

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Matjaž NOVAK

**ZAŠČITNO DELOVANJE KSANTOHUMOLA ZOPER
GENOTOKSIČNO DELOVANJE HETEROCIKLIČNEGA AMINA
MeIQx**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**PROTECTIVE ACTIVITY OF XANTHOHUMOL AGAINST
GENOTOXIC ACTIVITY OF HETEROCYCLIC AMINE MeIQx**

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 gensko toksikologijo in biologijo raka.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčić in za so-mentorico dr. Bojano Žegura.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom Turk

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka: prof. dr. Metka Filipič

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

Članica: prof. dr. Kristina Sepčić

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Bojana Žegura

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

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

Datum zagovora: 27.6.2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matjaž Novak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.61:615.9:616-006(043.2)=163.6
KG ksantohumol/MeIQx/antimutagenost/antigenotoksičnost/Amesov test/test MTT/test komet/test mikrojeder/kvantitativni PCR
AV NOVAK, Matjaž
SA SEPČIĆ, Kristina (mentorica)/ ŽEGURA, Bojana (so-mentorica)
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 ZAŠČITNO DELOVANJE KSANTOHUMOLA ZOPER GENOTOKSIČNO DELOVANJE HETEROCIKLIČNEGA AMINA MeIQx
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 91 str., 3 pregl., 30 sl., 278 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Pri topotni obdelavi živil, predvsem mesa, nastanejo heterociklični amini (HCA), ki so zelo močne mutagene in karcinogene snovi. 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin (MeIQx) je eden izmed 25 izoliranih HCA iz hrane in po IARC klasifikaciji karcinogenih snovi spada v skupino možno karcinogenih snovi za ljudi (skupina 2B). Izpostavljenost HCA v vsakdanjem življenju je praktično neizogibna, zaradi tega so raziskave usmerjene v iskanje in testiranje snovi, ki kažejo antikarcinogene in antimutagene lastnosti in bi lahko delovale zaščitno proti karcinogenemu delovanju HCA. Ena izmed takih snovi je ksantohumol (XN), prenilirani flavonoid, ki se nahaja v hmelju (*Humulus lupulus L.* (*Cannabinaceae*)) in v nizkih koncentracijah tudi v pivu. Izredno učinkovito zavira genotoksične učinke nekaterih HCA, kar kaže na njegovo potencialno uporabnost v obliki prehranskega ali farmacevtskega dopolnila za zaviranje nastanka raka. V diplomski nalogi nas je zanimalo antimutageno, antigenotoksično delovanje XN, kot tudi njegov vpliv ter tudi vpliv kombinacije XN z MeIQx na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v aktivacijo/detoksifikacijo ksenobiotikov. Z Amesovim testom smo najprej preverili mutageno delovanje XN in nato njegovo antimutageno delovanje zoper MeIQx na bakteriji *Salmonella typhimurium*, sev TA98. XN na bakterije ni deloval mutageno, v kombinaciji z MeIQx pa je pokazal antimutageno delovanje, saj je znižal število z MeIQx induciranih revertant v odvisnosti od doze. S testom MTT smo ugotovili, da XN pri koncentracijah do 10 µM ne vpliva na preživelost celic humanega hepatoma (HepG2). Tudi v kombinaciji z MeIQx XN ni vplival na citotoksično delovanje samega MeIQx, saj ni bilo razlike med zmanjšanjem preživelosti, ki jo je povzročil sam MeIQx in v kombinaciji s XN. Antigenotoksično delovanje XN smo preverili na HepG2 celicah z alkalmi testom komet in s testom mikrojeder, kjer smo DNA poškodbe povzročili z MeIQx. V testu komet je XN pokazal izrazito antigenotoksično delovanje. S testom mikrojeder nismo mogli ovrednotiti antigenotoksičnega potenciala, ker sam MeIQx ni povzročil tvorbe mikrojeder. S tem testom pa smo pokazali tudi, da sam XN ne povzroči tvorbe mikrojeder. S kvantitativnim PCR smo pokazali, da je sam XN povečal izražanje genov *CYP1A1*, *CYP1A2*, *UGT1A2*, medtem ko je izražanje genov *NAT2*, *SULT1A1* zmanjšalo. V kombinaciji z MeIQx XN ni biološko pomembno spremenil izražanja genov *CYP1A1* in *SULT1A1* glede na sam MeIQx, medtem ko je pri koncentracijah 1 in 10 µM v odvisnosti od doze statistično značilno znižal izražanje gena *CYP1A2* glede na sam MeIQx. XN v kombinaciji z MeIQx je le pri najvišji koncentraciji statistično značilno povisil izražanje genov *UGT1A* in *NAT2* glede na MeIQx. Iz raziskave lahko povzamemo, da XN deluje antimutagno, antigenotoksično, ter da sam oziroma v kombinaciji z MeIQx vpliva na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v aktivacijo/detoksifikacijo ksenobiotikov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.61:615.9:616-006(043.2)=163.6
CX xanthohumol/MeIQx/antimutagenicity/antigenotoxicity/Ames test/test MTT/comet assay/micronucleus assay/quantitative PCR
AU NOVAK, Matjaž
AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor)/ŽEGURA, Bojana (co-supervisor)
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 PROTECTIVE ACTIVITY OF XANTHOHUMOL AGAINST GENOTXIC ACTIVITY OF HETEROCYCLIC AMINE MeIQx
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 91 p., 3 tab., 30 fig., 278 ref.
LA sl
AL sl/en
AB During the thermal processing of food, especially meat, heterocyclic amines (HCA), which are strong mutagens and carcinogens, are formed. MeIQx is one of the 25 isolated HCA from different food samples. By IARC classification of human carcinogens, it belongs to the group of compounds possibly carcinogenic for people (group 2B). As exposure to HCA is our everyday life practically unavoidable effort are focused toward searching and testing of substances, which show antimutagenic and anticarcinogenic characteristics and could protect against carcinogenic effects of HCA. One such substance is xanthohumol (XN), prenylated flavonoid present in hop (*Humulus Lupulus* L. (Cannabaceae) and in low concentrations also in beer. It successfully prevents the genotoxic effects of several HCA, indicating its potential usefulness as a food or pharmaceutical supplement, which prevents the development of cancer. In the present study, we investigated antimutagenic and antigenotoxic activity of XN, as well as its influence and the influence of the combination of XN with MeIQx on expression of selected genes that are involved in the activation/detoxification of xenobiotics. First we examined the mutagenic activity of XN with the Ames test, and then its antimutagenic activity against MeIQx on the bacteria *Salmonella typhimurium*, strain TA98. XN did not show mutagenic activity on *S. typhimurium*, but in the combination with MeIQx it showed antimutagenic activity with concentration-dependent decrease of MeIQx-induced revertants. With the MTT assay we showed that MeIQx did not affect cell viability of human hepatoma cells (HepG2) at concentrations up to 10 µM. Also in the combination with MeIQx, XN did not affect the cytotoxicity, because there was no difference in reduction of cell viability induced by MeIQx alone and its combination with XN. We tested the antigenotoxic effect of XN on HepG2 cells with the comet assay and the micronucleus test, where we induced DNA damage with MeIQx. In the comet assay, XN showed pronounced antigenotoxic activity against MeIQx induced DNA strand breaks. In the micronucleus test however we could not evaluate the antigenotoxic potential of XN as MeIQx did not induce micronuclei but, we showed that XN alone does not induce micronuclei formation. With the quantitative PCR, we showed that XN increased expressions of *CYP1A1*, *CYP1A2*, *UGT1A2* genes, and decreased expressions of *NAT2*, *SULT1A1* genes. In combination with MeIQx, XN did not cause biologically important changes in expression of genes *CYP1A1* and *SULT1A1* comparing to MeIQx. Meanwhile, the concentrations of 1 and 10 µM statistically significantly and in the dose dependent manner decreased expression of *CYP1A2* comparing to MeIQx. Only in the highest concentration, has XN in combination with MeIQx significantly increased the gene expression of *UGT1A* and *NAT2* comparing to MeIQx. From the results we can conclude that XN has antimutagenic and antigenotoxic activity, and that it alone and in combination with MeIQx affects expression of the selected genes, which are involved in activation/detoxification of xenobiotics.

KAZALO VSEBINE:

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik	VIII
Kazalo preglednic	IX
Okrajšave in simboli	X

1 UVOD	1
1.1 Namen dela	2
1.2 Hipoteza.....	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 Toplotna obdelava mesa in pojav heterocikličnih aromatskih spojin.....	4
2.2 Heterociklični amini (HCA)	5
2.2.1 Nastanek HCA	6
2.2.2 Bioaktivacija HCA in tvorba DNA aduktov	7
2.2.3 Biološki učinki HCA-DNA aduktov.....	8
2.2.4 Mutagenost in karcinogenost HCA.....	8
2.2.5 MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin)	9
2.3 Zaščitni mehanizmi pred HCA	11
2.4 Hmelj	12
2.4.1 Flavonoidi	12
2.4.1.1 Ksantohumol	14
2.4.1.1.1 Biološka dostopnost XN in vpliv XN na prenašalne proteine	15
2.4.1.1.2 Presnova XN	16
2.4.1.1.3 Učinkovanje XN	16
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 XN in MeIQx	20
3.2 Kemikalije	20
3.3 Določanja mutagenega/antimutagenega delovanja z Amesovim testom	21
3.3.1 Amesov test.....	21
3.3.2 Sevi bakterije <i>S. typhimurium</i>	22
3.3.3 Gojenje kultur bakterij <i>S. typhimurium</i>	22

3.3.4 Metabolna aktivacija S9.....	23
3.3.5 Priprava raztopin in gojišč	23
3.3.6 Priprava vzorcev	25
3.3.7 Izvedba Amesovega testa.....	26
3.4. Model sesalčjih celic	26
3.4.1 Celična linija HepG2.....	26
3.4.2 Gojenje celic HepG2	27
3.5. Določanje citotoksičnega delovanja XN in kombinacije MeIQx s XN na celice HepG2 s testom MTT.....	27
3.5.1 Test MTT	27
3.5.2 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem.....	28
3.5.3 Izvedba testa MTT	29
3.6 Določanje genotoksičnega delovanja XN in antigenotoksičnega delovanja XN zoper MeIQX.....	29
3.6.1 Test komet.....	29
3.6.1.1 Priprava raztopin in reagentov za test komet	31
3.6.1.2 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem	32
3.6.1.3 Priprava stekelc in nanos celične suspenzije	32
3.6.1.4 Liziranje celic	33
3.6.1.5 Odvijanje DNA	33
3.6.1.6 Elektroforeza	33
3.6.1.7 Nevtralizacija in shranjevanje stekelc	33
3.6.1.8 Barvanje jeder	33
3.6.1.9 Slikanje in analiza jeder celic	34
3.6.2 Test mikrojeder	34
3.6.2.1 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem	35
3.6.2.2 Izpostavitev celic HepG2 citohalazinu b.....	36
3.6.2.3 Priprava preparatov in nanos na stekelca	36
3.6.2.4 Barvanje in štetje mikrojeder	37
3.7. Vpliv XN in kombinacije MeIQx s XN na izražanje izbranih genov pri celicah HepG2	38
3.7.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	38
3.7.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	39

3.7.2.1 Obratno prepisovanje ali reverzna transkripcija.....	41
3.7.2.2 Izražanje genov z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času.....	41
3.7.3 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem.....	42
3.7.4 Izolacija mRNA	42
3.7.4.1 Separacija in precipitacija	42
3.7.4.2 Spiranje in raztplavljanje	42
3.7.4.3 Merjenje mRNA	43
3.7.5 Reverzna transkripcija (prepis mRNA v cDNA)	43
3.7.6 Preamplifikacija genov z nizkim izražanjem	44
4 RESULTATI.....	45
4.1 Mutageno in antimutageno delovanje XN na bakteriji <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	45
4.1.1 Amesov test.....	45
4.2 Genotoksično in antigenotoksično delovanje XN na modelu sesalčjih celic humanega hepatoma.....	46
4.2.1 Test MTT	46
4.2.2 Antigenotoksično delovanje XN proti poškodbam DNA povzročenih z MeIQx	47
4.2.2.1 Test komet	48
4.2.3 Test mikrojeder	49
4.3 Kvantitativni PCR.....	54
4.3.1 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQx na izražanje gena <i>CYP1A1</i>	54
4.3.2 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena <i>CYP1A2</i>	55
4.3.4 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena <i>UGT1A2</i>	56
4.3.4 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena <i>NAT2</i>	58
4.3.5 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena <i>SULT1A1</i>	59
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	61
5.1 Razprava	61
5.2 Sklepi	70
6 POVZETEK (SUMMARY).....	72
7 VIRI.....	74

