.43, medtem ko je celokupni izvleček piščančjega mesa (1 vol% vzorca), ki poleg omenjenih HCA vsebuje še DiMeIQx v koncentraciji 0.0833 µg/mL, povišal izražanje za 64.38-krat. MeIQx v koncentraciji 250 µM (kar ustreza 53.31 µg/mL), ki smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo heterocikličnih aminov, je za 126.41-krat povišal izražanje preiskovanega gena, BaP (30 µM, kar ustreza 7.57 µg/mL), ki spada med poliaromatske ogljikovodike in smo ga uporabili zgolj kot pozitivno kontrolo sistema pa je izražanje povišal za 96.76-krat v primerjavi s kontrolno skupino.

Podatki analize izražanja gena *CYP1A2* so pokazali, da je 0.6721 µg/mL MeIQx (količina MeIQx, ki jo vsebuje 1 vol% vzorca skorje), statistično značilno povišal izražanje gena za 5.78, medtem ko 0.647 µg/mL PhIP (količina PhIP, ki jo vsebuje 1 vol% vzorca skorje), izražanje gena ni statistično značilno povišal. Opazimo lahko, da je kombinacija PhIP z MeIQx (količina obeh heterocikličnih aminov, ki ju vsebuje 1 vol% vzorca skorje in znaša 0.647 µg/mL PhIP in 0.6721 µg/mL MeIQx) povišala izražanje gena *CYP1A2* za 6.49-krat, medtem ko je 1 vol% vzorca skorje pečene perutnine, ki poleg PhIP in MeIQx vsebuje še DiMeIQx, povišala izražanje za 43.04 v primerjavi s kontrolno skupino. 1 vol% vzorca sredice pečene perutnine ni statistično značilno povišal izražanje gena *CYP1A2*. Pozitivna kontrola MeIQx (250 µM) je izražanje preiskovanega gena povišala za 106.26, poliaromatski ogljikovodik BaP (30 µM) pa je izražanje gena povišal za 8.73-krat.

Iz podatkov lahko opazimo, da so izražanje gena *NAT2* statistično značilno povišali vsi testirani vzorci, razen 1 vol% izvlečka sredice pečenega piščančjega mesa. Razberemo lahko, da je heterociklični amin PhIP v koncentraciji 0.647 µg/mL povišal izražanje *NAT2* za 2.47, medtem ko je MeIQx v koncentraciji 0.6721 µg/mL povišal izražanje tega gena za 2.83 v primerjavi s kontrolno skupino. Kombinacija obeh heterocikličnih aminov v koncentracijah, ki so prisotne v 1 vol% izvlečka skorje je povišala izražanje *NAT2* za 2.83, medtem ko je celokupni izvleček piščančjega mesa (1 vol% vzorca), ki poleg PhIP in MeIQx vsebuje še DiMeIQx, povišal izražanje za 2.05-krat. MeIQx v koncentraciji 250 µM, ki smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo heterocikličnih aminov, je za 2.16-krat povišal izražanje preiskovanega gena, BaP (30 µM) pa je izražanje povišal za 3.01-krat v primerjavi s kontrolno skupino.

Analiza izražanja gena *UGT1A1* je pokazala, da je 0.6721 µg/mL MeIQx povišal izražanje gena za 1.42, medtem ko 0.647 µg/mL PhIP izražanje gena ni statistično značilno spremenil. Opazimo lahko, da je kombinacije PhIP z MeIQx (količina obeh heterocikličnih aminov, ki ju vsebuje 1 vol% vzorca skorje) povišala izražanje gena *UGT1A1* za 1.40 glede na kontrolno skupino, medtem ko je 1 vol% vzorca skorje pečene perutnine, ki poleg PhIP (0.0647 µg/mL) in MeIQx (0.06721 µg/mL) vsebuje še DiMeIQx (0.0833 µg/mL), povišal izražanje za 3.19-krat. 1 vol% vzorca sredice pečene perutnine ni statistično značilno povišal izražanje preiskovanega gena. Pozitivna kontrola MeIQx je izražanje gena *UGT1A1* povišala za 5.06, poliaromatski ogljikovodik BaP, pa je izražanje gena povišal za 2.88-krat.

Iz rezultatov izražanja gena *CDKN1A* lahko razberemo, da heterociklična amina PhIP v koncentraciji 0.647 µg/mL in MeIQx v koncentraciji 0.6721 µg/mL, kar ustreza koncentraciji obeh HCA v 1 vol% vzorca skorje pečene perutnine, nista statistično značilno spremenila izražanje gena. Prav tako statistično značilnih sprememb v izražanju preiskovanega gena ni povzročila kombinacija obeh HCA v koncentracijah, ki so prisotne v 1 vol% vzorca skorje, medtem ko je celoten izvleček pečenega piščančjega mesa, ki poleg PhIP in MeIQx vsebuje še DiMeIQx, izražanje gena *CDKN1A* povišal za 1.68. MeIQx (250 µM) je povišal izražanje gena za 3.33-krat, BaP (30 µM), pa za 2.02-krat v primerjavi s kontrolno skupino.

Podatki analize izražanja gena *MDM2* so pokazali, da izvlečka pečenega piščančjega mesa, 1 vol% sredice kot tudi skorje, ne povzročata statistično značilnih sprememb v izražanju gena. Opazimo lahko, da heterociklični amin PhIP v koncentraciji 0.647 µg/mL ni povzročil statistično značilnih sprememb v izražanju gena *MDM2* v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je MeIQx v koncentraciji 0.6721 µg/mL znižal izražanje na 0.55-krat. Prav tako je statistično značilno znižala izražanje preiskovanega gena kombinacija obeh HCA (PhIP z MeIQx) v koncentracijah, ki so prisotne v 1 vol% vzorca skorje in sicer na 0.71-krat. Pozitivna kontrola MeIQx v koncentraciji 250 µM, ni povzročila statistično značilnih sprememb, medtem ko je poliaromatski ogljikovodik BaP znižal izražanje gena na 0.54-krat.

Analiza rezultatov izražanja antiapoptotskega gena *BCL-2* je pokazala, da je 0.6721 µg/mL MeIQx znižal izražanje gena na 0.56-krat, medtem ko 0.647 µg/mL PhIP ni vplival na izražanje gena. Kombinacija PhIP z MeIQx v koncentracijah, ki ju vsebuje 1 vol% vzorca skorje, je izražanje gena *BCL-2* znižala na 0.50, 1 vol% vzorca skorje pečene perutnine, ki poleg PhIP in MeIQx vsebuje še DiMeIQx, pa na 0.81-krat v primerjavi s kontrolno skupino.

1 vol% vzorca sredice ni statistično značilno spremenil izražanje preiskovanega gena. Prav tako izražanje gena *BCL-2* ni spremenila pozitivna kontrola MeIQx (250 μ M) v koncentraciji 53.31 μ g/mL, medtem ko je bilo izražanje gena pod vplivom poliaromatskega ogljikovodika BaP (30 μ M) v koncentraciji 7.57 μ g/mL, pod mejo zaznavanja.

Iz rezultatov lahko razberemo, da izražanje proapoptotskega gena *BAX* ni statistično značilno spremenil nobeden od testiranih vzorcev, je pa znižanje izražanja *BCL-2* vplivalo na povečanje razmerja med *BAX/BCL-2*, ki je pomemben pokazatelj procesa apoptoze, pri celicah izpostavljenih 0.6721 μ g/ml MeIQx ($BAX/BCL-2 = 1.84$) in celicah izpostavljenih zmesi MeIQx in PhIP ($BAX/BCL-2 = 1.94$).

5 DISKUSIJA

Z raziskavami v okviru diplomske naloge smo želeli preveriti in oceniti genotoksičen potencial izvlečka izoliranega iz skorje in sredice pečenega piščančjega mesa. Zanimal nas je vpliv izvlečka na nastanek mutacij in poškodb DNA ter vpliv na izražanje genov, ki igrajo pomembno vlogo pri aktivaciji in detoksifikaciji ksenobiotikov, odgovoru celice na poškodbe DNA in apoptozo. Kemijska analiza izvlečka skorje je pokazala prisotnost treh heterocikličnih aminov, od katerih sta se MeIQx in PhIP pojavljala v približno enakih koncentracijah, medtem ko je bilo DiMeIQx približno desetkrat manj. Vsebnost heterocikličnih aminov v izvlečku sredice je bila pod mejo detekcije analitskih metod. Podobne rezultate so opisali v študiji, kjer so raziskovali vpliv izvlečkov iz različnih vrst mesa, le da so v piščančjem mesu zaznali dvakrat več PhIP kot MeIQx (Skrť, 2009).

Genotoksično delovanje in vpliv izvlečka pečenega piščančjega mesa na pojav mutacij smo preverjali z Amesovim testom na bakteriji *S. typhimurium*, sev TA98 v prisotnosti metabolne aktivacije, saj so HCA, ki jih vsebuje izvleček, kemijski prokarcinogeni. Rezultati testa povratnih mutacij so pokazali, da je izvleček skorje pečenega piščančjega mesa že pri najnižji testirani koncentraciji, ki je vsebovala zelo nizke koncentracije PhIP (8.0875 ng), MeIQx (8.40125 ng) in DiMeIQx (1.04125 ng), povzročil značilno povišanje mutacij in sicer delecije baznih parov. S temi rezultati smo potrdili dejstvo, da so heterociklični amini bakterijski mutageni (Sugimura, 1977). Mutagenost štirih različnih mesnih izvlečkov so preverjali Constable in sod. (1999) in zaznali podoben odziv naraščanja števila revertant v odvisnosti od koncentracije HCA v vzorcu. V študiji so opisali, da na mutagenost vzorca pridobljenega iz pečenega mesa vpliva tako količina in vrsta posameznih HCA kot tudi njihova celokupna vsebnost. Poleg predstavnikov HCA, ki smo jih zaznali tudi v naši raziskavi (PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx), so zaznali še IQ in 7,8-DiMeIQx. Omenimo naj, da je bila to edina študija, v kateri so proučevali škodljiv vpliv celokupnega izvlečka in ne le posameznih HCA, prisotnih v toplotno obdelanem mesu (Constable in sod., 1999).

Rezultati izvlečka sredice pečenega piščančjega mesa so pokazali, da najnižji testirani koncentraciji, 1.25 in 2.5 $\mu\text{l/ploščo}$, nista povzročili mutacij na sevu TA98, medtem ko sta koncentraciji 5 in 10 $\mu\text{g/mL}$ število kolonij značilno povišali. Glede na kemijsko analizo izvlečka sredice pečene perutnine smo pričakovali negativne rezultate, zato nas je presenetil pozitiven odziv višjih testiranih koncentracij izvlečka. Kemijska analiza, katere meja zaznave posameznega heterocikličnega amina je 0.001 $\mu\text{g/mL}$ je pokazala, da v izvlečku sredice HCA niso bili prisotni. Pozitiven odziv lahko razložimo s seštevkom vseh HCA, ki so lahko v izvlečku prisotni v sledovih, torej pod mejo detekcije. Rezultati študije Ohta (2006) na sevu TA1978 P so pokazali značilno povišanje števila revertant mešanice HCA, prisotnih v koncentracijah pod spodnjo mejo zaznavanja mutagenega učinka na bakteriji *S.typhimurium* TA98. Določili so t.i. biološki prag (meja, pod katero je

popravljalni mehanizem celice sposoben popraviti vse nastale DNA poškodbe in posledično tako ni bilo zaznati nobene mutacije) posameznih HCA (Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, MeIQ in IQ) in nato proučevali mešanico vseh HCA, ki je izkazovala aditivni učinek na povišanje števila revertant TA1978 P. Vpliv mešanice so poimenovali kolektivna mutagenost. Tako lahko v naši študiji na podoben način razložimo pozitiven rezultat izvlečka sredice, ki naj ne bi vseboval heterocikličnih aminov. Metabolna aktivacija pretvori HCA v reaktivne metabolite, ki z vezavo na DNA tvorijo adukte. Ti so kritični za nastanek mutagenega delovanja HCA (Schut in Snyderwine, 1999). Na primeru molekule PhIP Malfatti in sod. (1995) navajajo, da je za nastanek ene mutacije na *S.typhimurium* TA98 potrebno 25 DNA aduktov. Prav tako predvidevajo, da je za rakotvorni učinek molekule MeIQx potrebna določena koncentracija heterocikličnega amina in s tem minimalna količina nastalih DNA aduktov (Schut in Snyderwine, 1999). Mutagena aktivnost HCA je zelo različna, poleg tega pa mutagenost izvlečkov iz mesa ne sovпада popolnoma s celokupno vsebnostjo HCA (Constable in sod., 1999). Naj omenimo, da ni pomembna samo celokupna koncentracija HCA v izvlečku, temveč tudi oziroma predvsem sestava izvlečka. Constable in sod. (1999) so opisali, da je izvleček B, ki je vseboval 2.5-krat nižjo celokupno koncentracijo HCA, vendar 2-krat višjo koncentracijo IQ kot izvleček A, izkazoval približno enak mutagen potencial kot izvleček A.

Rezultati testa povratnih mutacij potrjujejo dejstvo, da se večina mutagenih spojin pri toplotni obdelavi mesa, tvori v skorji zapečenega mesnega izdelka. Amesov test je zelo učinkovit pristop za ugotavljanje mutagenega potenciala izvlečkov toplotno obdelanega mesa. Je zelo občutljiv za zaznavanje HCA v živilih, vendar je neprimeren za kvantitativno oz. kvalitativno ocenjevanje karcinogenosti teh spojin (Filipič, 1997).

Nadalje nas je zanimal genotoksičen potencial izvlečkov skorje in sredice pečenega piščančjega mesa, kar smo ugotavljali na modelu sesalčjih celic človeškega hepatoma (celice HepG2). Te celice se pogosto uporabljajo za preverjanje genotoksičnega potenciala snovi (Knasmuller in sod., 98; Uhl in sod., 99; Valentin-Severin in sod., 2003) in so zaradi ohranjenega izražanja in aktivnosti encimov I. in II. faze metabolizma dober modelni sistem za proučevanje vpliva ksenobiotikov (Westerink in Schoonen, 2007).

Za preverjanje genotoksičnega delovanja izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa smo morali predhodno preveriti morebitno citotoksično delovanje testiranih koncentracij. Vpliv izvlečkov (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 in 1 vol%) na preživetje celic HepG2 smo preverjali s testom MTT in ugotovili, da nobena od testiranih koncentracij izvlečka skorje in sredice pečene perutnine ni delovala citotoksično na celice HepG2.

Genotoksično delovanje izvlečkov smo preverjali s testoma komet in mikrojedr, kjer smo za najvišjo testirano koncentracijo izbrali 1 vol% vzorca.

Elektroforeza posameznih celic (SCGE) ali test komet je metoda, s katero ocenjujemo poškodovanost dednega materiala (DNA) celic. Metoda je zelo občutljiva na majhne količine DNA poškodb in omogoča zaznavo eno- in dvoverižnih prelomov ter alkalno labilnih mest (Collins, 2004). Poškodbe DNA so lahko posledica neposrednega delovanja ksenobiotikov, ali pa nastanejo kot produkt delovanja popravljalnih mehanizmov. Rezultati testa komet so pokazali, da izvlečka skorje in sredice pečene perutnine ne vplivata na nastanek prelomov v testiranih koncentracijah (0.008, 0.04, 0.02 in 1 vol%). Zaznali smo rahlo povišanje količine DNA prelomov pri 1 vol% izvlečka skorje, vendar to povišanje ni bilo statistično značilno glede na kontrolno skupino. Podatkov o genotoksičnih učinkih celokupnih mesnih izvlečkov, razen za primer testa Ames, v literaturi nismo našli. Vse nadaljnje rezultate zato primerjamo in razlagamo na podlagi raziskav posameznih HCA, prisotnih v toplotno obdelanih mesnih izdelkih.

Vpliv PhIP in MeIQx, ki sta najbolj zastopana HCA v toplotno obdelani hrani in sta bila tudi v našem izvlečku prisotna v največji količini, so s testom komet preverjali na različnih celičnih linijah. Wilkening in Blader (2003) sta proučevala genotoksičen vpliv PhIP na celicah HepG2 in opazila, da v koncentracijah pod 300 μM ne povzroča DNA poškodb. V nasprotju sta Haza in Morales (2010) pri enakih pogojih zasledila pozitiven učinek PhIP, pri čemer je število DNA poškodb naraščalo z naraščanjem njegove koncentracije. PhIP se je v testu komet na celicah HepaRG (celice človeškega hepatoma) v 40 μM koncentraciji izkazal za enega najbolj genotoksičnih spojin. Nastanek poškodb je povzročil že pri 3-urni inkubaciji, medtem ko se je število DNA poškodb po 24 urah izpostavitve močno značilno povišalo (Le Hegarat in sod., 2010). 200 μM koncentracija PhIP je na celicah MCL-5 (celice človeškega limfnega karcinoma) v prisotnosti inhibitorjev popravljanega mehanizma HU/ara-C (večja občutljivost testa komet), povzročila izrazito povišanje števila prelomov, medtem ko je bil učinek DiMeIQx in MeIQx pri enakih pogojih statistično značilno različen šele pri 410 μM oziroma 2130 μM koncentraciji (Pfau in sod., 1999). Podatki testiranja MeIQx s testom komet se med seboj prav tako razlikujejo. Haza in Morales (2010) poročata od koncentracije odvisno naraščanje števila poškodb na celicah HCC (celice človeškega hepatoma), medtem ko na celicah HepaRG MeIQx ni povzročil DNA prelomov niti pri koncentracijah višjih od 1mM (Dumont in sod., 2010a). Preverjanje učinka mešanice HCA na nastanek poškodb DNA s testom komet smo zasledili le pri študiji Dumont in sod. (2010a). Izkazalo se je, da kombinacija PhIP z MeIQx na celicah HepaRG ni vplivala na nastanek DNA poškodb, tudi v visokih koncentracijah (100 μM). Rezultati so pokazali, da je MeIQx v mešanici celo zmanjšal genotoksičen potencial PhIP (Dumont in sod., 2010a).

Na podlagi rezultatov naše študije lahko predvidevamo, da so negativni rezultati testa komet pri najvišji testirani koncentraciji (1 vol%) izvlečka skorje pečene perutnine, posledica nizke vsebnosti HCA. Analize so pokazale, da se v 1 volumenskem % izvlečka skorje nahajajo heterociklični amini v naslednjih koncentracijah: 2.89 μM PhIP, 3.15 μM MeIQx in 0.37 μM DiMeIQx. Domnevamo, da poškodb, ki jih povzročajo navedene nizke koncentracije HCA (0.6721 $\mu\text{g/mL}$ MeIQx, 0.647 $\mu\text{g/mL}$ PhIP in 0.0833 $\mu\text{g/mL}$ DiMeIQx), ne zaznamo s testom komet. Po drugi strani pa moramo omeniti, da poškodb nismo zaznali niti pri pozitivni kontroli, kjer smo uporabili MeIQx v koncentraciji 250 μM . Kot že omenjeno Wilkening in Blader (2003) prav tako na celicah HepG2 nista opazila nastanka DNA poškodb po izpostavitvi PhIP. To lahko razlagamo s tem, da je test komet premalo občutljiva metoda, saj z njim ne moremo zaznati aduktov, ki jih HCA tvorijo z DNA, ali pa celice HepG2 niso primeren model za proučevanje HCA.

V naslednjem koraku naše raziskave smo delovanje izvlečkov pečenega piščančjega mesa preverjali na nivoju poškodb kromosomov. Test mikrojedr, s pomočjo katerega smo preverjali genotoksičen učinek izvlečkov, izkazuje poškodbe DNA v obliki mikrojedr (prelomi kromosomov ali nepravilno delovanje delitvenega vretena), jedrnih brstov (pomnoževanje genov), nukleoplazmatskih mostičkov (asimetrične prerazporeditve ali neločevanje kromosomov) in aktivacije celice v programirano celično smrt. Mikrojedra, po katerih je test dobil tudi ime, nastanejo kot posledica klastogenega ali anevgenega delovanja kemikalij na kromosome (Fenech, 2000).

Iz rezultatov testa mikrojedr je razvidno, da je le izvleček skorje pečenega piščančjega mesa povzročil statistično značilno povišanje števila mikrojedr v izpostavljenih celicah. Vzorec skorje pečene perutnine ni imel značilnega vpliva na pojav jedrnih brstov in nukleoplazmatskih mostičkov pri nobeni od testiranih koncentracij. Izvleček, izoliran iz sredice piščančjega mesa, ki ni vseboval HCA, ni povzročil poškodb na nivoju kromosomov.

Podatki raziskav genotoksičnega potenciala posameznih HCA in vpliv le-teh na nastanek DNA poškodb se pri testu mikrojedr, podobno kot testu komet, med seboj zelo razlikujejo. PhIP po 24 uri izpostavitvi ne vpliva na povišanje števila mikrojedr v celicah HepaRG (Le Hegarat in sod., 2010), celicah HepG2 in celicah V79 (celice pljučnega fibroblasta budre) (Sasaki, 2003), medtem ko o nasprotnem učinku poroča Majer in sod. (2004), kjer je PhIP že pri 25 μM koncentraciji na celicah HepG2 povzročil značilno povišanje števila mikrojedr. Učinke nekaterih predstavnikov HCA, med drugim PhIP, 8-MeIQx in 4,8-DiMeIQx, ki jih vsebuje tudi izvleček skorje pečene perutnine naše raziskave, opisuje Pfau in sod. (1999) na celicah MCL-5. Celice MCL-5 izražajo številne človeške metabolne encime, pomembne pri pretvorbi ksenobiotikov, in so pomembne za zaznavanje mikrojedr, nastalih zaradi klastogenega delovanja kemikalij (8-MeIQx) (Crofton-Sleigh in sod., 1993). Rezultati testa mikrojedr so pokazali, da ima največji vpliv

na nastanek poškodb kromosomov DiMeIQ_x, sledi mu MeIQ_x, učinek PhIP pa je bil bistveno manjši. Število mikrojedr je naraščalo z večanjem količine posameznega HCA (Pfau in sod., 1999). Podobno kot Pfau je pozitivne vplive PhIP in MeIQ_x na povečanje števila mikrojedr v celicah HepG2 opisal tudi Knasmüller in sod. (1999). Statistične razlike v povišanju števila mikrojedr so zaznali že po 1 urni izpostavitvi 50 µM PhIP in MeIQ_x.