KAZALO SLIK:

Slika 1: Glavne poti metabolizma MeIQx (Turesky, 2010)	8
Slika 2: Kemijska zgradba MeIQx	9
Slika 3: Splošna struktturna formula flavonoida	13
Slika 4: Kemijska zgradba XN	14
Slika 5: Primeri različno poškodovanih jeder celic oz. kometov	31
Slika 6: Primeri dvojedrne celice (slika A), dvojedrne celice z mikrojedrom (slika B), dvojedrne celice z nukleoplazmatskim mostičem (slika C) in dvojedrne celice z jedrnim brstom (slika D). Foto: dr. Bojana Žegura.....	38
Slika 7: Število kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA98 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam XN	45
Slika 8: Število kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA98 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene MeIQx v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN	46
Slika 9: Preživelost celic glede na kontrolno skupino (%)	47
Slika 10: Antigenotoksično delovanje XN zoper heterociklični amin MeIQx.....	48
Slika 11: Število celic z mikrojedri/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene XN	49
Slika 12: Števili mikrojeder/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene XN	49
Slika 14: Število celic z jedrnimi brsti/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene XN	50
Slika 13: Število celic z nukleoplazmatskimi mostiči/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene XN	50
Slika 15: Delitveni indeks celic (NDI), ki so bile izpostavljene XN	51
Slika 16: Število celic z mikrojedri/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN.....	51
Slika 17: Število mikrojeder/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN	52
Slika 18: Število celic z nukleoplazmatskimi mostiči/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN	52
Slika 19: Število celic z jedrnimi brsti/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN.....	53
Slika 20: Delitveni indeks celic (NDI), ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN	53
Slika 21: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>CYP1A1</i>	54
Slika 22: Vpliv kombinacije MeIQx z različnimi koncentracijami XN na izražanje gena <i>CYP1A1</i>	55
Slika 23: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>CYP1A2</i>	55
Slika 24: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>CYP1A2</i>	56
Slika 25: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>UGT1A2</i>	56
Slika 26: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>UGT1A2</i>	57
Slika 27: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>NAT2</i>	58
Slika 28: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>NAT2</i>	58
Slika 29: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>SULT1A1</i>	59
Slika 30: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena <i>SULT1A1</i>	59

KAZALO PREGLEDNIC:

Tabela 1: Uporabljene kemikalije	20
Tabela 2: Priprava raztopine za reverzno transkripcijo.....	43
Tabela 3: Priprava raztopine za preamplifikacijo genov.....	44

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIA	aminoimidazo azaareni
ALS	alkalno labilna mesta (alkali labile sites)
AO	akridin oranž
BaP	benzo[a]piren
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSB	dvoverižni prelomi (double strand breaks)
CYP	citokrom P450 oksigenaze
Cyt-b	citohalazin b
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina (ethylenediamine tetraacetic acid)
EtBr	etidijev bromid
FBS	serum govejega zarodka (foetal bovine serum)
GST	glutation S-transferaza
HCA	heterociklični amini (heterocyclic amines)
IARC	mednarodna agencija za raziskave raka
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin
I3C	indol-3-karbinol
LMP	agaroza z nizko točko tališča
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
MNi	mikrojedra (micronucleus)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NAT	N-acetiltransferaze
NDI	jedrni delitveni indeks (nuclear division index)
NPM	agaroza z normalno točko tališča

NPB	nukleoplazmatski mostiči (nucleoplasmatic bridges)
PBS	raztopina slanega fosfatnega pufra (phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimldazo[4,5-b]piridin
ppb	delci na milion (particle per bilion)
SCGE	elektroforeza posamezne celice (iz angl. single-cell gel electrophoresis)
SSB	enoverižni prelomi (single strand breaks)
SULT	sulfotransferaze
UGT	glukuronoziltransferaze
XN	ksantohumol

1 UVOD

Človek tekom svojega življenja zaužije velike količine hrane, zato je njena kakovost pomembna, saj je lahko le-ta pomemben dejavnik tveganja za nastanek različnih bolezni, tudi raka. Hrana sicer predstavlja vir hranil in mineralov za naše telo, vendar lahko v primeru, da so v njej prisotne zdravju škodljive kemikalije, povzroči razvoj bolezni, kot je rak (Ames in sod., 1995). Da ima hrana pomembno vlogo pri etiologiji raka, kažejo številne epidemiološke študije.

Pred uživanjem živil ta pogosto topotno obdelamo. S tem zagotovimo njihovo mikrobiološko varnost in oblikujemo želeno senzorično kakovost (Jägerstadt in Skog, 2005). Pri kuhanju in pripravi živil pri visokih temperaturah, tudi takih, ki se dnevno uporabljajo v gospodinjstvih, pride do nastanka različnih genotoksičnih snovi. Pri termični obdelavi živil, predvsem mišičnega izvora (meso), nastanejo heterociklični amini (HCA; iz ang. heterocyclic amines). V mesu so prisotni vsi prekurzorji, ki so potrebni za njihovo sintezo. HCA spadajo v skupino zelo močnih mutagenov in karcinogenov. Genotoksičnost najpogostejših HCA, kot so IQ (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin), MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]-kinolin) in PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin), je razmeroma dobro raziskana. Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC; iz ang. International Agency for Researching Cancer) razvršča IQ v Skupino 2A "verjetno karcinogen za ljudi", MeIQ ter še sedem drugih HCA-jev pa v Skupino 2B "možno karcinogeni za ljudi" (Cheng in sod., 2006). Genotoksične snovi povzročajo poškodbe dednega materiala, zato lahko izpostavljenost tem snovem, tudi če so koncentracije zelo nizke, privede pri ljudeh do povečane pogostnosti rakavih obolenj.

Mutageni, ki so kemijskega izvora (kamor spadajo tudi HCA), se največkrat kovalentno vežejo na DNA, celične proteine ali na druge celične komponente. Večino znanih človeških mutagenih snovi so nukleofilno ali kemijsko inertne molekule (amino-azo barvila, policikični aromatski amini, aromatski in heterociklični amini), ki niso sposobni neposrednih interakcij s celičnimi komponentami. Za izražanje teh lastnosti potrebujejo metabolno aktivacijo. Šele po encimsko katalizirani transformaciji pridobijo mutageno delovanje. Pri tej biotransformaciji mutagenih in karcinogenih snovi lahko nastajajo številni vmesni visoko reaktivni elektrofilni produkti, ki se lahko kovalentno vežejo na proteine, DNA in druge makromolekule v celici, s čimer povzročijo poškodbe celic, kar lahko v določenih primerih vodi tudi do nastanka rakavih obolenj (Luch, 2005).

Določeni encimi lahko katalizirajo inaktivacijo ene vrste molekul, hkrati pa lahko katalizirajo tudi nastanek toksičnih metabolitov nekaterih drugih molekul. Posledica takšnega delovanja encimov, vključno z vsemi njihovimi fenotipskimi različicami, je lahko nastanek raka ali preprečitev njegovega nastanka. Zato so encimi, ki so udeleženi v metabolno aktivacijo (tudi v popravljalne mehanizme poškodovane DNA), pomemben dejavnik, ki vpliva na obseg DNA poškodb in s tem na tveganje za nastanek raka pri posamezniku. Ob izpostavljenosti HCA je treba upoštevati tudi dejstvo, da smo ljudje izpostavljeni mešanicam različnih snovi, v katerih lahko prihaja do interakcij (aditivnih, sinergističnih ali antagonističnih učinkov) med

posameznimi sestavinami (Luch, 2005). Uživanje kontaminirane vode, ki vsebuje npr. pesticide, težke kovine, mikotoksine in druge primesi, s hkratnim uživanjem hrane, v kateri so prisotni prehranski mutageni (HCA, PAH (policiklični aromatski amini, iz ang. polycyclic aromatic hydrocarbon)) lahko povzroči večji obseg DNA poškodb. Te snovi se zaradi načina pridelave hrane in njene toplotne obdelave pojavljajo v vsakdanji prehrani, s čimer se jim ni moč izogniti. S tem prihaja do vse večje zaskrbljenosti o vplivu teh snovi na človekovo zdravje. Da bi zmanjšali raven DNA poškodb, ali vsaj omilili njihove posledice, ki nastanejo zaradi uživanja take hrane, se je razvila težnja po odkrivanju in razvoju snovi s potencialno kemopreventivno in terapevtsko vlogo. Te snovi so lahko naravne (pogosto rastlinskega izvora) ali sintetične. Nekatere izmed naravnih snovi uporablja človek v prehrani (čaji, rdeče vino, piva, kava idr.) že stoletja, ne da bi se sploh zavedal njihovega ugodnega učinka. V teh prehrambenih izdelkih, ki so v glavnem rastlinskega izvora, so prisotne tudi snovi, ki kažejo antitumorske lastnosti. Rastline jih v glavnem sintetizirajo zaradi zaščite pred objedanjem, za privabljanje opaševalcev ipd. Spadajo v skupino sekundarnih metabolitov, saj se razlikujejo od znanih vmesnih in končnih produktov primarnega metabolizma in prav ti so največkrat odgovorni za farmakološke učinke rastlin. Hkrati so to tudi glavne spojine, ki dajejo rastlinam vonj, okus in barvo.

Še v začetku 20. stoletja je bilo 80 % vseh zdravil rastlinskega izvora, kar se je v naslednjih desetletjih zaradi hitrega razvoja sintetičnih zdravil močno spremenilo. Kljub temu so znanstveniki našli številne ideje za mnoge sintetične droge prav v rastlinskih spojinah. Ker poznamo le majhen delež naravnih snovi, okrog 10 %, želijo znanstveniki v zadnjem času kemično analizirati čim več rastlin, tudi take, ki so bile, ali so še v uporabi tradicionalne medicine (Dermastia, 2006). Ena izmed spojin, ki v zadnjem času vzbuja pozornost znanstvenikov, je ksantohumol (XN; iz ang. xanthohumol). Je sekundarni metabolit hmelja, ki se v majhnih količinah nahaja tudi v pivu, katero predstavlja najpomembnejši vir XN za človeka. XN ima širok spekter delovanja in ga med drugim označujejo tudi kot možno antikarcinogeno učinkovino (Gerhäuser in sod., 2002; Stevens in Page, 2004; Miranda in sod., 1999; Plazar in sod., 2007).

1.1 Namen dela

V nalogi smo želeli razjasniti mehanizme zaščitnega delovanja ksantohumola (XN), preniliranega flavonoida, ki je prisoten v hmelju in pivu, zoper genotoksično delovanje prehranskega karcinogena, heterocikličnega amina MeIQx.

Namen naloge je bil ugotoviti, ali:

- ima XN antimutagen učinek zoper mutagenu delovanje MeIQx na bakteriji *Salmonella typhimurium* sev TA98;
- ima XN antigenotoksični učinek zoper poškodbe DNA, ki jih povzroča MeIQx na celicah HepG2;

- XN vpliva na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v metabolno aktivacijo/detoksifikacijo MeIQx.

1.2 Hipoteza

Pričakujemo, da bo XN deloval antimutageno in antigenotoksično, ter da bo vplival na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v metabolno aktivacijo heterocikličnih aminov (MeIQx).

2 PREGLED OBJAV

2.1 Toplotna obdelava mesa in pojav heterocikličnih aromatskih spojin

Med toplotno obdelavo mesa pride do konformacijske spremembe mišičnih proteinov, spremenjene encimske aktivnosti, toplotne in hidrolitske cepitve peptidnih vezi, toplotne razgradnje in derivatizacije prostih aminokislin, oksidacije, tvorbe novih vezi kot tudi senzorično pomembnih spojin. Te spremembe vodijo do spremenjene tekture, barve, arome in drugih lastnosti toplotno obdelanega mesa. Na njih vpliva temperatura in čas toplotne obdelave, pH vrednost mesa, oksidacija spojin, antioksidanti, radikali in druge reaktivne spojine (Palka, 2004).