Predvidevamo, da so razlike med rezultati testa komet in testa mikrojedr posledica zaznavanja različnih vrst DNA poškodb, na katere sta testa občutljiva, količina poškodb, pri kateri se določena oblika napake izrazi in sposobnosti popravljalnih mehanizmov za različne vrste poškodb. Pfau in sod. (1999) so označili test mikrojedr za bolj občutljivo metodo preverjanja genotoksičnega potenciala HCA v primerjavi s testom komet, kar se je izkazalo tudi v naši raziskavi.

Preverili smo vpliv izvlečka pečenega piščančjega mesa na izražanje genov, ki so vpleteni v metabolno pretvorbo ksenobiotikov, odgovor celice na poškodbe DNA in programirano celično smrt. Za ocenitev načina delovanja in vpliv na procese znotraj celice smo uporabili metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo po reverzni transkripciji izolirane mRNA (qRT-PCR).

Izpostavljenost človeka kemijskim snovem vpliva na različno delovanje genov (Nuwaysir in sod., 1999; Hamadeh in sod., 2002; Waters & Fostel, 2004; Pennie in sod., 2001). Kontroliranje aktivnosti genov je kompleksen proces, na katerega vpliva več dejavnikov in lahko prihaja znotraj celice same (npr. signali za celično delitev), sosednje celice oz. celice znotraj istega telesa (npr. imunski sistem), ali pod vplivom zunanega okolja (ksenobiotiki) (van Delft in Kleinjans, 2007). Splošno znano je, da se genotoksičen potencial HCA izrazi šele po metaboli aktivaciji v telesu. Reaktivni metaboliti se vežejo na celične komponente in s tvorbo aduktov povzročajo poškodbe DNA. Spremembe v aktivnosti gena se odražajo s spremenjenim profilom genskega izražanja (Scheda in sod., 1996; Holloway in sod., 2002). Ker podatkov iz literature povezanih s proučevanjem celotnih mesnih izvlečkov na izražanje genov nismo zasledili, smo rezultate testa primerjali s podatki vpliva posameznih HCA, kot sledi v nadaljevanju.

a) Geni, vključeni v metabolno pretvorbo ksenobiotikov

Glavna pot bioaktivacije HCA se začne z N-hidroksilacijo heterocikličnega obroča molekule HCA (Cheng in sod., 2006). Oksidacijo zunajciklične aminske skupine katalizirajo encimi citokrom P450, ki pretvorijo molekule HCA v N-hidroksi-HCA metabolite (Crofts in sod., 1998). Produkti metabolizma so reaktivne oblike HCA, ki se lahko vežejo na DNA in druge celične makromolekule (Turesky, 2005). Večina encimov I stopnje biotransformacije so sposobni tako aktivacije kot detoksifikacije prokarcinogenov (Hodek in sod., 2009), glavna med njimi pa sta CYP1A2 in CYP1A1 (NTP, 2002).

Iz rezultatov naše raziskave je razvidno, da se je izražanje citokroma P450 *CYP1A1* pri 24 urni izpostavitvi značilno povišalo pri vseh testiranih vzorcih, razen pri 1 vol% izvlečka sredice pečene perutnine. Poleg pozitivnih kontrol MeIQx (250 μ M) in BaP (30 μ M), je izrazito povišanje izražanja gena *CYP1A1* povzročil izvleček skorje v 1 vol% (izražanje gena glede na kontrolo je bilo povišano za 64.38-krat). Iz primerjave vrednosti povišanja izražanja tega gena pri 1 vol% vzorca skorje s kombinacijo PhIP (0.6721 μ g/mL) z MeIQx (0.647 μ g/mL) opazimo, da je bilo izražanje gena *CYP1A1* pod vplivom 1 vol% vzorca skorje pečene perutnine statistično značilno višje. Ker izvleček skorje poleg PhIP (0.647 μ g/mL) in MeIQx (0.6721 μ g/mL) vsebuje še DiMeIQx (0.0833 μ g/mL) predvidevamo, da je razlika v vrednosti povišanja izražanja gena posledica prisotnosti in delovanja DiMeIQx, ali pa gre za sinergistično delovanje vseh treh HCA. Seveda ne moremo izključiti, da so v vzorcu prisotni še drugi HCA, ki so prisotni v koncentracijah pod mejo detekcije analitske metode. Iz primerjave rezultatov izražanja gena pri MeIQx (0.6721 μ g/mL; 15.76 ± 4.55) in PhIP (0.647 μ g/mL; 2.81 ± 0.22) v koncentracijah kot se nahajata v 1 vol% izvlečka skorje ter kombinacije obeh HCA v ustreznih koncentracijah (12.43 ± 1.17), opazimo, da mešanica PhIP z MeIQx nima aditivnega učinka na povišanje izražanja gena *CYP1A1*. Do podobnega rezultata na celicah HepaRG so prišli tudi Dumont in sod. (2010a), le da se je manj kot aditivni učinek pojavil šele pri najvišji testirani koncentraciji kombinacije PhIP z MeIQx (100 μ M), medtem ko je bil učinek pri nižjih dveh koncentracijah (10 in 50 μ M) večji kot seštevek posameznih HCA. V študiji so ugotovili, da je PhIP veliko močnje inducirala izražanje in aktivnost *CYP1A1* kot MeIQx. Pomembno je poudariti, da gre za poskuse na dveh različnih celičnih linijah, ki imajo različno izražene aktivnosti encimov, ki so vpleteni v metabolizem HCAjev, zaradi česar je rezultate med seboj težko primerjati.

Ljudje smo domnevno neprestano izpostavljeni številnim HCA v prehrani. Na splošno se spojine pojavljajo v kompleksnih mešanicah, zaradi česar je pomembno proučevanje njihovih učinkov v kombinaciji (Hirata in sod., 2008). Hasegawa s sod. (1996) je na eksperimentalnem modelu podgan (F344) proučeval delovanje mešanice 5 oz. 10 različnih HCA. Delovanje različnih HCA naj bi bilo podobno, njihove interakcije pa odražajo običajno aditivne bolj kot sinergistične učinke. Do nasprotnega spoznanja je prišel Tsuda in sod. (1999). Dokazali so, da učinki mešanice HCA niso vedno aditivni in da prisotnost heterocikličnega amina PhIP deluje pogosteje zaviralno na karcinogen potencial drugih HCA. Kljub temu, da je bila večina podatkov o učinkih kombinacij HCA testirana z uporabo različnih testov, so omenjeni podatki lahko le smernice, ki kažejo na kompleksnost delovanja HCA v mešanici. V vzorcu, ki je sestavljen iz večih komponent, prihaja med sestavinami do različnih medsebojnih interakcij, ki lahko povzročajo: aditiven učinek (učinek, ki je enak vsoti vseh učinkov), sinergističen učinek (učinek, ki je večji od vsote učinkov posameznih komponent) in antagonističen učinek (učinek, ki je manjši od vsote učinkov posameznih komponent) (Fernandez in sod., 1995).

Različne učinke delovanja vzorcev smo opazili tudi pri genu *CYP1A2*. Nivo mRNA proučevanega gena je poleg pozitivne kontrole MeIQx (250 μ M; $106,26 \pm 11,36$), izrazilo povišal vzorec izvlečka (1 vol%) skorje pečene perutnine ($43,04 \pm 5,68$) medtem ko je bilo značilno povišanje izražanja pri MeIQx (0.6721 μ g/mL; $5,78 \pm 2,19$), kombinaciji PhIP z MeIQx ($6,49 \pm 0,19$) manj izrazilo. PhIP v koncentraciji (0.647 μ g/mL; $1,18 \pm 0,12$) ni značilno vplival na izražanje tega gena. Podobno kot pri genu *CYP1A1* opazimo, da ima izvleček skorje pečene perutnine (1 vol%) izrazilo večji učinek na povišano izražanje gena *CYP1A2* kot kombinacija PhIP z MeIQx v ustreznih koncentracijah, ki se nahajajo v izvlečku. Kot smo že omenili, vsebuje vzorec skorje pečene perutnine tri različne HCA, PhIP (0.647 μ g/mL), MeIQx (0.6721 μ g/mL) in DiMeIQx (0.0833 μ g/mL), zaradi česar sklepamo, da je prisotnost slednjega v mešanici izvlečka ključna za značilno povišanje izražanja gena *CYP1A2* v primerjavi s kombinacijo le dveh HCA (PhIP in MeIQx). Vzorec izvlečka (1 vol%) sredice pečene perutnine ni vplival na izražanje gena *CYP1A1*, kar razlagamo z odsotnostjo HCA v tem vzorcu. Izrazilo visok nivo mRNA genov *CYP1A2* in *1A1*, v primerjavi s količino izražanja ostalih proučevanih genov vpletenih v metabolizem HCA, sovпада s podatki učinkov posameznih HCA in kombinacij (PhIP z MeIQx), ki jih opisujejo Dumont in sod., (2010b) na celicah HepaRG ter kaže na pomembno vlogo encimov iz družine citokrom P450 pri metabolizmu HCA.

Encimi II. stopnje metabolizma so običajno transferaze, ki metabolne produkte I. stopnje in nespremenjene izvorne ksenobiotike pretvorijo v hidrofilne produkte. Ti se lažje izločajo iz telesa. Reakcije običajno služijo detoksifikaciji strupenih snovi, vendar spontane ali katalizirane prerazporeditve metabolnih konjugatov lahko vplivajo na nastanek visoko reaktivnih kationov (nitrenijev ion), ki se vežejo na DNA, proteine in druge celične komponente (Hodek in sod., 2009).

Za encime N-acetiltransferaze (NAT) predpostavljajo, da imajo ključno vlogo pri presnovi HCA v njihovo karcinogeno obliko (Hodek in sod., 2009). NAT katalizira N- in O-acetilacijo N-hidroksi-HCA, pri čemer nastane reaktiven produkt sposoben kovalentne vezave na DNA. Iz podatkov izražanja gena *NAT2* smo razbrali, da je bil učinek na povišano izražanje gena bolj ali manj enak za vse testirane vzorce [1 vol% izvlečka skorje ($2,05 \pm 1,03$), MeIQx (0.6721 μ g/mL; $2,83 \pm 1,81$), PhIP (0.647 μ g/mL; $2,47 \pm 0,74$), kombinacije PhIP z MeIQx ($2,38 \pm 1,35$), 250 μ M MeIQx ($2,16 \pm 1,49$)]. Zanimivo je, da je bila vrednost povišanja izražanja gena pri pozitivni kontroli MeIQx (250 μ M, kar ustreza 53.31 μ g/mL) skoraj enaka kot vrednost povišanja pri MeIQx z 79.32-krat nižjo koncentracijo (0.6721 μ g/mL). Podoben učinek opazimo tudi pri izvlečku skorje pečene perutnine (1 vol%). Vzorec skorje vsebuje tri različne vrste HCA (PhIP, MeIQx in DiMeIQx) s celokupno koncentracijo 140,24 μ g/mL, vrednost izražanja gena pa je ponovno zelo podobna vrednosti povišanja izražanja gena *NAT2* pozitivne kontrole MeIQx (250 μ M). Rezultati nakazujejo, da prisotnost HCA v vzorcih vpliva na povišano izražanje gena *NAT2*, vendar količina izražanja ni odvisna od vrste ali koncentracije HCA. Vzorec sredice izvlečka ni vplival na izražanje gena *NAT2*.

Podobne odzive izražanja gena *NAT2* so zasledili tudi na celicah HepaRG. Vrednost izražanja gena se ni spreminjala ob izpostavitvi celic različnim HCA (MeIQx in PhIP) in njihovi kombinaciji (MeIQx z PhIP). Prav tako izražanje ni bilo odvisno od koncentracije PhIP, MeIQx ali kombinacije PhIP z MeIQx (Dumont in sod., 2010a). Za razliko od celic HepaRG, ki se niso odzvale na vzorce HCA (MeIQx in PhIP) niti pri 100 μM koncentracijah, so celice HepG2 v našem poskusu povišale izražanje gena *NAT2* že pri 3.15 μM koncentraciji MeIQx in 2.89 μM koncentraciji PhIP.

V nasprotju z *NAT2*, ki HCA aktivira, predstavlja *UGT1A1* enega izmed encimov družine UDP-glukoroniltransferaz, za katere velja, da katalizirajo procese detoksifikacije HCA (Turesky, 2010). Z vezavo glukoronida na molekulo HCA se tvorijo topni produkti, ki niso reaktivni in se izločijo z urinom (Alaejos in sod., 2008). Ponovno smo tudi za gen *UGT1A1* opazili, da je 1 vol% izvlečka skorje pečene perutnine ($3,19 \pm 0,12$) močnejše povišal izražanje tega gena kot kombinacije PhIP z MeIQx. Ponovno predpostavljamo, da gre za medsebojne interakcije treh HCA (PhIP, MeIQx in DiMeIQx), prisotnih v mešanici izvlečka skorje. Glede na rezultate PhIP (0.647 $\mu\text{g/mL}$; $1,04 \pm 0,11$), ki izražanje gena *UGT1A1* ni značilno spremenil, bi lahko povišano izražanje gena pri kombinaciji PhIP z MeIQx ($1,40 \pm 0,04$) pripisali delovanju MeIQx, saj je le ta v koncentraciji, ki je prisotna v 1 vol% izvlečka skorje, povzročil značilno povišanje izražanja gena *UGT1A1* ($1,42 \pm 0,02$). Za razliko od naših rezultatov opazimo pri podatkih izražanja gena *UGT1A1* pri kombinaciji PhIP z MeIQx na celicah HepaRG aditivno povišanje izražanje gena. MeIQx in PhIP v 50 μM koncentraciji nista značilno povišala izražanja gena *UGT1A1*, medtem ko je 10 μM kombinacija PhIP z MeIQx (10 μM PhIP in 10 μM MeIQx) značilno povišala izražanje tega gena (Dumont in sod., 2010a).

b) Geni, vključeni v odgovor na poškodbe DNA

DNA poškodbe lahko izzovejo različne celične odgovore. Eden izmed njih je zaustavitev celičnega cikla, ki velja za pomemben obrambni mehanizem celice. Proteini, ki regulirajo kontrolne točke celičnega cikla, omogočajo celici, da med delitvijo popravi nastale poškodbe DNA in s tem zmanjšuje možnost nastanka genetske nestabilnosti (Zhu in sod., 2000). Protein CDKN1A je regulator celičnega cikla, ki celico zadrži v G1 fazi, njegovo izražanje pa je odvisno od transkripcijskega faktorja P53 (Alberts in sod., 2003). *MDM2* gen kodira protein ubikvitin ligazo, in je tarčni gen tumor-supresorskega faktorja P53. S proteinom P53 tvori avtoregulatorno zanko in tako ob povečani količini P53 sproži njegovo odstranjevanje (Harris in Lavine, 2005).

Pri izražanju gena *MDM2* smo opazili, da izvlečka pečenega piščančjega mesa, tako sredica (brez HCA) kot skorja (140.24 $\mu\text{g/mL}$ HCA), ne vplivata na njegovo izražanje. Zanimiva je primerjava učinka vzorca skorje v 1 vol% z učinkom kombinacije PhIP z MeIQx v koncentracijah, ki se nahajajo v 1 vol% izvlečka skorje. Vzorca PhIP (0.647 $\mu\text{g/mL}$; $0,74 \pm 0,31$), MeIQx (0.6721 $\mu\text{g/mL}$; $0,55 \pm 0,01$) in njuna kombinacija ($0,71 \pm 0,02$) so znižali izražanje gena *MDM2*. Zanimivo je, da pozitivna kontrola 250 μM MeIQx

($1,07 \pm 0,08$) ni vplivala na izražanje proučevanega gena. Iz rezultatov izražanja gena *CDKN1A*, smo statistično značilno spremenjeno izražanje gena glede na kontrolo opazili le pri vzorcu skorje pečene perutnine (1 vol%; $1,68 \pm 0,04$) in obeh pozitivnih kontrolah MeIQx (250 μ M; $3,33 \pm 0,01$) in BaP (30 μ M). Rezultati izvlečka skorje v primerjavi s čistimi HCA ponovno nakazujejo, kako pomembno je proučevati celokupni izvleček in ne le vpliv posameznih HCA oziroma njihovih kombinacij.

c) Geni, vključeni v apoptozo

Apoptoza je posebna oblika programirane celične smrti, ki omogoča vzdrževanje ravnovesja fizioloških procesov v tkivih in celicah. Nastane kot odgovor celice na stres in poškodbe DNA ter na ta način olajša organizmu odstraniti poškodovane, stare ali nepotrebne celice. Apoptoza je visoko reguliran celični proces, pri katerem imajo eno izmed ključnih vlog znotrajcelični encimi BCL-2 družine. Dva izmed najpomembnejših predstavnikov sta proteina BAX in BCL-2. BAX ob aktivacijskem signalu sproži kaskado proteolitičnih reakcij, ki vodijo v celično smrt, medtem ko ima BCL-2 antiapoptotski učinek in celico ohranja pri življenju (Alberts in sod., 2003).

Analiza rezultatov izražanja gena *BAX* je pokazala, da tako izvlečka iz mesa kot čisti HCAji niso vplivali na izražanje tega gena, zato lahko sklepamo, da HCA ne povzročajo sprememb, ki bi vplivale na povečano ali zmanjšano izražanje gena in s tem vodile v proces apoptoze. Za razliko od gena *BAX* se je izražanje gena *BCL-2*, ki je antiapoptotski gen, značilno znižalo pri vzorcih izvlečka skorje ($0,81 \pm 0,01$), MeIQx ($0,56 \pm 0,03$) in kombinaciji PhIP z MeIQx ($0,50 \pm 0,07$). *BCL-2* gen kodira istoimenski encim BCL-2, ki zavira proces apoptoze. Raziskave so pokazale, da je za določanje apoptotskega procesa odločilno razmerje med izražanjem *BAX* in *BCL-2* (Woo in sod., 2000). Iz rezultatov je razvidno, da je to razmerje skoraj dvakrat povečano pri izpostavljenosti nizki koncentraciji MeIQx in kombinaciji PhIP in MeIQx, ne pa tudi ekstraktu skorje piščančjega mesa. Glede na to, da je najmočnejše na znižanje izražanja gena *BCL-2* in s tem na razmerje *BAX/BCL-2* vplivala kombinacija PhIP z MeIQx, bi lahko velik delež tega znižanja pripisali delovanju nizkih koncentracije MeIQx, saj pri koncentraciji 250 μ M MeIQx ($0,84 \pm 0,16$) nismo opazili tako izrazitega vpliva na omenjeni gen.

Rezultati izražanja genov pri izpostavitvi celic 1 vol% vzorca skorje pečene perutnine nakazujejo, da ima izvleček velik vpliv na indukcijo izražanja metabolnih encimov. Izrazit učinek delovanja je viden pri genih iz družine citokrom P450 (*CYP1A1* in *CYP1A2*), kar je v skladu s številnimi raziskavami proučevanja metabolizma HCA, ki so prisotni v našem proučevanem izvlečku skorje (PhIP, MeIQx in DiMeIQx). Značilno, a v manjši meri, je bilo povečano tudi izražanje encimov II. stopnje metabolizma (*NAT2* in *UGT1A1*). *NAT2* ima pomembno vlogo pri pretvorbi HCA v reaktivne metabolite, medtem ko encim *UGT1A1* preoblikuje intermedie HCA v nestrupeno obliko spojin. Višje izražanje gena *UGT1A1* v primerjavi z izražanjem gena *NAT2* je lahko vzrok za nastanek manjše količine

reaktivnih spojin, ki lahko poškodujejo DNA in druge celične komponente. Naša raziskava je pokazala, da je bil test mikrojeder bolj občutljiv test kot test komet. Kljub morebitni večji detoksifikaciji HCA nam rezultati testa mikrojeder (pri 0.2 in 1 vol% vzorcu skorje) nakazujejo, da so se HCA izvlečka skorje pečene perutnine v določeni meri pretvorili tudi v reaktivne metabolite. Produkti delovanja NAT2 so nestabilni estri, ki se s kovalentno vezjo vežejo na DNA in tvorijo adukte. Odziv celice na poškodbe DNA nam nakazuje povišano izražanje gena *CDKN1A*. Regulator celičnega cikla (*CDKN1A*) zaustavi celico v G1 točki celične delitve, s čimer si celica pridobi čas za popravilo nastalih poškodb DNA in tako preprečuje prenos le-teh v naslednjo generacijo. Nespremenjeno izražanje gena *BAX* nakazuje, da celice niso sprožile signala za proces programirane celične smrti. V nasprotju znižano izražanje gena *BCL-2* nakazuje težnjo k manjšemu zaviranju nastanka omenjenega procesa, kar se je odrazilo v povečanem razmerju izražanja med pro- in anti-apoptotskima genoma *BAX* in *BCL-2* in je pokazatelj povečane apoptoze. Raziskav vpliva HCA na apoptozo je izjemno malo in naši rezultati nakazujejo, da izpostavljenost predvsem nizkim koncentracijam HCA lahko vpliva na povečano apoptozo.