Med toplotno obdelavo pride do denaturacije in spremembe v konformaciji proteinov že pri temperaturah med 36 °C in 60 °C. Proste aminokisline so toplotno stabilnejše, zato je manjša verjetnost za njihovo razgradnjo. Vendar lahko v določenih pogojih pride tudi do njihove pirolize. Do tega pride predvsem pri peki na žaru, saj je takrat zaradi lokalne dehidracije mesa na površini omogočen dvig temperature nad 100 °C, zaradi česar lahko poteče karboksilacija in deaminacija (Pegg in Shahidi, 2004). Toplotna obdelava inducira Maillardovo reakcijo. Ta je skupek neencimskih kemijskih reakcij in poteče med vodotopnimi spojinami, ki vsebujejo proste amino (npr. aminokisline, amini, peptidi) in karbonilne skupine (npr. ketoni, aldehydi, reducirajoči sladkorji itd.). Do reakcije pride že pri temperaturah nad 80 °C. To je tudi temperatura, pri kateri največkrat pripravljamo meso. Produkti teh reakcij so barvne spojine, ki oblikujejo rjavo barvo (melanoidini) pečene površine in hlapne spojine, ki sooblikujejo aromo pečenega mesa (povzeto po Mottram, 1998). Na sestavo produktov Maillardove reakcije in njihovo količino vplivajo temperatura in čas toplotne obdelave, vodna aktivnost, vsebnost vode, vrednost pH in vsebnost prekurzorjev v hrani. Pri višjih temperaturah toplotne obdelave nastane večja količina barvnih pigmentov, melanoidov. Produkti Maillardove reakcije se tvorijo v večjem obsegu tudi na površini toplotno obdelanega mesa, kjer je zaradi toplotne dehidracije manjša vsebnost vode (Shahidi in sod., 2004). Lahko pa se tvorijo, čeprav v manjšem obsegu, tudi v vodnih raztopinah (Pegg in Shahidi, 2004). Količina izgubljene vode zaradi evaporacije in izceje je odvisna od načina priprave, metod segrevanja in končne središčne temperature mesa. Surovo meso vsebuje 69–75 % vode, medtem ko toplotno obdelano meso zaradi evaporacije in izceje le 60–65 %. Meso, ki ima višje pH vrednosti, izgubi med toplotno obdelavo manj vode (Palka, 2004) kot meso z nižjim pH (Rosenvold in sod., 2004). V Maillardovi reakciji se lahko med reducirajočimi sladkorji in prostimi aminokisinami tvorijo tudi radikali (npr. pirazin kation radikali) (Kikugawa in sod., 1999).

Med toplotno obdelavo mesa nastanejo različne snovi, ki kažejo mutageno aktivnost, med katerimi so tudi heterociklični amini.

2.2 Heterociklični amini (HCA)

Japonski znanstveniki so že v začetku 70-ih let prejšnjega stoletja identificirali na površini pečene govedine in rib snovi s potencialno škodljivo aktivnostjo, katero so dokazali v testih za testiranje mutagenosti na bakteriji *Salmonella typhimurium* (Sugimura in sod., 1977). Te snovi z mutageno aktivnostjo v hrani so bile kasneje izolirane in okarakterizirane kot heterociklični amini (HCA). To so policiklične aromatske molekule (Cheng in sod., 2006) in bioprodukti, ki nastanejo pri termični obdelavi hrane. Raziskave so pokazale, da nastanejo v glavnem v mišični hrani (meso in ribe), ki vsebuje vse potrebne prekurzorje: kreatin(in), aminokisline in sladkorje (Jagerstädt in sod., 1998; Felton in sod., 2000; Busquets in sod., 2004). Do danes so iz različnih vzorcev hrane izolirali več kot 25 HCA (Toribio in sod., 2002). Poleg hrane mišičnega izvora so prisotni še v tobačnem dimu, pivu, vinu in izpušnih plinih (Turesky, 2005; Manabe in sod., 1991a, 1991b). Ker nastajajo pri topotni pripravi hrane, kateri smo ljudje zaradi načina prehranjevanja vsakodnevno izpostavljeni, se je zanimanje za te snovi povečalo, čeprav je njihova količina v hrani na nivoju ppb (iz ang. particle per billion) (Pais in Knize, 2000). Njihova vsebnost je odvisna od vrste mesa in od načina topotne obdelave oziroma priprave mesa in se lahko giblje v območju od 0.01 do nekaj 100 ng HCA/g kuhanega oz. pečenega mesa. Pri visokih temperaturah in daljšem obdelovanju z vročino nastanejo višje količine ter tudi večje število različnih vrst HCA (Abdulkarim in sod., 1998; Felton in sod., 2000; Lan in sod., 2004) kot pri nižjih temperaturah (Knize in sod., 1994; Turesky in sod., 2005, Sinha in sod. 1998a). Nasprotno pa lahko pri določenih metodah priprave hrane (npr. kuhanje) nastanejo manjše količine HCA, kar je najverjetneje zaradi manj učinkovitega prenosa toplotne. S tem je upočasnjena prehod prekurzorjev HCA na površino mesa, kjer pride do nastanka le-teh (Sinha in sod., 1998a, b; Sinha in sod., 1995). Tako je tveganje za nastanek raka zaradi HCA odvisno od količine in vrste hrane, ki bazira na mišicah, pogostosti uživanja, pogojev obdelave in prisotnosti kemijskih modulatorjev (npr. antioksidantov) v prehrani (Bogen in Keating, 2001).

Prebivalci zahodnih držav pogosto uživajo topotno dobro obdelano hrano, v kateri je zaradi načina priprave (visoke temperature, dolga obdelava s topoto, peka na žaru) večja količina nastalih HCA (Felton in sod., 2002). Ta način prehranjevanja povezujejo s povečano pogostnostjo raka na debelem črevesu in prostati pri moških ter pri ženskah na dojkah (Keating in Bogen, 2004). Tudi v nekaterih drugih državah (Japonska), ki so sprejele prehranske navade zahodne populacije, prav tako opažajo povečano pogostnost pojavljanja raka na omenjenih organih (Sigimura in sod., 2004). O teh pozitivnih povezavah med prehrano in stopnjo tveganja za rakom poročajo številne epidemiološke študije (Sinha in sod., 1999; 2001; 2000; Anderson in sod., 2005).

2.2.1 Nastanek HCA

Nastanek HCA je odvisen od fizikalnih dejavnikov, h katerim prištevamo temperaturo in čas toplotne obdelave, vir toplotne, vrsto in količino živila, vrednost pH medija, snovni in toplotni prenos ter od kemijskih dejavnikov, kot so vrsta, vsebnost in razmerje prekurzorjev, prisotnost/odsotnost inhibitorjev in stimulatorjev, količina maščob in vode (Oz in sod., 2006; Skog in sod., 2003; Felton in sod., 2000). Kritičen dejavnik nastanka HCA v toplotno obdelani hrani, kot so meso in ribe, je temperatura pri kateri pripravljamo hrano (Miller in sod., 1985). Pri temperaturi nad 300 °C se tvorijo pirolizati proteinov, tako imenovani mutageni tipa 2-amino-piridin (tudi amino-karbolini) (Wakabayashi in sod., 1997; Sugimura, 1986). Pri nižji temperaturi, pod 300 °C, pa nastanejo mutageni tipa 2-amino-imidazol (ali aminoimidazo-azaareni (AIA)) (Furihata in sod., 1986; Jagerstad in sod. 1998), za katere niso potrebne tako visoke temperature, čeprav se pri povišani temperaturi tvorijo hitreje in v večjih količinah (Cheng in sod., 2006).

Glavni prekurzorji amino-karboliniov so aminokisline ali peptidi. Ker njihov nastanek ni odvisen od kreat(in)ina kot prekurzorja, lahko nastanejo tako v hrani živalskega kot tudi v hrani rastlinskega izvora (Jägerstad in sod., 1998). Sestavljeni so iz 5-členskega obroča, ki leži med dvema 6-členskima aromatskima obročema, od katerih je lahko eden ali oba piridin (Cheng in sod., 2006). Nastanejo preko reakcije prostih radikalov, pri čemer se tvorijo številni reaktivni fragmenti, ki lahko kondenzirajo v nove strukture (Skog in sod., 2000). Amino-karbolinov je v normalno kuhanji hrani zaradi nižjih temperatur priprave relativno malo, navadno pod ng/g hrane (Turesky, 2010).

Druga skupina HCA so AIA, ki se tvorijo pri nižjih temperaturah (pod 300 °C) in prav te se največkrat uporablja pri toplotni obdelavi mesa (Turesky, 2010), vendar se pri višjih temperaturah tvorijo hitreje in v večjih količinah. Za tvorbo AIA obstajata dve hipotezi. Prva pravi, da piridin ali pirazin najprej reagira z aldehydom in šele nato s kreatinom, druga pa, da kreatin najprej reagira z aldehydom (aldolna kondenzacija). Pri tem se tvori intermediat kreatinin-aldehyd, ki skupaj s piridinom in pirazinom tvori imidazo-kino(ksa)lin spojine. Za IQ in IQx-tip HCA ter njihove derivate (metilirane oblike) se predvideva, da bi naj nastali iz kreat(in)ina, sladkorjev, prostih aminokislín in nekaterih dipeptidov, med Maillardovo reakcijo in Streckerjevo degradacijo tekom segrevanja (Felton in sod., 2000; Jägerstad in sod., 1983). Pri nastanku te skupine HCA ima pomembno vlogo Maillardova reakcija (Toribio in sod., 2000) in kreatinin (Weisburger in sod., 1994). Kreatinin je nujen za tvorbo imidazo strukture, saj se HCA tipa IQ in IQ-x brez njega ne tvorijo (Murkovic, 2004). Kreatin bi naj predstavljal N-metil-2-aminoimidazolni del molekule, medtem ko bi naj preostali del molekule IQ in IQx izhajal iz Strecker degradacijskih produktov (piridini ali pirazini), ki se tvorijo v Maillardovi reakciji med heksozami in aminokislínami (Jägerstad in sod., 1991; Milic in sod., 1993). IQ- in IQ-x strukturni obroč HCA izhaja iz aldolne kondenzacije, preko katere se povežeta dve molekuli aldehyda ali Schiffovi bazi (Turesky, 2010). Pri nastanku te skupine HCA se predvideva, da bi naj bili prav tako udeleženi intermediati prostih radikalov

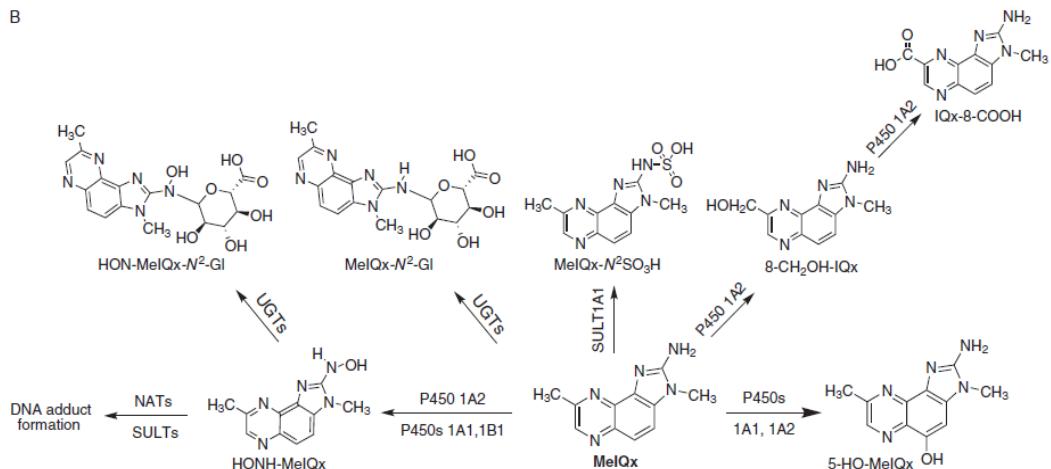
(Milic in sod., 1993; Pearson in sod., 1992; Kato in sod., 1996). AIA so odgovorni za večji del mutagene aktivnosti v termično obdelani hrani (Felton in sod., 2001). Za njihovo mutagenost pa je odgovorna predvsem imido skupina z 2-amino skupino (Skog in sod., 1998).