6 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov smo oblikovali naslednje sklepe:

- Izvleček skorje pečenega piščančjega mesa, ki vsebuje heterociklične amine (PhIP, MeIQx in DiMeIQx), je pri bakteriji *S. typhimurium* sev TA98 v prisotnosti metabolne aktivacije z S9-zmesjo povzročil statistično značilno od doze odvisno povečanje števila mutacij in sicer -1 premik bralnega okvirja.
- Izvleček sredice pečenega piščančjega mesa je pri bakteriji *S. typhimurium* sev TA98 v prisotnosti metabolne aktivacije z S9-zmesjo rahlo, a statistično značilno povečal nastanek mutacij, kar je lahko posledica prisotnosti heterocikličnih aminov v koncentracijah, ki so pod mejo detekcije analitskih metod.
- Test MTT je pokazal, da izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa v koncentracijah 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 in 1 vol% ne vplivata na preživetje celic HepG2.
- Pri testu komet na celicah HepG2 izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa tudi v najvišji testirani koncentraciji (1 vol%) nista povzročila eno- in dvoverižnih prelomov ter alkalno labilnih mest molekule DNA.
- Pri testu mikrojedr na celicah HepG2 sta najvišji testirani koncentraciji vzorca (0.2 in 1 vol%) skorje pečene perutnine povišali število celic z mikrojedri. Izvleček pečene perutnine ni povzročil nastanka nukleoplazmatskih mostičkov kot tudi ne jedrnih brstov.
- Izvleček sredice ni vplival na nastanek mikrojedr, nukleoplazmatskih mostičkov in jedrnih brstov pri celicah HepG2.
- Izvlečka skorje in sredice pečenega piščančjega mesa nista vplivala na delitev celic HepG2.
- Test mikrojedr se je izkazal za bolj občutljivo metodo kot test komet za zaznavanje genotoksičnega potenciala izvlečka pečene perutnine na celicah HepG2.
- Izvleček sredice pečene perutnine (1 vol%) ni vplival na izražanje genov, ki so vključenih v metabolno pretvorbo ksenobiotikov, odgovor celice na poškodbe DNA in apoptozo.
- Izvleček skorje pečene perutnine (1 vol%) je povišal izražanje genov, ki so vključeni v metabolizem ksenobiotikov (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *NAT2* in *UGT1A1*).

- Izvleček skorje pečene perutnine je povišal izražanje gena *CDKN1A*, ki je vključen v odgovor celice na poškodbe DNA, medtem, ko na izražanje gena *MDM2* ni vplival.
- Izvleček skorje pečene perutnine bistveno močnejše inducira izražanje presnovnih genov *CYP1A1*, *CYP1A2* in *UGT1A1* ter na poškodbe DNA odzivnega gena *CDKN1A* kot ekvivalentne koncentracije MeIQx, PhIP ali kombinacija PhIP z MeIQx. Rezultat nakazuje, da so v izvlečku prisotne neidentificirane snovi z močnim vplivom na izražanje presnovnih genov.
- Izvleček skorje pečene perutnine je nekoliko znižal izražanje antiapoptotskega gena *BCL-2*, medtem ko na izražanje proapoptotskega gena *BAX* ni vplival. Pri ekvivalentni količini sta MeIQx in kombinacija PhIP z MeIQx, ne pa tudi PhIP, močno znižala izražanje gena *BCL-2* in s tem povišala razmerje *BAX/BCL-2*. Ta rezultat kaže, da MeIQx pri nizkih koncentracijah lahko omogoča apoptozo. To je povsem nova ugotovitev, ki jo velja v prihodnosti podrobneje raziskati.

7 POVZETEK

Termično obdelano meso vsebuje kompleksno mešanico zdravju škodljivih snovi. Najpomembnejši med njimi so genotoksični heterociklični amini (HCA), ki z vezavo na DNA poškodujejo dedni material in povzročajo nastanek raka.

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti ali izvlečka izolirana iz skorje in sredice pečenega piščančjega mesa povzročata mutacije in poškodbe DNA. Potencialno strupeno delovanje izvlečkov smo preverjali s pomočjo bioloških testov, ki nam omogočajo vpogled v celostno delovanje kompleksnih mešanic in upoštevajo interakcije med različnimi sestavinami vzorca. Mutageno delovanje izvlečkov smo preverjali z Amesovim testom na bakterijah (*S. typhimurium* sev TA98), genotoksično delovanje pa na človeških jetrnih celicah HepG2 s testom komet in testom mikrojedder. Vpliv izvlečkov na izražanje izbranih genov, ki so vključeni v metabolno pretvorbo ksenobiotikov, odgovor celice na poškodbe DNA in apoptozo, smo preverjali s kvantitativnim PCR v realnem času.

Rezultati Amesovega testa so pokazali, da je izvleček skorje pečenega piščančjega mesa že pri najnižji testirani koncentraciji (0.125 µg izvlečka/ploščo) povzročil 4.48-kratno povišanje števila revertant, medtem ko je izvleček sredice pečene perutnine izkazal šibko mutageno delovanje in povišal število revertiranih kolonij pri koncentraciji 5 in 10 µg/ploščo. Pri testiranju citotoksičnega potenciala vzorcev s testom MTT nobena od koncentracij (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 in 1 vol%) izvlečka sredice in skorje pečenega piščančjega mesa ni vplivala na živost celic HepG2. Rezultati testa komet so pokazali, da izvlečka skorje in sredice pečene perutnine tudi pri najvišji testirani koncentraciji (1 vol%) nista povzročila eno- in dvoverižnih prelomov molekule DNA ter alkalno labilnih mest. Pri testu mikrojedder sta 0.2 in 1 vol% izvlečka skorje pečene perutnine povišala število celic z mikrojedri, 0.2 vol% vzorca skorje pa je poleg tega povišal še celokupno število mikrojedder v celicah HepG2. Izvlečka skorje in sredice pečene perutnine tudi pri najvišjem 1 vol% nista povišala števila jedrnih brstov, kot tudi ne nukleoplazmatskih mostičkov in nista vplivala na delitveni cikel celic HepG2. Z metodo qrtPCR smo ugotovili, da izvleček sredice pečene perutnine (1 vol%) ni vplival na izražanje genov, ki so vključeni v metabolno pretvorbo ksenobiotikov (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *UGT1A1* in *NAT2*), odgovor celice na poškodbe DNA (*CDKN1A* in *MDM2*) in apoptozo (*BAX* in *BCL-2*), medtem ko je vzorec skorje (1 vol%) v primerjavi s kontrolno skupino povišal izražanje genov *CYP1A1* (64.38-krat) in *CYP1A2* (43.04-krat) kot tudi *NAT2* (2.05-krat) in *UGT1A1* (3.19-krat). Izvleček skorje je povišal izražanje gena *CDKN1A* (1.68-krat) in znižal izražanje gena *BCL-2* (0.81-krat), medtem ko na izražanje genov *MDM2* in *BAX* ni vplival.

8 VIRI

- Abel P. D. 1996. *Water Pollution Biology*. 2nd edition. London, Taylor & Francis Ltd.
- Aden D. P., Vogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowless B. B. 1979. Controlled synthesis of HbsAg in different human liver carcinoma derived cell line. *Nature*, 282: 615-616.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2003. *Tissues and Cancer. V: Essential Cell Biology*. 2nd edition. New York, Garland Science: 726-737.
- Alldrick A. J., Flynn J., Rowland I. R. 1986. Effects of plant-derived avonoids and polyphenolic acids on the activity of mutagens from cooked food. *Mutation Research*, 163: 225-232.
- Alldrick A. J., Rowland I. R. 1987. Counteraction of the genotoxicity of some cooked food mutagens by bio-genic amines. *Food and Chemical Toxicology*, 25: 575-580.
- Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in medicini. *Farmacevtski Vestnik*, 55: 215-220.
- Arnoldi A., Arnoldi C., Baldi O., Ghizzoni C. 1990. Effect of lipids in the Maillard reaction. In *The Maillard Reaction. Advances in Life Sciences*, ed. P. A. Finot, H. U. Aeschbacher, R. F. Hurrell, R. Liardon. Birkhäuser Verlag, Basel: 133-138.
- Arvidsson P., van Boekel M. A. J. S., Skog K., Jägerstad M. 1997. Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *Journal of Food Science*, 62: 911-916.
- Augustsson K., Skog K., Jägerstad M., Dickman, P. W., Steineck G. 1999. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: A population-based study. *Lancet*, 353: 703-707.
- Bacon J. R., Williamson G., R. Colin G., Lappin G., Langouët S., Bao Y. 2003. Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis*, 24(12): 1903-1911.
- Barnes W. S., Maher J. C., Weisburger J. H. 1983. High-pressure liquid chromatographic method for the analysis of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a mutagen formed during the cooking of food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 883-886.
- Beland F. A., Kadlubar F. F. 1985. Formation and persistence of arylamine DNA adducts in vivo. *Environ Health Perspect*, 62: 19-30.
- Boobis A. R., Lynch A. M., Murray S., De la Torre R., Solans A., Farre' M., Segura J., Gooderham N. J., Davies D. S. 1994. CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Research*, 54: 89-94.

- Broyde S., Wang L., Zhang L., Rechkoblit O., Geacintov N. E., Patel D. J. 2008. DNA adduct structure-function relationships: Comparing solution with polymerase structures. *Chemical Research in Toxicology*, 21: 45–52.
- Buonarati M. H., Tucker J. D., Minkler J. L., Wu R. W., Thompson L. H., Felton J. S. 1991. Metabolic activation and cytogenetic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in Chinese hamster ovary cells expressing murine cytochrome P450 IA2. *Mutagenesis*, 6: 253–259.
- Buonarati M. H., Turteltaub K. W., Shen N. H., Felton J. S. 1990. Role of sulfation and acetylation in the activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine to intermediates which bind DNA. *Mutation Research*, 245: 185-190.
- Bustin S. A. 2004. A-Z of Quantitative PCR. LaYolla, International university line: 882.
- Chen C., Pearson A. M., Gray J. I. 1989. Effect of fat content on mutagenicity of fried beef. 35th ICoMST, Copenhagen, Denmark: 436-439.
- Chen C., Pearson A. M., Gray J. I. 1992. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43: 177-183.
- Cheng K., Chen F., Wang M. 2006. Heterocyclic amines: Chemistry and health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50: 1150-1170
- Chevalier D., Cauffiez C., Allorge D., Lo-Guidice J. M., Lhermitte M., Lafitte J. J., Broyl F. 2001. Five novel natural allelic variants – 951A A C, 1042G A A (D348N), 1156A AT (I386F), 1217G A A (C406Y) and 1291C A T (C431Y) – of the human CYP1A2 gene in a French Caucasian population. *Human Mutation*, 17(4): 355–356.
- Choi J. Y., Stover J. S., Angel K. C., Chowdhury G., Rizzo C. J., Guengerich F. P. 2006. Biochemical basis of genotoxicity of heterocyclic arylamine food mutagens: Human DNA polymerase eta selectively produces a two-base deletion in copying the N2-guanyl adduct of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline but not the C8 adduct at the NarI G3 site. *Jurnal of Biological Chemistry*, 281: 25297–25306.
- Collins A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261.
- Collins A. R., Ma, A-G., Duthie, S. J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*, 336: 69–77.
- Conney A. H. 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Research*, 42: 4875 –4917.
- Constable A., Varga N., Josephy P. D., Guy P., Turesky R. J. 1999. Evaluation of *Escherichia coli* DJ4309 expressing human P450 1A2 in mutagenicity testing of complex food mixtures. *Mutation Research*, 442: 79-87.
- Coughtrie M., Johnston L. 2001. Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metabolism &Disposition*, 29: 522-528.

- Crofton-Sleigh C., Doherty A., Ellard S., Parry E. M., Venitt S. 1993. Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase. *Mutagenesis*, 8: 363-372.
- Crofts F. G., T. R. Sutter, Strickland P. T. 1998. Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis*, 19(11): 1969-1973.
- Cross A. J., Sinha R., 2004. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44: 44–55.
- Culp S. J., Poirier M. C., Beland F. A.. 1993. Biphasic removal of DNA adducts in a repetitive DNA sequence after dietary administration of 2-acetylaminofluorene. *Environmental Health Perspectives*, 99: 273–275.
- Danielson P. B. 2002. The cytochrome p450 superfamily: Biochemistry, evolution, and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*, 3: 561–597.
- Dashwood R. H. 2002. Review Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: 'A to Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutation Research*, 511: 89-112.
- De Stefani E., A. Ronco, M. Mendilaharsu, M. Guidobono, H. Deneo-Pellegrini. 1997. Meat intake, heterocyclic amines, and risk of breast cancer: case control study in Uruguay. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 6(8): 573-581.
- Dearfield K. L., Cimino M. C., McCarroll N. E., Mauer I., Valovic L. R. 2002. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 251: 121-135.
- Delaney J. C., Essigmann J. M. 2008. Biological properties of single chemical-DNA adducts: A twenty year perspective. *Chemical Research in Toxicology*, 21: 232–252.
- Delfino R. J., Sinha R., Smith C., West J., White E., Lin H. J., Liao S. Y., Gim J. S., Ma H. L., Butler J., Anton-Culver H. 2000. Breast Cancer, heterocyclic aromatic amines from meat and *N*-acetyltransferase 2 genotype. *Carcinogenesis*, 21(4): 607-615.
- Dragsted L. O., Frandsen H., Reistad R., Alexander J., Larsen J. C. 1995. DNA-binding and disposition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat. *Carcinogenesis*, 16: 2785-2793.
- Dumont J., Jossé R., Lambert C., Anthérieu S., Le Hegarat L., Aninat C., Robin M. A., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A. 2010a. Differential toxicity of heterocyclic aromatic amines and their mixture in metabolically competent HepaRG cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(2): 256-263.
- Dumont J., Jossé R., Lambert C., Anthérieu S., Laurent V., Loyer P., Robin M. A., Guillouzo A. 2010b. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, No.of pages: 10.

- Edenharder R., Leopold Ch., Kries M. 1995. Modifying actions of solvent extract from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quino-line (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA98. *Mutation Research*, 341: 303-318.
- Eurogentec. 2004. Q&q PCR booklet-0304-V1: 64.
- Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.
- Fan L., Schut H. A., Snyderwine E. G. 1995. Cytotoxicity, DNA adduct formation and DNA repair induced by 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, 16: 775-779.
- Fede J. M., Thakur A. P., Gooderham N. J., Turesky R. J. 2009. Biomonitoring of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and its carcinogenic metabolites in urine. *Chemical Research in Toxicology*, 22: 1096–1105.
- Felton. 1995a. Food Mutagens: The Role of Cooked Food in Genetic Changes. *Science & Technology Review*, July: 6-25.
- Felton. 1995b. Food Mutagens: Mutagenic Activity, DNA Mechanisms, and Cancer Risk. *Science & Technology Review*, September: 6-23.
- Felton J. S., Knize M. G. 1991. Occurrence, identification and bacterial mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mutation Research*, 259: 205–217.
- Felton J. S., Malfatti M. A. 2010. What Do Diet-Induced Changes in Phase I and II Enzymes Tell Us about Prevention from Exposure to Heterocyclic Amines? *The Journal of Nutrition: Biomarkers as Indicators of Cancer Risk Reduction Following Dietary Manipulation*, October 15, 2010.
- Felton J. S., Fultz E., Dolbeare F. A., Knize M. G. 1995c. Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens /carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment. *Biology and Biotechnology Research Program, L-452, Lawrence Livermore National Laboratory, P.O. Box 808, Livermore, CA 94551-9900.*
- Felton J. S., Knize M. G. 1990. Heterocyclic amine mutagens/carcinogens in foods. in: C. S. Cooper, P. L. Grover (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 471–502.
- Felton J. S., M. Jagerstad, M. G. Knize, K. Skog, K. Wakabayashi. 2000. Contents in foods, beverages and tobacco. in: M. Nagao, T. Sugimura (Eds.), *Food Borne Carcinogens Heterocyclic Amines*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England: 31–71.
- Felton S. J., Knize G. M., Wu W. R., Colvin M. E., Hatch F. T., Malfatti M. A. 2007. Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutation Research*, 616: 90-94.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95.

- Fenech M. 1993b. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, 285: 35-44.
- Fernandez A., Tejedor C., Cabrera F., Chordi A. 1995. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using *Photobacterium phosphoreum*. *Water Research*, 29(5): 1281-1286.
- Filipič. 1997. Genotoksičnost mesa. Meso v prehrani in zdravje, Radenci, November: 75-84.
- Flamand N., Maunier J.-R., Maunier P.-A., Agapakis-Causse C. 2001. Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. *Toxicology in Vitro*, 15: 105-114.
- Frandsen H., Grivas S., Turesky R. J., Andersson R., Dragsted L. O., Larsen J. C. 1994. Formation of DNA adducts by the food mutagen 2-amino-3,4,8-trimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) *in vitro* and *in vivo*. Identification of a *N*²-(29-deoxyguanosin-8-yl)-4,8-DiMeIQx adduct. *Carcinogenesis*, 15: 2553-2558.
- Gatehouse D. G., Wilcox P., Forster R., Rowland I., Callender R. D. 1990. Bacterial mutation assays, V: Basic mutagenicity tests. UKEMS recommended procedures. Report of the UKEMS Sub-committee of Guidelines of Mutagenicity Testing. Kirkland D. J. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 13-61.
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 356-401.
- Glatt H. 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 129: 141-170.
- Hada N., Y. Totsuka, T. Enya, K. Tsurumaki, M. Nakazawa, N. Kawahara, Y. Murakami, Y. Yokoyama, T. Sugimura, K. Wakabayashi. 2006. Structures of mutagens produced by the comutagen norharman with *o*- and *m*-toluidine isomers. *Mutation Research*; 493: 115-126.
- Hamadeh H. K., Amin R. P., Paules R. S., Afshari C. A. 2002. An overview of toxicogenomics. *Current Issues in Molecular Biology*, 4: 45-56.
- Harris S. L., A. J. Levine. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17): 2899-2908.
- Hasegawa R., Katot T., Hiroset M., Takahashii S., Shirait T., Ito N. 1996. Enhancement of Hepatocarcinogenesis by Combined Administration of Food-derived Heterocyclic Amines at Low Doses in the Rat. *Food and Chemical Toxicology*, 34: 1097-1101.
- Haza A. I., Morales P. 2010. Effects of (+)catechin and (-)epicatechin on heterocyclic amines-induced oxidative DNA damage. *Journal of Applied Toxicology*, 31(1): 53-62.

- Hein D. W., Doll M. A., Fretland A. J., Leff M. A., Webb S. J., Xiao G. H., Devanaboyina U. S., Nangju N. A., Feng Y. 2000. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9: 29–42.
- Higgs J., Pratt J. 2003. MEAT/Nutritional Value. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd edition: 3798-3808.
- Hirata A., Tsukamoto T., Sakai H., Takasu S., Ban H., Imai T., Totsuka Y., Nishigaki R., Wakabayashi K., Yanai T., Masegi T., Tatematsu M. 2008. Carcinogenic risk of heterocyclic amines in combination - assessment with a liver initiation model. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6): 2003-2009.
- Hoffmann G. R., Fuchs R. P. 1997. Mechanisms of frameshift mutations: Insight from aromatic amines, *Chemical Research in Toxicology*; 10: 347–359.
- Holloway A. J., van Laar R. K., Tothill R. W., Bowtell D. D. 2002. Options available-from start to finish-for obtaining data from DNA microarrays II. *Nature Genetics*, 32 Suppl: 481-489.
- Holme J. A., H. Wallin, Brunborg G., Söderlund E. J., Hongslo J. K., Alexander J. 1989. Genotoxicity of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP): formation of 2-hydroxamino-PhIP, a directly acting genotoxic metabolite. *Carcinogenesis*, 10(8): 1389-1396.
- Holtz E., Skjöldebrand C., Jägerstad M., Laser Reuterswärd A., Isberg P. E. 1985. Effect of recipes on crust formation and mutagenicity in meat products during baking. *Journal of Food Technology*, 20: 57-66.
- IARC (1993) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 56. Some Naturally Occurring Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon: 163-242.
- Iida A., Saito S., Sekine A., Harigae S., Osawa S., Mishima C., Kondo K., Kitamura Y., Nakamura Y. 2001. Catalog of 46 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1) gene. *International Journal of Human Genetics*, 46: 590–594.
- Ingelman-Sundberg M., Oscarson M., McLellan R. A. 1999. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: An opportunity for individualized drug treatment. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20: 342–349.
- Jägerstad M., K. Skog. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*, 574: 156-172.
- Jagerstad M., Laser-Reutersward A., Oste R., Dahlqvist A., Waller G. R., Feather M. S. (Eds.). 1983. The Maillard Reaction in Foods and Nutrition. ACS Symposium 215, American Chemical Society, Washington D. C.: 507-519.
- Jagerstad M., Skog K., Arvidsson P., Solyakov A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *European Food Research & Technology*, 207: 419–427.

- Jagerstad M., Skog K., Grivas S., Olsson K. 1991. Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutation Research*, 259: 219–233.
- Jenne J. W. 2002. Partial purification and properties of the isoniazid transacetylase in human liver: its relationship to the acetylation of *p*-aminosalicylic acid. *The Journal of Clinical Investigation*, 44: 1992-2002, 1965.
- Johansson M., Fredholm L., Bjerna I., Jägerstad M. 1995. Influence of frying fat on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 993-1004.
- Josephy P. D., Gruz P., Nohmi T. 1997. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutation Research*, 386: 1-23.
- Kaderlik K. R., Kadlubar F. F. 1995. Metabolic polymorphisms and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. *Pharmacogenetics* 5: S108-17.
- Kang J. S., Wanibuchi H., Murai T., Morimura K., Kinoshita A., Fukushima S. 2007. Analysis of gene expression in different stages of MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis. *Oncology reports*, 17: 747-75.
- King R. S., Kadlubar F. F., Turesky R. J. 2000a. In vivo metabolism of heterocyclic amines. in: Nagao, M., Sugimura, T. (Eds.). *Food Borne Carcinogens: Heterocyclic Amines*, John Wiley & Sons, Chichester, England: 90–111.
- King R. S., Teitel C. H., Kadlubar F. F. 2000b. In vitro bioactivation of N-hydroxy-2-amino-a-carboline. *Carcinogenesis*, 21: 1347–1354.
- Knasmüller S., C. E. Schwab, Land S. J., Wang C. Y., Sanyal R., Kundi M., Parzefall W., Darroudi F. 1999. Genotoxic effects of heterocyclic aromatic amines in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, 14(6): 533-540.
- 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 component human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, 402: 185-202.
- Knasmüller S., W. Parzefall, 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(1-2): 185-202.
- Knize M. G., Dolbear F. A., Carroll K. L., Moore D. H., Felton J. S. 1994a. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 595-603.
- Knize M., Gandresen B. D., Healy S. K., Shen N. H., Lewis P. R., Bjeldanes L. F., Hatch F. T., Felton J. S. 1985. Effects of temperature, patty thickness and fat content on the production of mutagens in fried ground beef. *Food and Chemical Toxicology*, 23: 1035-1040.