2.2.2 Bioaktivacija HCA in tvorba DNA aduktov

HCA spadajo v skupino indirektnih mutagenov, ki potrebujejo za izražanje mutagenih lastnosti metabolno aktivacijo (Yamazoe in sod., 1988; Turesky in sod., 1990). Osrednja pot metabolne aktivacije, kjer so udeleženi encimi I. in II. faze metabolne transformacije: citokromi P450 (CYP), sulfotransferaze (SULT), UDP-glukuronoziltransferaze (UGT), N-acetiltransferaze (NAT) in glutation S-transferaze (GST) poteka v jetrih (Turesky, 2010).

Kot večina kemijskih mutagenov/karcinogenov, tudi HCA tvorijo po metabolni aktivaciji DNA adukte (Cheng in sod., 2006). Z oksidacijo zunajciklične amino skupine nastanejo genotoksični N-hidroksi HCA metaboliti. To reakcijo katalizirajo encimi družine citokrom P450 (Turesky in sod., 1998; Crofts in sod., 1998; Hammons in sod., 1997), v okviru katerih sta najpomembnejša jetrni P450 1A2 in izvenjetrni P450 1A1. Poleg teh dveh encimov so metaboliziranja HCA sposobni še CYP1B1, CYP3A4, CYP2C9 in CYP2A3 (McManus in sod., 1989; Yamazaki in sod., 1993; Edwards in sod., 1994; Crofts in sod., 1997; Hellmold in sod., 1998), vendar pa nobeden izmed teh izomer P450 ni tako aktiven kot CYP1A2 (Gooderham in sod., 2001; Turesky in sod., 1991; Shimadu in sod., 1989; McManus in sod., 1990; Rich in sod., 1992, Zhao in sod., 1992). N-hidroksi HCA metaboliti, ki nastanejo zaradi encimske katalize, lahko direktno reagirajo z DNA, s čimer tvorijo DNA adukte. Lahko pa se naprej transformirajo z encimi II. faze (npr. NAT, SULT), ki se izražajo v jetrih ali izvenjetrnih tkivih, pri čemer nastanejo reaktivni N-hidroksi estri (Turesky in Vouros, 2004; Schut in sod., 1999). Iz teh estrov lahko nadalje nastanejo reaktivni nitrenijevi ioni, ki so prav tako sposobni vezave z DNA (Turesky, 2010). Na število mutacij, ki nastanejo zaradi delovanja HCA, vplivajo različni eksogeni in endogeni metabolni aktivacijski sistemi, različne sposobnosti DNA popravljalnih mehanizmov, različna tarčna zaporedja baznih parov in vpliv sosednjih baz na HCA-DNA aduktih. Zaradi raznolikosti teh dejavnikov prihaja tudi do razlik med biološkimi vplivi HCA v različnih *in vitro* testnih sistemih (Turesky, 2007).

B



Slika 1: Glavne poti metabolizma MeIQx (Turesky, 2010)

2.2.3 Biološki učinki HCA-DNA aduktov

Pomembne posledice biološke aktivnosti HCA so adukti na purinih, ki povzročajo konformacijske spremembe v DNA. Med sintezo DNA čez poškodovane dele pride do mutacij premika bralnega okvirja ali zamenjave baznih parov (Delaney in Essigmann, 2008; Broyde in sod., 2008; Hoffmann in sod., 1997). Adukt lahko poleg mutacije zavre tudi DNA polimerazno aktivnost. Ta biološki efekt je močno odvisen od oligotidnega zaporedja, ki se nahaja blizu adukta (Delany in Essigmannd, 2008; Broyde in sod., 2008; Hoffmann in sod., 1997), kot tudi od encima polimeraze in lastnosti gostiteljske celice (Tan in sod., 2002).

Gvanin je pri sesalčjih celicah glavno tarčno mesto, na katerem pride do tvorbe HCA-DNA aduktov, zato so najpogosteje mutacije, ki jih povzročijo HCA, zamenjava baznih parov na gvaninih (Turesky in Vouros, 2004; Schut in Snyderwine, 1999).

2.2.4 Mutagenost in karcinogenost HCA

Po bioaktivaciji postanejo HCA zelo mutagene spojine, kar so dokazali s številnimi *in vitro* kot tudi *in vivo* testi (Torbio in sod., 2000). V Amesovem testu, s *Salmonella typhimurium* sev TA98, kažejo vsi AIA, z izjemo PhIP, visoko mutagenost (Wakabayashi in Sugimura, 1998). Nekateri predstavniki HCA (MeIQx, IQ in 8-MeIQx) spadajo med najmočnejše bakterijske mutagene (Sugimura in sod., 2004). Pogosto se zgodi, da tisti HCA, ki kažejo mutagenost v bakterijskih celicah, kažejo tudi mutagenosti v živalskih in človeških celicah, vendar se lahko pri tem pojavi razlika v njihovi stopnji mutagenosti (Nagao, 2000).

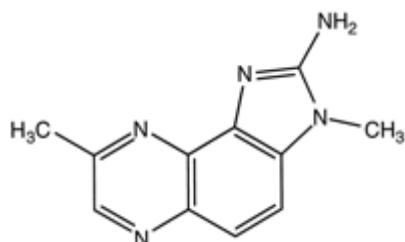
Številni HCA, ki so jih testirali *in vivo* z dodajanjem v prehrano miši in podgan, kažejo karcinogene lastnosti (Sugimura, 1997). Ob daljši izpostavitvi povzročijo pri miših in

podganah nastanek tumorjev v različnih organih, med drugim v ustni votlini, jetrih, želodcu, pljučih, mehurju, debelem črevesu, prostatni in mlečnih žlezah (Sugimura in sod., 2004). IQ je močan jetrni karcinogen pri človeku podobnih opicah. Do nastanka tumorjev pri teh testnih živalih običajno pride že po nekajletni izpostavljenosti (Sugimura in sod., 2004).

V bakterijskih testih mutagenosti lahko pride med različnimi HCA tudi do 1000-kratne razlike v genotoksičnih potencialih. V sesalčjih tkivnih kulturah so zaradi šibkejše biološke aktivacije razlike manjše. Prihaja tudi do razlik v vplivu posameznih HCA na mutacije pri človeku in pri testnih živalih. Na izražanje mutagenosti in posledično na razvoj raka pri ljudeh vpliva tako metabolična sposobnost tvorbe aktivnih karcinogenih spojin kot tudi detoksifikacija mutagenih spojin (Nagao, 2000).

2.2.5 MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin)

Je eden izmed 25 HCA, ki so bili izolirani iz toplotno obdelanih proteinskih produktov, kot so rdeče meso, ribe in perutnina. Ker nastane med njihovo oplotno obdelavo, je neizogibno prisoten v človeški prehrani. Količina MeIQx v toplotno obdelanem mesu se giblje od 1 do 45 ppb in je odvisna tako od vrste mesa, metod priprave, kot tudi od načina kuhanja (Thiébaud in sod., 1995; Layton in sod., 1995). Človek povprečno zaužije 2.6 ng MeIQx/kg telesne mase/dan (Thiébaud in sod., 1995; Layton in sod., 1995), kar je bistveno manj od doz, ki povzročajo pri testnih živalih nastanek tumorjev (Mauthe in sod., 1999).



Slika 2: Kemijska zgradba MeIQx

Metabolizem MeIQx je pri glodalcih in nečloveških primatih relativno dobro proučen (Turesky in sod., 1994). Bioaktivira se z oksidacijo zunajciklične-amino skupine s citokrom P450 in konjugacijo N2-hidroksiamino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalina (NHOH-MeIQx) do acetata ali sulfata. Intermediati, tudi NHOH-MeIQx, ki nastanejo ob bioaktivaciji, so sposobni vezave na DNA (Mauthe in sod., 1999). V *in vitro* študijah, kjer so uporabili mikrosomalno frakcijo izolirano iz jeter podgan, miši in zajcev, so pokazali, da se pri metabolizmu MeIQx kot tudi PhIP, tvorita vsaj dva oksidativna metabolita, obročast hidroksiliran produkt (iz ang. ring-hydroxylated product) in N-hidroksi derivati (Gooderham in sod., 1987; Turesky in sod., 1988, 1991; Sjodin in sod., 1989; Turteltaub in sod., 1989; Watkins in sod., 1991a,b). Z Amesovim testom so pokazali, da je N-hidroksi metabolit

MeIQx, za razliko od obročastega hidroksiliranega produkta, direktni mutagen (Rich in sod., 1992b).

Pri ljudeh je nekoliko bolj zapleteno, saj sta biodostopnost in metabolizem MeIQx visoka (Stillwell in sod., 1994; Turesky in sod., 1994). Bioaktivacija MeIQx poteka v jetrih in vključuje N-oksidacijo preko poti podobne kot pri glodalcih in nehumanih primatih (Rich in sod., 1992b). Nadaljnji metabolizem N-oksidiranih heterocikličnih aminov poteka v tkivnem citosolu in vodi preko konjugacije do acetata in sulfata (Rich in sod., 1992b; Turesky in sod., 1991). Nekateri podatki kažejo, da je v *in vitro* pogojih MeIQx bioaktiviran do DNA-reaktivnih intermedijatov preko N-hidroksilacije, N:O acetilacije in N:O-sulfacije. *In vitro* študije so pokazale, da se oksidacija MeIQx v človeških jetrih zgodi skoraj izključno preko N-hidroksilacije in da je le-ta katalizirana izključno s CYP1A2 (Rich in sod., 1992a; Zhao in sod., 1992). Z uporabo specifičnih in občutljivih inhibitorjev humanega CYP1A2 je raziskovalcem uspelo inhibirati nastanek N-hidroksi MeIQx za 90 % (Gooderham in sod., 2001). Zaradi tega je karcinogenost teh snovi odvisna tako od ekspresije, specifičnosti, kot tudi od aktivnosti encimov, odgovornih za njihovo aktivacijo. Te lastnosti ortolognih oblik encimov P450 so vrstno odvisne (Boobis in sod., 1994), zato lahko ljudje bioaktivirajo HCA v večjem obsegu kot živalski modeli (Boobie in sod., 1995). Tako se lahko zgodi, da ti modeli niso primerljivi s človekom (Turteltaub in sod., 1997).

Mehanizem delovanja MeIQx na organizem še ni povsem razjasnjen (Kang in sod., 2007). Med metabolizmom nastajajo elektrofilni vmesni produkti, ki se lahko kovalentno vežejo na C8 deoksigvanina v DNA in na ta način tvorijo DNA adukte (Gauvin in sod., 2001). Posledica nastanka aduktov je lahko spremembra konformacije DNA, kar vodi v nastanek mutacij. To pa je lahko tudi začetek karcinogenega procesa (Gauvin in sod., 2001). Kovalentno vezavo MeIQx na DNA so dokazali v številnih raziskavah in ga zato tudi opredelili kot genotoksičnega (Yamashita in sod., 1990; Ochiai in sod., 1993; Snyderwine in sod., 1993).

MeIQx spada v skupino snovi z največjim potencialom mutagenosti, testiranim z Amesovim bakterijskim testom (Sugimura, 1988; Sugimura in sod., 2004). Je tudi dokazano genotoksičen in karcinogen za glodalce ob izpostavljenosti visokim koncentracijam (Ohgaki in sod., 1991; Turteltaub in sod., 1997). Pri kronični izpostavljenosti s hrano, koncentracije 200 do 600 ppm, povzročijo pri podganah in miših karcinom jeter. Pri podganah so opazili tumorje še v pljučih, obušesnih žlezah (iz ang. zymbal glands, ki so edinstvene pri podganah in izhajajo iz avditorne žleze) in klitoralnih žlezah, pri miših pa limfome in levkemijo (Ohgaki in sod., 1987; Kato in sod., 1988; Kushida in sod., 1994). Pri podganah so dokazali, da je v primeru zaužitja njegova absorbcija odvisna od doze (Frantz in sod., 1995) in da je najvišja izmerjena koncentracija MeIQx v jetrih. Relativno visoke koncentracije so izmerili še v ledvicah, črevesnem traktu in trebušni slinavki, medtem ko je bila v krvi izmerjena najnižja koncentracija (Kenneth in sod., 1997). Izračunana TD₅₀ (doza, ki povzroči nastanek tumorjev pri 50 % živali) je v območju 0.7–33 mg/kg/dan in je odvisna od vrste in tipa tumorja (Ohgaki

in sod., 1987; Kato in sod., 1988; Gold in sod., 1994). Ekstrapolirani podatki iz raziskav, narejenih na glodalcih, kažejo, da je pri ljudeh tveganje za nastanek raka zaradi izpostavitve MeIQx preko hrane 2.9×10^5 (približno 3 rakavi bolniki na 100.000 ljudi) (Gaylor in Kadlubar, 1991; Layton in sod., 1995).

Za razliko od raziskav, ki so bile narejene na glodalcih, je človek zaradi dnevnega zaužitja toplotno obdelane hrane izpostavljen relativno nizkim koncentracijam MeIQx, vendar je zaradi vsakodnevnega vnosa izpostavitev kronična. Pri ljudeh je glavno tarčno mesto nastanka tumorjev debelo črevo, kjer MeIQx v primeru nizkih koncentracij tvori DNA adukte, medtem ko je primarno mesto nastanka tumorjev pri glodalcih v jetrih (Turteltaub in sod., 1997; Mauthe in sod., 1999). MeIQx ima na človeško debelo črevo tudi do 10-krat večji učinek kot na debelo črevo glodalcev. Do tega lahko pride zaradi večje kapacitete za njegovo metabolno aktivacijo ali zaradi zmanjšanih sposobnosti popravljanja DNA lezij v človeških tkivih (Turteltaub in sod., 1997).

Na podlagi podatkov o učinkih visokih koncentracij MeIQx na živali in podatkov iz človeške epidemiologije se predpostavlja, da je pri ljudeh, ki raje uživajo dobro termično obdelano meso, povečana pogostnost za nastanek raka debelega črevesa. Vendar pa obstaja relativno malo podatkov o učinkih pri nizkih koncentracijah, tako za ljudi kot za živali (povzeto po Turteltaub in sod., 1997).

2.3 Zaščitni mehanizmi pred HCA

Ugotovitev, da so HCA prisotni v toplotno obdelani hrani in so potencialno mutageni ter verjetni karcinogeni, je povečala zanimanje za te snovi. Hkrati s tem je prišlo tudi do razvoja strategij za zmanjšanje njihovih učinkov na človeško telo. Najučinkovitejši in najlažje izvedljivi strategiji za zaščito pred temi snovmi sta znižanje količine zaužite hrane, ki vsebuje večje koncentracije teh snovi, za populacijo, ki ima možnost izbire raznolike prehrane, ter tudi odstranjevanje zapečenih delov mesa in rib, ki so nastali pri visokih temperaturah (Dashwood in sod., 2002). Ker nastajajo HCA pri termični pripravi hrane, so se določeni znanstveniki začeli ukvarjati z zaviranjem njihovega nastanka v prehrani (Cheng in sod., 2006). Različni dodatki med ali pred samou toplotno obdelavo hrane lahko zmanjšajo količino nastalih HCA. Ene izmed takih snovi so antioksidanti (catehini, kavna kislina, flavonoidi ...), nekatere žveplo vsebujoče raztopine (npr. dipropil disulfid, dialil disulfid, dialil sulfid), nekateri produkti Maillardove reakcije, olivno olje (deluje kot lovilec radikalov) idr. Na količino nastalih HCA vplivajo tudi načini in pogoji toplotne obdelave. Tako lahko uporaba tistih pogojev, katerih posledica je nastanek manjših količin HCA v hrani, vpliva na nižje količine nastalih HCA (Dashwood in sod., 2002).

Drugi znanstveniki pa so se začeli ukvarjati z zmanjševanjem ali celo odpravo mutagene/karcinogene aktivnosti potem, ko te snovi vstopijo v biološki sistem. V ta namen so

testirali in identificirali več snovi, ki se delijo v skupine glede na njihov mehanizem interakcije z mutagenimi snovmi (Dashwood, 2002). Te snovi lahko delujejo na več načinov:

- zavirajo delovanje citokrom P450, kar vodi do zaviranja aktivacije HCA (polifenoli, klorofil, konjugirana linolna kislina),
- povečajo aktivnost CYP1A1 (glede na CYP1A2), s čimer povečajo stopnjo detoksifikacije (čaj, kafestol),
- inducirajo encime detoksifikacije z uporabo modulatorjev faze II,
- preprečijo nastanek aktivnih oblik HCA v tkivih in tvorijo komplekse s HCA metaboliti,
- tvorijo komplekse z arilnitrenijevim ionom (reaktivne spojine – polifenoli),
- zmanjšajo število mutacij preko vpliva na podvojevanje DNA ali popravljalne procese DNA (bioantimutageni; kafein, vanilin, kumarin),
- spremenijo pot signaliziranja, kar vodi v apoptozo (celični supresorji; polifenoli, vitamini, karotenoidi),
- tvorijo komplekse s prokarcinogeni ali aktivnimi spojinami HCA (antikarcinogene snovi; prehranske vlaknine, klorofilin).

V skupino zaščitnih snovi spada tudi ksantohumol (XN, iz ang. xanthohumol), ki je sekundarni metabolit hmelja (*Humulus lupulus L.*) in ima širok spekter delovanja.

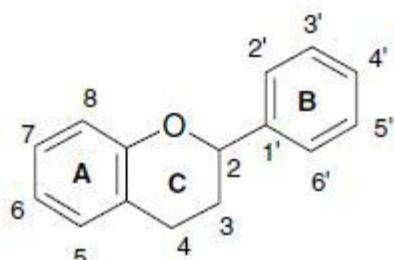
2.4 Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus L.*) je industrijska rastlina, ki se v veliki meri goji za potrebe pivovarstva in je nepogrešljiv dodatek pivini. Daje ji grenak okus, specifično aroma in povzroči čiščenje pivine z obarjanjem beljakovin. Gospodarsko pomembni sekundarni metaboliti hmelja so hmeljne smole, eterična olja in polifenolne spojine (Narziß, 2004). Najpomembnejši med njimi so hmeljne smole, ki jih sestavlja več sto spojin in jih delimo na mehke smole (topne v nižjih ogljikovodikih), med katerimi so najpomembnejše alfa- in beta-kisline, in na trde smole (netopne v nižjih ogljikovodikih) (Palamand in Aldenhoff, 1973). Trde smole predstavljajo polarno frakcijo hmeljnih smol, ki ni topna v nižjih ogljikovodikih, ampak v hladnem metanolu in dietiletru. Sem spadajo ksantohumol, dezmetilksantohumol, ksantohumoli B, C, D, E in drugi halkoni (Stevens in Page, 2004) ter oksidacijski produkti alfa- in beta-kislin.

2.4.1 Flavonoidi

So skupina sekundarnih metabolitov, ki jih sintetizirajo skoraj vse rastline in jih kopičijo v semenih, lupinah, lubju ter cvetovih. Do danes je identificiranih več kot 4.000 različnih flavonoidov, kar je več kot polovica vseh v naravi prisotnih fenolnih spojin (Middleton in sod., 2000; Harborne in sod., 1999), s čimer so flavonoidi največja skupna rastlinskih fenolov

(Harborne in sod., 1999). Flavonoidi so spojine z majhno molekulsko maso, zgrajeni iz 15-ih ogljikovih atomov, urejenih v $C_6C_3C_6$ strukturo (Bohm, 1998; Merken in Beecher, 2000; Abram in Simčič, 1997). Strukturno so sestavljeni iz dveh benzenovih obročev (obroča A in B), ki sta med sabo povezana z mostom iz treh ogljikovih atomov ter iz pirena ali pirenskega obroča, ki je heterociklični (C obroč). Taka struktura je rezultat dveh ločenih metabolnih poti, šikiminske (Taiz in Zeiger, 2006) in poti preko acetil CoA (Abram in Simčič, 1997).



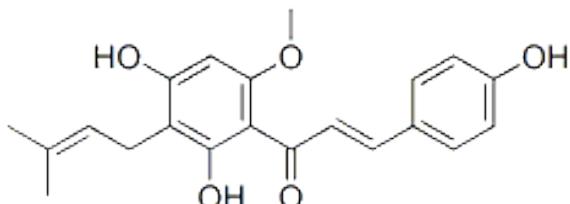
Slika 3: Splošna strukturna formula flavonoida

Flavonoidi imajo širok spekter biološkega in farmakološkega delovanja, kot so na primer antialergeno, antimutageno, antioksidantno in protirakavo delovanje. Imajo pa tudi citostatične, antigenotoksične, antibakterijske, antivirusne, protivnetne, protiangiogene, protibolečinske, apoptotske, hepatозаščitne, estrogene in antiestrogene značilnosti (Hodek in sod., 2002; Ren in sod., 2003). Zaradi teh značilnosti imajo ugoden vpliv na zdravje ljudi in zato bi jih lahko označili kot možne kemopreventivne in terapevtske dejavnike proti rakavim obolenjem (Ren in sod., 2003; Hodek in sod., 2002). Kljub velikemu uporabnemu potencialu pa so absorbcija, metabolizem in izločanje pri ljudeh še slabo raziskani. S pomočjo mikroorganizmov lahko v prebavnem traktu pride do hidrolize na sladkorje vezanih flavonoidov, s čimer se pospeši njihova absorbcija. Istočasno pa lahko ti mikroorganizmi tudi razgrajujojo flavonoide do fenolnih kislin (Hodek in sod., 2002; Hollman in Katan, 1999). V primeru, da se flavonoidi pojavijo v prebavilih v večjih količinah lahko inhibirajo metabolizem in absorpcijo določenih zdravil, nutrientov in ksenobiotikov. S tem lahko vplivajo tudi na absorpcijo določenih zdravil (Hodek in sod., 2002) in lahko v določenih primerih zvišajo biodostopnost nekaterih snovi, na primer protirakavih zdravil in imunosupresivov. S takim delovanjem bi bili zdravju koristni. V nasprotnem primeru pa lahko s pospešeno absorpcijo nekaterih zdravju škodljivih snovi vodi do nenormalno visokega nivoja teh snovi v krvi, kar posledično vodi do večjega učinka škodljivih snovi.

Flavonoide razdelimo v sedem glavnih podskupin: halkoni (ksantohumol), flavanoli (catehin), flavonoli (kvercetin), antocianini (cianidin), flavoni (benzoflavon, naftoflavon, apigenin), izoflavoni (genistein) in flavanoni (naringenin, izoksantohumol (IXN)) (Moon in sod., 2006; Middleton in sod., 2000). Med njimi so razlike v stopnji oksidacije centralnega C obroča (Rice - Evans, 2001), v številu in položaju hidroksilnih in metoksilnih skupin ter njihovih substituentov (Miranda in sod., 1999; Rice - Evans, 2001).

2.4.1.1 Ksantohumol

Ksantohumol (xantho v grščini pomeni rumen) (3'-3,3-dimetil alil-2',4',4-trihidroksi-6'-metoksihalkon) spada v skupino monomernih heterocikličnih polifenolov.