- Kosakarn P., Halliday J. A., Glickman B. W., Joseph P. D. 1993. Mutational specificity of 2-nitro-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *Carcinogenesis*, 14: 511–517.
- Kuehl P., Zhang J., Lin Y., Lamba J., Assem M., Schuetz J., Watkins P. B., Daly A., Wrighton S. A., Hall S. D., Maurel P., Relling M., Brimer C., Yasuda K., Venkataramanan R., Strom S., Thummel K., Boguski M. S., Schuetz E. 2001. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genetics*, 27: 383-391.
- Kulp K. S., Knize M. G., Fowler N. D., Salmon C. P., Felton J. S. 2004. PhIP metabolites in human urine after consumption of well-cooked chicken. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies In the Biomedical and Life Science*, 802: 143–153.
- Wang L., Blasic J. R. Jr., M. J. Holden, Pires R. 2005. Sensitivity comparison of real-time PCR probe designs on a model DNA plasmid. *Analytical Biochemistry*, 344: 257–265.
- Thompson L. H., J. D. Tucker, S. A. Stewart, M. L. Christensen, E. P. Salazar, A. V. Carrano, J. S. Felton. 1998. Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus *Salmonella* mutagenicity. *Mutagenesis*, 2: 483-487.
- Layton D. W., Bogen K. T., Knize M. G., Hatch F. T., Johnson V. M., Felton J. S. 1995. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis*, 16: 39-52.
- Le Hegarat L., J. Dumont, R. Josse, S. Huet, R. Lancelour, A. Mourot, J.M. Poul, C. Guguen-Guillouzo, A. Guillouzo, V. Fessard. 2010. Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, July: 1-6.
- Luch A. 2005. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nature reviews*, 5: 113-12.
- Ferguson L. R. 2009. Meat and cancer. *Meat Science*, 84: 308-313.
- MacGregor J. T., Casciano D., Mueller L. 2000. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, 455: 3-20
- Majer B. J., V. Mersch-Sundermann, Darroudi F., Laky B., de Wit K., Knasmüller S. 2004. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutation Research*, 551(1-2): 153-166.
- Malfatti M. A., Shen N. H., Wu R. W., Turteltaub K. W., Felton J. S. 1995. A correlation of *Salmonella* mutagenicity with DNA adducts induced by the cooked-food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Mutagenesis*, 10: 425–431.

- Marez D., Legrand M., Sabbagh N., Guidice J. M., Spire C., Lafitte J. J., Meyer U. A., Broly F. 1997. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: Characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*, 7: 193–202.
- Maron D. M., Ames B. N. 1984. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Handbook of mutagenicity test procedures*. 2nd edition (Kilbey B. J., Legator M., Nichols W. Ramel C.) Elsevier: 93-140.
- Maron D. M., Ames B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215.
- Milić B. L., Djilas S. M., Canadanović-Brunet J. M. 1993. Synthesis of some heterocyclic aminoimid-azoazarenes. *Food Chemistry*, 46: 273-276.
- Miller A. J. 1985. Processing-induced mutagens in muscle foods. *Food Technology*, 39: 75–79.
- Mortelmans K., Zieger E., 2000. The Ames Salmonella microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60.
- Murayama N., Soyama A., Saito Y., Nakajima Y., Komamura K., Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M., Kimura H., Goto Y., Saitoh O., Katoh M., Ohnuma T., Kawai M., Sugai K., Ohtsuki T., Suzuki C., Minami N., Ozawa S., Sawada J. 2004. Six novel nonsynonymous CYP1A2 gene polymorphisms: Catalytic activities of the naturally occurring variant enzymes. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 308: 300–306.
- Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Food Research Tehnology*, 207(6): 477-480.
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B*, 802: 3–10.
- Nagao M., Honda M., Seino Y., Yahagi T., Sugimura T. 1977. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Letters*, 2: 221-226.
- Nagar S., Walther S., Blanchard L. R. 2006. Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphic variants *1, *2, and *3 are associated with altered enzymatic activity, cellular phenotype, and protein degradation. *Molecular Pharmacology*, 69: 2084-2092.
- Nakajima M., Yokoi T., Mizutani M., Kinoshita M., Funayama M., Kamataki T. 1999. Genetic polymorphism in the 5-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Tokyo, 125: 803 –808.
- Navodila 10G-Pos- , Test mikro jeder. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo. Pripravila dr. Bojana Žegura.
- Navodila 10G-Pos02-01, Ames (*S. typhimurium*). Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo. Pripravili Nataša Sever in dr. Bojana Žegura.

- Navodila 10G-Pos03-01, MTT test. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo. Pripravila dr. Bojana Žegura.
- Navodila 10G-Pos07-0, Izolacija RNA in DNA s Trizol[®] reagentom. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo. Pripravili Boris Gole.
- Navodila Alkalni test komet. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo. Pripravila mag. Tanja Fatur.
- Nebert D. W., Russell D. W. 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360: 1155–1162.
- Nelson D. R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369: 1–10.
- Norrish A. E., Ferguson L. R., Knize M. G., Felton J. S., Sharpe S. J., Jackson R. T. 1999. Heterocyclic amine content of cooked meat and risk of prostate cancer. *Journal of National Cancer Institution*, 91(23): 2038-2044.
- NTP, 2002. Report of Carcinogens Background Document for Heterocyclic Amines: PhIP, MeIQ and MeIQx. National Toxicology Program.
<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/newhomeroc/roc11/HCAasPub.pdf>
- Nuwaysir E. F., Bittner M., Trent J., Barrett J. C., Afshari C. A. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis*, 24: 153-9.
- Ohta T., 2006. Mutagenic Acitivity of a Mixture of Heterocyclic Amines at Doses below the Biological Threshold Level of Each. *Genes and Environment*, 28: 181-184.
- Orphanides G., Kimber I. 2003. Toxicogenetics: Applications and Opportunities, *Toxicological Science*, 75: 1-6.
- Ouali A., Herrera-Mendez C. H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu M. A. 2006. Rervisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74: 44-58.
- Hodeka P., J. Krizkova, K. Burdovaa, M. Sulc, R. Kizek, J. Hudecek, M. Stiborova. 2009. Chemopreventive compounds-View from the other side. *Chemico-Biological Interactions*, No. of page 9.
- Pais P., Knize M. G. 2000. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *Journal of Chromatography B*, 747: 139–169.
- Pais P., Salmon C. P., Knize M. G. and Felton J. S. 1999. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1098-1108
- Palka K. 2004. Heat effect on meat. *Physics and chemistry, V: Encyclopedia of meat science*. Vol. 2. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1st edition. Oxford, Elsevier Ltd.: 567-570.
- Pegg R. B., Shahidi F. 2004. Heat effects on meat. *Flavour development, V: Encyclopedia of meat science*. Vol.2. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1st edition. Oxford, Elsevier Ltd.: 570-578.

- Pelkonen, O., Vahakangas, K., Raunio, H. 2003. Xenobiotic metabolism and cancer susceptibility: Harri U. V., Eino K. H. (Eds.), *Mechanisms in Carcinogenesis and Cancer Prevention*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 253-269.
- Pennie W. D., Woodyatt N. J., Aldridge T. C., Orphanides G. 2001. Application of genomics to the definition of the molecular basis for toxicity. *Toxicology Letters*, 120: 353-8.
- Pfau W., F. L. Martin, Cole K. J., Venitt S., Phillips D. H., Grover P. L., Marquardt H. 1999. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20(4): 545-551.
- Pfau W., L. Martin F., J. Cole K., Venitt S., H. Phillips D., L. Grover P., Marquardt H. 1999. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20(4): 545-551.
- Randa A. El-Zein, M. B. Schabath, C. J. Etzel, M. S. Lopez, J. D. Franklin, M. R. Spitz. 2006. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk. *Cancer Research*, 66(12): 6449-6456.
- Ristic A., Cichna M., Sontag G. 2004. Determination of less polar heterocyclic aromatic amines in standardized beef extracts and cooked meat consumed in Austria by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 802: 87-94.
- Rovito P. M., Morse P. D., Spinek K., Newman N., Jones R. F., Wang C. Y., Haas G. P. 2005. Heterocyclic amines and genotype of N-acetyltransferases as risk factors for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, 8: 69-74.
- Sachse C., Bhambra U., Smith G., Lightfoot T. J., Barrett J. H., Scollay J., Garner R. C., Boobis A. R., Wolf C. R., Gooderham N. J. 2003. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55: 68-76.
- Salmon C. P., Knize M. G., Felton J. S. 1997. Effects of marination on the of heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 433-441.
- Sanz Alaejos M. S., Pino V., M. Alfonso A. 2008. Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: Influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. *Food Research International*, 41(4): 327-340
- Sasaki Y. 2003. 33rd Annual EEMS Meeting on Detection of the Fate of DNA Damage Detected by the Comet Assay in HepG2 Cells, from Hazard to Risk, Aberdeen, UK, European Environmental Mutagen Society.
- Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P.O., Davis R.W. 1996. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 10614-9.

- Schut H. A., E. G. Snyderwine. 1999. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20(3): 353-368.
- Shibutani S., Fernandes A., Suzuki N., Zhou L., Johnson F., Grollman A. P. 1999. Mutagenesis of the N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine DNA adduct in mammalian cells. Sequence context effects. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 27433–27438.
- 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.
- Sinha R., Gustafson D. R., Kulldorff M., Wen W. Q., Cerhan J. R., Zheng W. 2000a. 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin, a carcinogen in high-temperature-cooked meat, and breast cancer risk. *Journal of National Cancer Institute*, 92(16): 1352-4.
- Sinha R., Kulldorff M., Chow W.-H., Denobile J., Rothman N. 2001. Dietary heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10: 559–562.
- Sinha R., Kulldorff M., Swanson C. A., Curtin J., Brownson R. C., Alavanja M. C. 2000b. Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among Missouri women. *Cancer Research*, 60(14): 3753-3756.
- Sinha R., Rothman N., Brown E. D., Salmon C. P., Knize M. G., Swanson C. A., Rossi S. C., Mark S. D., Levander O. A., Felton J. S. 1995. High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking. *Cancer Research*, 55: 4516-4519.
- Sinikka V., Matveinen K., Reunanen A. 1993. GC/MS determination of the mutagenic heterocyclic amines MeIQx and DiMeIQx in cooking fumes. *Fersenius's Journal of Analytical Chemistry*, 345: 462-466.
- Skog K., Eneroth A., Svanberg M. 2003. Effect of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International Journal of Food Science and Tehnology*, 38(3): 313-323.
- Skog K. I., Johansson M. A. E., Jägerstad M. I. 1998. Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 879-896.
- Skog K., Jägerstad M., Laser Reuterswärd A. 1992b. Inhibitory effect of carbohydrates on the formation of mutagens in fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 30: 681-688.
- Skog K., Knize M. G., Felton J. S., Jägerstad M. 1992a. Formation of new heterocyclic amines mutagens by heating creatinine, alanine, threonine and glucose. *Mutation Research*, 268: 191-197.