Slika 4: Kemijska zgradba XN

Odkrili so ga že pred približno sto leti (Powers in sod., 1913, cit. po Stevens in Page, 2004), vendar so šele v zadnjem desetletju začeli raziskovati njegove zdravilne učinke. Dosedanje raziskave so ga označile kot potencialno protirakovo učinkovino (Gerhäuser in sod., 2002; Stevens in Page 2004; Miranda in sod., 1999; Plazar in sod., 2007). Zaradi številnih bioloških aktivnosti je eden izmed najpomembnejših preniliranih flavonoidov, izoliranih iz ženskih cvetov hmelja (*Humulus Lupulus L.*, Cannabaceae) (Yilmazer in sod., 2001b; Stevens in Page, 2004), kjer ga skupaj z ostalimi preniliranimi flavonoidi izločajo lupulinske žleze. V njih nastaja po specifični poti biosinteze prenilflavonoidov (Stevens in Page, 2004). Ti imajo za razliko od nepreniliranih flavonoidni obroč nadomeščen s prenilnimi ali geranilnimi skupinami, s čimer se poviša lipofilnost molekule, zato imajo te spojine visoko afiniteto do bioloških membran (Botta in sod., 2005). Vendar pa je XN, kot izjema v skupini preniliranih flavonoidov, rahlo polaren in topen v etanolu (Forster in Kooberlein, 1998).

80–90 % vseh flavonoidov v hmelju predstavlja XN, kar je od 0.1 do 1 % suhe teže hmelja (Miranda in sod., 2000b; Stevens in Page, 2004). Rastlina ga najverjetneje sintentizira za obrambo pred insekti, ki se hranijo na ženskih storžih in semenih. XN spada med halkone, ki imajo odprt ogljikov obroč, fenilna obroča pa sta povezana preko strukture treh ogljikov α , β nenasičenega karbonilnega sistema (Miranda in sod., 1999). Halkoni se lahko pretvorijo v flavanone med kemijsko reakcijo, ki poteka v kislem okolju, ali z encimom halkon izomerazo (Miranda in sod., 1999).

Hmelj kot rastlina ne predstavlja pomembnega vira XN za človeka, saj ga skorajda ne uporabljamamo v prehrambene namene. Se pa storži te rastline uporabljajo v proizvodnji piva, ki predstavlja enega izmed glavnih virov XN za človeško telo (Miranda in sod., 2000a), vendar je vsebnost XN v pivu relativno majhna. Glavni vzrok za to je izomerizacija, do katere pride zaradi uporabe visokih temperatur v postopku varjenja piva. Do izomerizacije pride tudi v telesu ob zaužitju piva, in sicer zaradi delovanja solne kisline v prebavilih. Rekacija solne kisline s XN poteka na prosti hidroksilni skupini XN, zaradi česar nastane flavonon

izoksantohumol (IXN; iz ang. isoxanthohumol), ki je polarnejši in obstojnejši od XN (Stevens in Page, 2004). Posledično prevladuje v pivu flavonon IXN, za razliko od hmelja, v katerem je glavni prenilirani flavonoid XN. Poleg izomerizacije vplivajo na zmanjšano vsebnost XN v pivu tudi nepopolna ekstrakcija in adsorbcija na netopne proteine slada ter kvasovke med fermentacijo piva (Botta in sod., 2005). Biološka učinkovitost IXN je v primerjavi s XN manjša, manjše pa so tudi njegove antikarcinogene lastnosti (Stevens in sod., 1999). Zaradi majhne vsebnosti XN v pivu in zaradi stranskih učinkov alkohola, ki je prisoten v pivu, so znanstveniki z namenom, da bi povečali vsebnost XN v pivu, modificirali sam postopek varjenja piva in s Xan-tehnologijo proizvedli pivo, ki vsebuje večje količine XN (Wunderlich in sod., 2005). Polega modificiranega postopka varjenja piva znanstveniki razvijajo tudi raznovrstne postopke za pridobivanje izvlečkov hmelja z večjo vsebnostjo XN.

Zanimivo je, da so prenilflavonoidi, za razliko od drugih polifenolov v pivu, bolj lipofilni, zato bi lahko bili učinkoviti antioksidanti na lipofilnih površinah, kot so membrane in lipoproteini (Stevens in sod., 2003). Ker kaže tudi XN, ki spada v skupino prenilflavonoidov, hidrofobne lastnosti, bi ga lahko vključili v živila z veliko vsebnostjo maščob, na primer v margarino, maslo ipd.

2.4.1.1.1 Biološka dostopnost XN in vpliv XN na prenašalne proteine

Stevens in Page (2004) sta pokazala, da je pri podganah v primeru zaužitja XN njegova biološka dostopnost zelo nizka, kar je najverjetneje zaradi intenzivnega metabolizma črevesnih mikroorganizmov. Ugotovila sta, da je delež nerazgrajenega XN v urinu podgan zelo nizek. Da je biodostopnost XN pri podganah *in vivo* nizka, so pokazali tudi Avula in sod. (2004). Omejujoč dejavnik biodostopnosti je lahko črevesna prepustnost, zato sta Pang in Nikolic (2007) skušala raziskati privzem, transport in akumulacijo XN pri humani črevesni epiteljski celični liniji Caco-2. Te celice so prepustne za XN, vendar je prepustnost enosmerna, saj le-ta po vstopu v celice ostane za nekaj časa ujet v njih. Z uporabo transportnih inhibitorjev so pokazali, da obstaja za vnos XN v celice aktivni črpalni sistem. Znotraj celic se XN skoraj izključno (94 %) nahaja v citosolu, kjer je vezan na citosolne proteine z molekulsko maso večjo od 10.000 Da (kar so dokazali z diferencialnim centrifugiranjem in LC-MS). Eden izmed teh proteinov je Keap-1, na katerega se XN veže s kovalentno vezjo. Vezava poteka preko Michael-tip adicijske reakcije med Keap-1 cisteinsko sulfidrilno skupino in α - β nenasičenim ketonom (Dietz in sod., 2005). Alkilacija Keap-1 s XN je mehanizem (Dietz in sod., 2005), ki bi lahko bil odgovoren za kemopreventivno aktivnost XN (Gerhäuser in sod., 2002).

Kljub temu da je sistemska biodostopnost XN z zaužitjem relativno nizka, lahko XN doseže visoke koncentracije znotraj črevesnih epiteljskih celic, v katerih lahko pride do njegove akumulacije. S tem bi lahko bil XN učinkovit kemopreventivni agens pred črevesnim rakom,

saj večina oblik črevesnega raka izhaja prav iz črevesnih epitelijskih celic (Pang in Nikolic, 2007).

2.4.1.1.2 Presnova XN

Raziskave presnove XN v *in vitro* testih, s humanimi in podganjimi jetrnimi mikrosomi, so pokazale nastanek štirih presnovkov. Mednje sodita XN z dodatno hidroksilno skupino in dehidro-cikloksantohumol, za katera se predvideva, da nastaneta v mešanih encimskih in kemičnih poteh biotransformacije (Yilmazer in sod., 2001a). Naslednji produkt nastane s konjugacijo glukuronske kisline na hidroksilni skupini na C-4' mestu. Zadnji metabolit pa nastane s konjugacijo glukuronske kisline na kisiku na mestu C-4 (Yilmazer in sod., 2001a). Nookandeh in sod. (2004) so iz blata podgan, ki so zaužile XN s hrano, izolirali in ovrednotili 22 presnovkov XN v različnih časovnih presledkih. Velik delež, kar 89 %, je predstavljal nepresnovljeni XN. Tega so izolirali v miligramskih količinah, medtem ko presnovke XN v mikrogramskih količinah. XN in njegovi presnovki se pri podganjih samicah izločijo predvsem skozi gastrointestinalni trakt z blatom v 24 urah po prejetem odmerku (Avula in sod., 2004). V primeru intravenskega dodajanja XN pa se njegova koncentracija v plazmi zniža že po 60 minutah (Avula in sod., 2004).

2.4.1.1.3 Učinkovanje XN

Mnoge raziskave potrjujejo širok spekter delovanja XN, kot je:

- a) spremeni aktivacijo pro-karcinogenov z inhibicijo encimov citokroma P450

Encimi citokroma P450 imajo pomembno vlogo pri metabolni aktivaciji določenih genotoksičnih snovi in so vključeni v oksidacijo ter izločanje tako endogenih kot tudi eksogenih nepolarnih spojin (Henderson in sod., 2000). Flavonoidi izolirani iz hmelja, med katerimi je tudi XN, kažejo z inhibicijo citokrom P450 encimov kemopreventivne lastnosti pred rakavimi obolenji.

- b) lahko deluje kot proestrogen

Hormone, kot je 17β -estradiol, smatrajo za endogene tumorske promotorje, ki preko interakcije z estrogenskimi receptorji stimulirajo celično rast, s čimer povečajo tveganje za nastankom raka dojke in maternice (Reid in sod., 1996). Pro- in antiestrogene lastnosti XN so raziskovali na Ishikawa celični kulturi, ki se odzove na estrogene z alkalno-fosfatazno aktivnostjo. XN je učinkovito inhibiral z estrogenom posredovano indukcijo alkalne fosfataze, brez notranjega estrogenega potenciala (Gerhäuser in sod., 2002). Antiestrogeni efekt XN so dokazali tudi *in vivo* pri juvenilnih samicah Sprague-Dewley podgan. Nedavno so dokazali, da lahko XN z inhibicijo humane rekombinantne aromatazne (CYP19) aktivnosti zmanjša nivo endogenih estrogenov (Gerhäuser in sod., 2005a).

- c) inhibira rast tumorskega tkiva v zgodnji stopnji razvoja in inducira apoptozo
XN inhibira proliferacijo celic raka dojke (MCF-7, ER-pozitiven rak dojke) in celic raka jajčnikov (A-2780). Z inhibicijo sinteze DNA, zaustavijo celičnega cikla v fazi S, indukcijo apoptoze in celično diferenciacijo pa preprečuje tudi karcinogenezo v napredovalni fazi ter deluje negativno na razmnoževanje rakavih celic (povzeto po Gerhäuser in sod., 2005a).
- d) ima protivnetno aktivnost
XN preko zaviranja izražanja inducibilne sintaze dušikovih oksidov (iNOS, iz ang. inducible nitric oxide synthase) inhibira nastanek dušikovih oksidov (NO, iz ang. nitric oxide). Inhibicija je na nivoju proteinov, kar so raziskovali pri mišjih makrofagih Raw 264,7 (Zhao in sod., 2003). Z inhibicijo sinteze NO zavira tudi nastanek vnetij, ki jih povzročajo mikroorganizmi, kot so DNA in RNA virusi, Gram pozitivne bakterije, mikrobakterije, humane patogene glice in protozoji (plazmodij) (Buckwold in sod., 2004; Gerhäuser, 2005b). NO je prosti radikal, ki ga sintetizira konstitutivna NO in inducibilna (iNOS) sintaza ter ima pomembno vlogo pri številnih vnetnih reakcijah kot tudi pri epitelijski karcinogenezi. Udeležen je tudi pri tvorbi vaskularnega epidermalnega rastnega faktorja (VEGF; iz ang. vascular epidermal growth factor). Pretirano izražanje NO sproži angiogenezo, kar pospeši razvoj tumorja. Ker XN inhibira nastanek NO, ima s tem tudi pozitiven učinek na zmanjšanje procesa angiogeneze (povzeto po Zhao in sod., 2003). Protivnetna aktivnost XN se kaže tudi v primeru vnetij, ki so posledica nenadzorovane rasti in razvoja tumorskih celic. Pri teh vnetjih pride do povečanega nastanka prostaglandinov, ki so mediatorji vnetja (povzeto po Stevens in Page, 2004). Ker XN zavira delovanje encimov ciklooksigenaze-1 in ciklooksigenaze-2 (COX-1 in COX-2), zmanjša tudi nastanek prostaglandinov ter s tem posledično tudi vnetja (Gerhäuser, 2002).
- e) ima antiangiogeno aktivnost
Angiogeneza je nastanek novih krvnih žil in je ključnega pomena pri razvoju tumorja in nastanku metastaz. Če ne pride do angiogeneze, tumor ne bo preskrbljen s hranili in kisikom in zato ne bo mogel rasti v nedogled (Sharma in sod., 2001). Antiangiogene lastnosti XN so raziskovali v človeških *in vitro* testih. Opazili so od doze odvisno zmanjšanje na novo nastalih kapilar pri koncentraciji 0.5-10 µM (Bertl in sod., 2004a). Nadaljnje mehanizme so raziskovali na celični liniji HMEC-1, kjer je XN prav tako zaviral nastanek mikrokapilar (Bertl in sod., 2004b).
- f) deluje antivirusno
Buckwold in sod. (2004) so pokazali, da ima XN antivirusno delovanje proti številnim DNA in RNA virusom. Inhibira s HIV-1 (virus humane imunske pomankljivosti) inducirane citopatične efekte, produkcijo virusnega p24 antigena in reverzno transkriptazo v C8166 limfocitih. Prav tako inhibira HIV-1 replikacijo v krvnih

mononuklearnih celicah. Medtem ko aktivnosti rekombinantne HIV-1 reverzne transkriptaze in vstopa HIV-1 v celice ni inhibiral (Wang in sod., 2004). Prav tako zelo učinkovito zavira razmnoževanje plazmodijev, ki pri človeku povzročajo malarijo (Gerhäuser, 2005a).

g) deluje kot antioksidant in lovilec prostih radikalov

XN odvisno od doze zavira nastanek superoksidnih anionskih radikalov v ksantin/ksantin oksidaznih (xanthine/xanthine oxidase (X/XO)) sistemih pri s TPA-stimuliranih HL-60 levkemijskih celicah. Pri koncentraciji 5 in 25 μM prepreči s Cu^{2+} ioni (Fe^{2+} -ascorbate ali tert-butil hidroperoksid) inducirano *in vitro* oksidacijo nizkomolekularnih lipoproteinov (LDL, iz ang. low-density lipoprotein) pri podganjih jetrnih mikrosomih (Miranda in sod. 2000b; Rodriguez, 2001). S tem nudi XN zaščito pred celičnimi poškodbami, ki jih povzročijo določeni oksidanti in kaže antioksidativne lastnosti (Rodriguez in sod., 2001). Odstranjuje tudi hidroksilne (OH^-), peroksilne (ROO) in superoksidne anionske radikale (O_2^-) ter preprečuje tvorbo slednjih. Zmanjša tudi DNA poškodbe pri celicah HepG2, povzročenih s tBOOH (Plazar in sod., 2007). Gerhäuser in sod. (2002) so z metodo ORAC (iz ang. oxygen radical absorbance capacity) dokazali, da je XN kar za 8.9-krat učinkovitejši lovilec hidroksilnega in peroksilnega radikala v primerjavi z referenčno spojino, vodotopnim vitaminom E. Poleg tega je XN učinkovit lovilec superoksidnih radikalov, nastalih z ksantin-oksidazo, ne da bi pri tem neposredno zaviral encim. Flavonoidi zaradi antioksidantskega delovanja inhibirajo lipidno peroksidacijo, inducirano s številnimi proksidanti v jetrnih homogenatih, mikrosomih, mitohondrijih in liposomih (Briviba in Siens, 1994). Lipidna peroksidacija, inducirana s prostimi radikali, ima vpliv tudi pri patogenezi raka, ateroskleroze, nevroloških motenj in celičnih poškodb (Gutteridge in Haliwell, 1990; Dargel, 1992).

h) inhibira sintezo trigliceridov

Večina tumorjev se prilagodi na nizke koncentracije kisika, kar jim omogoča rast v kronično hipoksičnih pogojih. Goto in sod. (2005) so ugotovili, da je pri celični liniji HT-1080 (celična linija človeškega fibrosarkoma), ki raste v hipoksičnih pogojih, povečana sinteza trigliceridov in holesterolnih estrov. XN je zmanjšal količino nastalih trigliceridov in zaviral nastanek lipidov v hipoksičnih pogojih. Pri tem je bil značilno bolj učinkovit v hipoksičnih pogojih kot v normalnih. Je inhibitor diacilglicerol-acetiltransferazne (DGAT, iz ang. diacylglycerol acyltransferase) aktivnosti in izražanja DGAT-1 mRNA (Tabata in sod., 1997; Casachi in sod., 2004). Povečana citotoksičnost XN v hipoksičnih pogojih bi lahko bila primeren način kemoterapije.

i) aktivira encime za razstrupljanje karcinogenih snovi

Kinon reduktaza (QR) je citosolni flavoprotein, ki ščiti celice pred toksičnostjo ksenobiotikov. Katalizira 2e^- redukcijo kinonov v hidrokinone, ki se nato izločijo iz telesa. XN je induktor QR v gojenih mišjih jetrnih celicah Hepa1c1c7. Pri tem ne

povzroči transkripcije gena za encim faze 1, CYP1A1. Z inhibicijo encima faze I in z indukcijo encima faze II, bi lahko imel XN koristno vlogo pri detoksifikaciji karcinogenov (Miranda in sod., 2000a).

- j) ima antigenotoksične učinke
XN zmanjša število DNA poškodb, ki jih povzročijo nekateri prokarcinogeni (IQ in BaP) in oksidanti (tBOOH) (Plazar in sod., 2007).

Vidimo lahko, da XN v različnih *in vitro* kot tudi v nekaterih *in vivo* testnih sistemih, ki so narejeni predvsem na glodalcih, kaže širok spekter delovanja proti določenim genotoksinom. S tem se je pojavila tudi ideja, da bi ga uporabili v človeški medicini, predvsem za preprečevanje nekaterih bolezni, kot so rakava obolenja. Ta so pri prebivalcih razvitih držav, predvsem zaradi njihovega načina življenja, v porastu. Do njegove dejanske uporabe v medicini pa je lahko še daleč, saj je potrebno še veliko študij, predvsem *in vivo*, tudi epidemiološke študije na ljudeh, ki bi dale natančnejše informacije o njegovem metabolizmu, delovanju in tudi o morebitnih sinergističnih/antagonističnih učinkih z drugimi snovmi, ki so prav tako prisotne v prehrani.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 XN in MeIQx

V diplomski nalogi smo raziskovali delovanje XN zoper genotoksično delovanje MeIQx. Založni raztopini XN (Nookandeh-Institut für Naturstoffchemie GmbH (Homburg/Saar, Germany)) (70 mM) in MeIQx (100 mM) sta bili pripravljeni v dimetilsulfoksidu (DMSO).

3.2 Kemikalije

Tabela 1: Uporabljene kemikalije

kemikalija	Proizvajalec, država	kataloška številka
Akridin oranž	Sigma, St. Louis, ZDA	318337-16
Benzo(a)piren (BaP)	Sigma, St. Louis, ZDA	B-1760
Citohalazin B	Sigma, St. Louis, ZDA	C-6762
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
Fosfatni pufer	PAA, Pasching, Avstrija	H15-011
Formaldehid	Sigma, St. Louis, ZDA	533998-500ML
Glikogen	Sigma, St. Louis, ZDA	6-8751
glukoza-6-fosfat	Sigma, St. Louis, ZDA	G-7879
HCl	Merck, Nemčija	1.09063.1000
Izopropilalkohol	Sigma, St. Louis, ZDA	19,076-4
KCl	Fluka, Nemčija	60130
Kloroform	Sigma, St. Louis, ZDA	366919-1L
Ksantohumol	Homburg/Saar, Nemčija	356779
L-glutamin 4 mM (2%)	Euro Clone, Italija	EC B3000D
LMP agarozna	Invitrogen, VB	15517-022
MeIQx	Toronto Research Chemicals, ZDA	A606600
Metanol	Sigma, St. Louis, ZDA	M1775-1GA
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Fluka, Nemčija	63072
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Fulka, nemčija	63140
MTT	Sigma, St. Louis, ZDA	M-5655
NaCl	Merck, Nemčija	1.06404.100
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Merck, Nemčija	1.06346.0500
Na ₂ HPO ₄	Fluka, Nemčija	71640

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck, Nemčija	1.06580.1000
Na ₂ CO ₃	Sigma, St. Louis, ZDA	S-2127
NaOH	Merck, Nemčija	1.06482.1000
NMP agarozna	Invitrogen, VB	16500-100
Nutrient Broth N°2 Oxoid	Oxoid, VB	CM0067
Oacetna kislina	Merck, Nemčija	607:002-00-6
PBS (10x)	PAA, Pasching, Avstrija	H15-011
penicilin/streptomycin	Euro Clone, Italija	EC B3001D
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,
Reakcijska zmes za revrzno transkripcijo	Applied Biosystems	4368813
S9	Moltox, ZDA	11-01L.2
TaqMan PCR Master mix	Applied Biosystem, ZDA	4304437
tripansko modriilo	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
Trizol reagent	Invitrogen, VB	15596-018
Williamsov medij	Sigma, St. Louis, ZDA	W1878

3.3 Določanja mutagenega/antimutagenega delovanja z Amesovim testom

3.3.1 Amesov test

Amesov test (ali *Salmonella* mikrosomalni test povratnih mutacij) sta razvila B. Ames in D. M. Maron leta 1970. Gre za kratkotrajni bakterijski test povratnih mutacij, ki je namenjen zaznavanju širokega spektra spojin, katere povzročajo poškodbe, kar nato vodi v nastanek genskih mutacij (Motelmans in Zieger, 2000). Sprva so ga uporabljali le za testiranje mutagenosti različnih vrst čistih kemikalij, danes ga pa uporabljam tudi za ugotavljanje mutagenosti različnih kompleksnih vzorcev (Maron in Ames, 1983; Filipič, 1995; Černa in sod., 1996; Černa in sod., 1998) kot so naravne, odpadne in pitne vode (Stahl, 1991; Vargas in sod., 1993) ter za odkrivanje okoljskih mutagenov (Siddiqui in Ahmad, 2003; Ohe in sod.,

2004). Posamezne razrede mutagenih spojin lahko identificiramo z uporabo različnih sevov *Salmonella typhimurium*, ki imajo določene mutacije, s čimer kažejo različno občutljivost za posamezne mutagene (Umbuzeiro in sod., 2004). Sevi bakterije *S. typhimurium* TA98, ki se uporablja za ugotavljanje mutagenosti imajo okvarjen gen za sintezo aminokisline histidin. Te aminokisline bakterije ne morejo sintetizirati, saj je gen zaradi mutacije v histidinskem operonu okvarjen. Ker je histidin nujno potrebna za rast bakterij, le-te brez dodatka histidina v gojišču ne morejo rasti, se deliti in tvoriti kolonije. Takim bakterijam pravimo avksotrofi (His-). Za povečanje občutljivosti bakterijskih sevov so vnešene dodatne mutacije/genetske spremembe (npr. delecija uvrB, mutacija rfa, plazmid pKM101). Število spontanih revertant tega seva se giblje med 20-50 revertant/ploščo. Funkcijo gena za sintezo histidina lahko bakterije obnovijo, vendar le v primeru, če pride na mestu predhodnih mutacij histidinskega operona ali v njegovi bližini do povratnih mutacij. S tem se vzpostavi prvotno normalno stanje, divji tip. Take bakterije so spet sposobne sintetizirati histidin, zato lahko rastejo, tvorijo nove kolonije na gojišču brez histidina in jim pravimo histidinske revertante (Mortelmans in Zieger, 2000).

Čim bolj je neka snov mutagena, več mutacij bo povzročila. Te mutacije zaznamo s povečanim številom kolonij na ploščah s testirano snovjo v primerjavi s kontrolnimi ploščami. V prisotnosti mutagenov se na mestih predhodnih mutacij v histidinskem lokusu ali v njihovi bližini število povratnih mutacij poveča. Mutageno aktivnost testne pojine lahko izračunamo iz razmerja med številom kolonij revertant na ploščah s testno substanco in številom revertant na kontrolnih ploščah, ki je bolj ali manj konstantno (Flamand in sod., 2001). Prednosti Amesovega testa so predvsem v zanesljivosti rezultatov, hitrosti, cenovni ugodnosti in obsežni bazi podatkov (Claxton in sod., 2001).

3.3.2 Sevi bakterije *S. typhimurium*

V Amesovem testu smo uporabili sev bakterije *S. typhimurium* TA98, ki je pridobljen iz bakterije *S. enterica* subsp. I serovar Typhimurium (*S. typhimurium* LT2). Ta je po Gramu negativna, aerobno/fakultativno anaerobna, mobilna, nesporulirajoča enterobakterija.