- Skog K., Solyakov A., Jagerstad M. 2000. Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to amino-carbolines in a meat juice model system. *Food Chemistry*, 68: 299-308.
- Skrt A. 2009. Mutagenost heterocikličnih aminov iz različnih vrst pečenega mesa in njihov vpliv na proteinski profil celic humanega hepatoma HepG2. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 18-19.
- Snyderwine E. G., Schut H. A. J., Sugimura T., Nagao M., Adamson R. H. 1994. DNA adduct levels of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in tissues of cynomolgus monkeys after single or multiple dosing. *Carcinogenesis*, 15: 2757–2761.
- Solomon M. S., Morgenthaler P. M. L., Turesky R. J., Essigmann J. M. 1996. Mutational and DNA binding specificity of the carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 18368–18374.
- Spingarn N. E., Garvie-Gould C., Vuolo L. L., Weisburger J. H. 1981. Formation of mutagens in cooked foods IV. Effect of fat content in fried beef patties. *Cancer Letters*, 12: 93-97.
- Stillwell W. G., Kidd L. C. R., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., Sinha R. 1997. Urinary excretion of unmetabolized and phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in humans: relationship to cytochrome P4501A2 and *N*-acetyltransferase activity. *Cancer Research*, 57: 3457–3464.
- Strange R. C., Spiteri M. A., Ramachandran S., Fryer A. A. 2001. Glutathione *S*-transferase family of enzymes. *Mutation Research*, 482: 21–26.
- Sugimura T. 1988. Successful use of short-term tests for academic purposes: Their use in identification of new environmental carcinogens with possible risk for humans. *Mutation Research*, 205: 33–39.
- Sugimura T. 1992. Multistep carcinogenesis: A 1992 perspective, *Science*, 258: 603-607.
- Sugimura T., K. Wakabayashi, H. Nakagama, M. Nagao. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95: 290-299.
- Sugimura T., Nagao M., Kawachi T., Honda M., Yahagi T., Seino Y., Sato S., Matsukara N., Shirai A., Sawamura M., Matsumoto H. 1977. Mutagens-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. in: *Origins of Human Cancer*, ed. H. H. Hiatt, J. D. Watson and J. A. Winsten. Cold Spring Harbour Laboratory, New York: 1561-1577.
- Sugimura T., Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H. 1993. A new class of carcinogens: heterocyclic amines in cooked food. in: *Food, Nutrition and Chemical Toxicity*, ed. D. V. Parke, C. Ioannides and R. Walker, Smith-Gordon and Nishimura Ltd.: 259-276.

- Sugimura, T., M. Nagao, K. Wakabayashi. 1982. Metabolic aspects of the comutagenic action of norharman. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 136B: 1011-1025.
- Polak T., A. Rajar, L. Gašperlin, B. Žlender. 2008. Cholesterol concentration and fatty acid profile of red deer (*Cervus elaphus*) meat. *Meat Science*, 80(3): 864-869.
- Polak T., S. Andrenšek, B. Žlender, L. Gašperlin. 2009. Effects of ageing and low internal temperature of grilling on the formation of heterocyclic amines in beef *Longissimus dorsi* muscle. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (1): 256-264.
- Tan X., Suzuki N., Grollman A. P., Shibutani S. 2002. Mutagenic events in *Escherichia coli* and mammalian cells generated in response to acetylaminofluorene-derived DNA adducts positioned in the Nar I restriction enzyme site. *Biochemistry*, 41: 14255–14262.
- Tice R. R., Agurell E., Andreson 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.
- Tikkanen L. M., Latva-Kala K. J., Heinio R-L. 1996. Effect of commercial marinades on the mutagenic activity, sensory quality and amount of heterocyclic amines in chicken grilled under different conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 34: 725-7301.
- Tikkanen L. M., Sauri T. M., Latva-Kala K. J. 1993. Screening of heat-processed Finnish foods for the mutagens 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Food and Chemical Toxicology*, 31: 717-721.
- Totsuka T., Nishigaki R., Sugimura T., Wakabayashi K. 2006. The possible involvement of mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines in human cancer, in: K. Skog, J. Alexander (Eds.). *Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods*. Woodhead Publisher, Boca Raton, FL: 296–515.
- Totsuka Y., Ushiyama H., Ishihara J., Sinha R., S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi. 1999. Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer Letters*, 143: 139–143.
- Tsuda H., Sekine K., Uehara N., Takasuka N., Moore M. A., Konno Y., Nakashita K., Degawa M. 1999. Heterocyclic amine mixture carcinogenesis and its enhancement by caffeine in F344 rats. *Cancer Letters*, 143: 229-234.
- Turesky R. J. 2002. Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. *Drug Metabolism Review*, 34(3): 625–50.
- Turesky R. J., Box R. M., Markovic J., Gremaud E., Snyderwine E. G. 1997. Formation and persistence of DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat and nonhuman primates. *Mutation Research*, 376: 235–241.
- Turesky R. J., Goodenough A. K., W. Ni, L. McNaughton, D. M. LeMaster, R. D. Holland, R. W. Wu, J. S. Felton. 2007. Identification of 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline: An abundant mutagenic heterocyclic aromatic amine formed in cooked beef. *Chemical Research in Toxicology*, 20: 520–530.

- Turesky R. J., J. Taylor, L. Schnackenberg, J. P. Freeman, R. D. Holland. 2005. Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3248–3258.
- Turesky R. J., Garner R. C., Welti D. H., Richoz J., Leveson S. H., Dingley K. H., Turteltaub K. W., Fay L. B. 1998. Metabolism of the food-borne mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans. *Chemical Research in Toxicology*, 11(3): 217-225.
- Turesky R. J. 2005. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 101-117.
- Turesky R. J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168: 219-227.
- Turesky R. J., F. P. Guengerich, A. Guillouzo, S. Langouet. 2002. Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. *Mutation Research*: 506-507, 187-195.
- Turesky R. J., Vouros P. 2004. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies In the Biomedical and Life Science*, 802: 155-166.
- Turesky R. J. 2010. *Advances in molecular toxicology*. James C. Fishbein. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, Baltimore County, Baltimore, USA, Vol. 4; Robert J. Turesky, *Heterocyclic Aromatic Amines: Potential Human Carcinogens*: 37-83.
- Uhl M., Helma C., Knasmüller S. 1999. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research*, 441: 215–224.
- Uhl M., Plewa M. J., Majer B. J., Knasmüller S. 2003. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. V: Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health. Maluszynska J. in Plewa M. (ur.). Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice: 11–2.
- 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(1-2): 79-90.
- van Delft J. H. M., Kleinjans J. C. S. 2007. Predictive toxicogenomics for cancer risk assessment. *Zdravniški vestnik*, 76, Supl.II: 25-26.
- Vesell E., Gaylor D. 1995. Limitations of probit plots in pharmacogenetics: requirement of genetic analyses to test hypotheses based on graphical methods. *Pharmacogenetics*, 5: 18-23.
- Vikse R., Reistad R., Steffensen I. L., Paulsen J. E., Nyholm S. H., Alexander J. 1999. Heterocyclic amines in cooked meat. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 10: 119(1): 45-9.

- Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H., Sugimura T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Research (Suppl.)* 52: 2092s-2098s.
- Walker N. J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296: 557-559.
- Walters D. G., Young P. J., Agus C., Knize M. G., A. R. Boobis, N. J. Gooderham, B. G. Lake. 2004. Cruciferous vegetable consumption alters the metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in humans. *Carcinogenesis*, 25: 1659-1669.
- Wang Y. Y., Vuolo L. L., Spingarn N. E., Weisburger J. H. 1982. Formation of mutagens in cooked foods. V. The mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef. *Cancer Letters*, 16: 179-189.
- Watanabe M., Ohta T. 1993. Analysis of mutational specificity induced by heterocyclic amines in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Carcinogenesis*, 14: 1149-1153.
- Waters M. D., Fostel J. M. 2004. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nature Reviews Genetics*, 5: 936-48.
- Weber W. W. 1987. *The Acetylator Genes and Drug Response*. Oxford University Press New York.
- Weber W. W., Hein D. W. 1985. *N*-Acetylation pharmacogenetics. *Pharmacological Reviews*, 37: 25-79.
- Westerink W. M., W. G. Schoonen. 2007. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology In Vitro*, 21(8): 1592-1602.
- Wilkening S., Bader A. 2003. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(4): 207-213.
- Wong M. L., Medrano J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1): 75-85.
- Woo M., Hakem R., Mak T. W. 2000. Executionary pathway for apoptosis: lessons from mutant mice. *Cell Research*, 10: 267-278.
- Wrangham R., Conklin-Brittain N. 2003. Cooking as a biological trait. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, 136: 35-46.
- Wu R. W., Tucker J. D., Sorensen K. J., Thompson L. H., Felton J. S. 1997. Differential effect of acetyltransferase expression on the genotoxicity of heterocyclic amines in CHO cells. *Mutation Research*, 390: 93-103.
- Yoshimoto M., Tsutsumi M., Iki K., Sasaki Y., Tsujiuchi T., Sugimura T., Wakabayashi K., Konishi Y. 1999. Carcinogenicity of heterocyclic amines for the pancreatic duct epithelium in hamsters. *Cancer Letters*, 143: 235-239.
- Zhou H., Joseph P. D., Kim D., Guengerich F. P. 2004. Functional characterization of four allelic variants of human cytochrome P450 1A2. *Archives of Biochemistry And Biophysics*, 422: 23-30.

- Zhu H., A. R. Boobis, Gooderman N. J. 2000. The food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine activates S-phase checkpoint and apoptosis, and induces gene mutation in human lymphoblastoid TK6 cells. *Cancer Research*, 60(5): 1283-1289.
- Žegura B., Filipič M. 2004. Application of in vitro comet assay for genotoxicity testing. V: *Methods in pharmacology and toxicology optimization in drug discovery: In vitro methods*. Yan Z., Caldwell G. W. (ur.). Totova, New Jersey, Humana press: 301-313.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji somentorici dr. Bojani Žegura, ki me je potrpežljivo vodila skozi eksperimentalni del in me z nasveti usmerjala pri pisanju diplomske naloge. Brez njene pomoči, podpore in odgovorov na porajajoča se vprašanja, naloga ne bi imela pričujoče oblike.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Kristini Sepčić za pomoč, prijaznost in vzpodbudne besede.

Hvala recenzentki prof. dr. Metki Filipič, da mi je omogočila opravljanje diplome na Nacionalnem inštitutu za biologijo in strokovni pregled naloge.

Hvala predsednici komisije prof. dr. Damjani Drobne za pregled diplomske naloge.

Zahvala velja tudi slavistki Tatjani Reščič Rihar za lektoriranje diplomske naloge in Primožu Bevcu za računalniško obdelavo.

Največjo zahvalo dolgujem svojim domačim za brezpogojno ljubezen in podporo.