Uporabljen sev, TA98, ima za specifično tarčno sekvenco marker *hisD3052*, ki se uporablja za ugotavljanje mutacij, do katerih pride zaradi -1 premika bralnega okvirja. To se zgodi blizu ponavlajoče se sekvence CGCGCGCG. Ob mutaciji, oziroma deleciji baznega para se tako ponovno vzpostavi pravilno bralno zaporedje za sintezo histidina (Maron in Ames 1984).

3.3.3 Gojenje kultur bakterij *S. typhimurium*

Izhodiščno bakterijsko kulturo *S. typhimurium* sev TA98, ki jo shranjujemo na -80 °C, smo na hitro odmrznili in prenesli (70 µl v 10 ml hraničnega bujona z ampicilinom, končne

koncentracije 25 µg/ml) v hranilni bujon. Čez noč smo jih inkubirali v gojišču, na 37 °C, da so se namnožile. Naslednji dan, 2 uri pred začetkom testa, smo bakterijsko kulturo stresali na stresalniku (približno 600 obratov/minuto), da so bakterije prešle v eksponencialno fazo rasti.

3.3.4 Metabolna aktivacija S9

Številne karcinogene snovi, kot so HCA so dokler se ne metabolizirajo v aktivno obliko, biološko neaktivne molekule. Citokrom P450 je pri ljudeh in živalih metabolni oksidacijski sistem, ki lahko metabolizira številne kemikalije v elektrofilne oblike, ki so nato reaktivne z DNA. Bakterije so brez tega metabolnega sistema, zato metabolna aktivacija snovi brez dodanih metabolnih encimov ni mogoča. Tako se v testih, kot je na primer Amesov test, v katerih se kot testni organizmi uporabljajo bakterije, doda eksogeni sesalčji metabolni aktivacijski sistem (S9), ponavadi glodalski (večinoma podganji, lahko tudi mišji, hrčkov) (Maron in Ames, 1984).

S9 je mikrosomalna frakcija pridobljena iz podganjih jeter, v katerih so ohranjeni encimi potrebni za metabolno aktivacijo. S S9 določamo mutagenost snovi, ki delujejo mutageno šele, ko se metabolizirajo v aktivno obliko (pro-mutageni) (Maron in Ames, 1984).

3.3.5 Priprava raztopin in gojišč

Plošče minimalnega glukoznega gojišča:

SESTAVINE	Agar	Destilirana voda	50x VB sol	40% glukoza
ZA 500 ml	7.5 g	465 ml	10 ml	25 ml

V steklenico za avtoklaviranje smo dodali destilirano vodo in agar ter ob segrevanju (≈ 50 °C) mešali na magnetnem mešalu, dokler se agar ni raztoplil. Raztopljen agar smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Po končanem avtoklaviranju, ko so se raztopine nekoliko ohladile, smo dodali sterilno raztopino VB soli in 40% glukozo (ti smo avtoklavirali ločeno). Raztopino smo premešali in v vsako petrijevko razlili 30 ml gojišča. Počakali smo, da se je agar strdil in nato plošče v obrnjenem položaju shranili na hladnem.

Vogel-Bonner medij (50x VB sol):

SESTAVINE	Destilirana H ₂ O	Magnezijev sulfat (MgSO ₄)	Citronska kislina monohidrat	Kalijev fosfat anhidrid (K ₂ HPO ₄)	Natrijev amonijev fosfat (NaHNH ₄ PO ₄ ·4 H ₂ O)
ZA 500 ml	335 ml	5 g	50 g	250 g	87.5 g

V steklenico za avtoklaviranje smo najprej dodali destilirano vodo in ob mešanju na magnetnem mešalu dodajali zatehtane soli v navedenem vrstnem redu. Pri tem smo vedno počakali, da se je predhodna sol popolnoma raztopila in šele nato dodali naslednjo. Raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in jo nato shranili na hladnem.

40% glukoza:

SESTAVINE	Destilirana H ₂ O	glukoza
ZA 100 ml	100 ml	40 g

Glukozo smo ob segrevanju (≈ 50 °C) in mešanju na magnetnem mešalu raztopili v destilirani vodi. Raztopino smo nato avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in jo do uporabe shranili na hladnem.

Top agar:

SESTAVINE	Agar	NaCl	Destilirana voda
ZA 500 ml	3 g	2.5 g	500 ml

Agar in NaCl smo ob segrevanju (≈ 50 °C) in mešanju na magnetnem mešalu raztopili v destilirani vodi ter nato raztopino avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo jo shranili na hladnem. Pred uporabo smo dodali toliko histidin/biotina (5 mM), da je bila končna koncentracija 0.05 mM.

Raztopina histidin/biotina (5 mM):

SESTAVINE	D-biotin (FW 247.3)	L-histidin-HCl (FW 191.7)	Destilirana voda
ZA 50 ml	61.8 mg	48 mg	50 ml

Destilirani vodi smo dodali biotin in ga ob segrevanju (≈ 50 °C) raztapljali toliko časa, da smo dobili bistro raztopino. Nato smo dodali in raztopili tudi histidin. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo čez membranski filter s porami 0.22 µm (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) in jo shranili na hladnem (4 °C).

Hranilno gojišče:

SESTAVINE	Nutrient Broth N°2 Oxoid	Destilirana voda
ZA 500 ml	12.5 g	500 ml

Hranilni agar smo ob segrevanju in mešanju (≈ 50 °C) na magnetnem mešalu raztopili v destilirani vodi in nato raztopino avtoklavirali 20 minut pri 121 °C ter jo do uporabe shranili na hladnem.

Fosfatni pufer, pH 7.4:

SESTAVINE	0.2 M natrijev dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$); 13.8 g/500 ml	0.2 M dinatrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4); 14.2 g/500 ml
Za 500 ml	60* ml	500* ml

* približni volumni raztopin

Raztopini 0.2 M natrijevega dihidrogen fosfata in 0.2 M dinatrijevega hidrogen fosfata smo zmešali v zgoraj navedenih volumnih in umerili pH na 7.4. V primeru, da je bil pH prenizek, smo dodali 0.2 M dinatrijev hidrogen fosfat. Pufer smo sterilizirali s filtracijo čez membranski filter s porami 0.22 µm in ga shranili na hladnem (4 °C).

Metabolna aktivacija S9:

SESTAVINE	1 M KCl	0.2 M $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 M G-6-P	0.04 M NADP	0.2 M NaHPO_4
Za 1 ml	33 µl	32 µl	25 µl	100 µl	500 µl

+ za 1 ml

4 % S9 mix	Sterilna H_2O	S9
Za 1 ml	270 µl	40 µl

Pripravili smo mešanico vseh raztopin, razen S9 jetrne frakcije in sterilne vode. Raztopino smo nato sterilizirali s filtriranjem skozi membranski filter s porami velikosti 0.22 µm. Pred samouporabo smo sterilno dodali še ustrezenvolumen S9 frakcije in sterilne vode. Med testom smo pripravljeno S9 mešanico imeli ves čas na ledu.

3.3.6 Priprava vzorcev

Z Amesovim testom smo testirali 10 pripravljenih vzorcev. To so bili kontrola topila in 4 koncentracije ksantohumola (25, 50, 100 in 200 µg/ml). Bakterije smo izpostavili tudi kombinaciji MeIQx (8.536 ng/ploščo) z različnimi koncentracijami XN (0, 25, 50, 100 in 200 µg/ml), s čimer smo preverjali antimutageno delovanje XN. Koncentracije XN 0, 25, 50, 100 in 200 µg/ml ustrezanojo 0, 2.5, 5, 10 in 20 µg/ploščo.

3.3.7 Izvedba Amesovega testa

Top agar smo segreli in mu dodali histidin/biotin (na 100 ml top agarja smo dodali 1 ml his/bio koncentracije 5mM) ter vse skupaj ob segrevanju dobro raztopili. Dodatek histidina v top agar omogoča bakterijam, da se preden zmanjka dodanega histidina v gojišču delijo 6 do 8 krat. Le His⁺ revertante se bodo lahko tudi po porabi vsega histidina v gojišču delile še naprej. Rezultat tega bodo vidne kolonije, ki jih lahko preštejemo, medtem ko ozadje predstavlja mikrokolonije od histidina odvisnih bakterij.

Amesov test smo izvedli v njegovi standardni različici, vgradnje v ploščo. Testni sev smo izpostavili izbrani kemikaliji direktno na plošči minimalnega gojišča. V epruvetke v termobloku (43 °C) smo dodali 2 ml top agarja z raztopljenim his/bio. K top agarju smo dodali 100 µl vzorca, 100 µl bakterijske suspenzije in 500 µl S9 mešanice. Pri tem smo bili pozorni, da temperatura v termobloku ni presegla 45 °C in da bakterije niso bile predolgo na visoki temperaturi. Vsebino epruvetke smo premešali na vorteksu in jo zlili na prej pripravljene plošče minimalnega gojišča. Ko se je top agar strdil, smo plošče obrnili in jih inkubirali 3 dni na 37 °C. Po treh dneh smo prešteli kolonije revertant in primerjali število revertant na kontrolnih in vzorčnih ploščah. Vsako koncentracijo smo testirali v treh ponovitvah.

3.4. Model sesalčjih celic

3.4.1 Celična linija HepG2

V naši študiji smo potencialne citotoksične, genotoksične in antigenotoksične učinke XN raziskovali na modelu celične linije humanega hepatoma (celice HepG2).

Celice HepG2 so izolirali leta 1979 iz hepatoblastoma 11-letnega dečka (Aden in sod., 1979). V zadnjem času se je ta celična linija uveljavila predvsem v študijah genotoksičnosti. Testni sistem s HepG2 celicami se je pokazal kot primeren *in vitro* model za zaznavanje okoljskih in prehranskih genotoksinov, ko-genotoksinov in antigenotoksinov (Knasmüller in sod., 2004a, b). Celice HepG2 imajo ohranjeno metabolno aktivnost; aktivne imajo metabolne encime I. faze (citokrom P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B in CYP2E1) in II. faze (glutation-S-transferaza, sulfotransferaza, N-acetyltransferaza in glukuranoziltransferaza), ki igrajo ključno vlogo pri aktivaciji/detoksifikaciji ksenobiotikov in mutagenov, kateri delujejo na DNA. Aktivnost teh encimov je dokaj podobna ali nekoliko nižja od aktivnosti encimov v sveže izoliranih primarnih človeških hepatocitih (Knasmüller in sod., 1998). HepG2 celice imajo aneuploiden kariotip (od 48 do 54), najpogosteje 52 kromosomov. Za eno celično delitev potrebujete od 20 do 28 ur (Natarajan in Darroudi, 1991). Obstaja več različnih klonov te celične linije, ki se med seboj razlikujejo tako morfološko kot tudi glede aktivnosti presnovnih encimov. V naši raziskavi smo uporabili klon celic HepG2, ki nam ga je poklonil

prof. dr. Firouz Darroudi (Oddelek za radiacijsko genetiko in kemijsko mutagenezo, Univerza v Leidnu, Nizozemska). Ta isti klon že več let uporablja na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka. Celice smo uporabljali do desete pasaže po odmrznitvi, saj se s časom gojenja in številom pasaž encimske aktivnosti zmanjšajo, s tem pa se spremenijo tudi morfogenetske lastnosti celic.

3.4.2 Gojenje celic HepG2

Celično linijo HepG2 smo shranjevali v tekočem dušiku. Celice smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Cornong Costar Corporation, New York, USA) pri 37 °C, v 5% CO₂ atmosferi v celičnem gojišču, sestavljenem iz Williamsovega gojišča E, 15 % FBS, 1 % penicilin/streptomicin (100E/ml) in 1 % L-glutamina.

Celice smo presadili, ko so prerasle 80 % plošče. Najprej smo iz plostenke odstranili gojišče in celice sprali z 1x PBS, ga odstranili ter dodali 0.1% tripsin (1.5 ml na plstenko površine 25 cm², 3 ml na plstenko površine 75 cm²). Vsebino plošč smo inkubirali 5 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo plošče s celicami rahlo pretresli, da so se celice odlepile od podlage in dodali sveže gojišče, s katerim smo zavrlji delovanje tripsina. S tem smo preprečili morebitne poškodbe DNA, ki bi lahko nastale zaradi dolge izpostavljenosti tripsinu. Suspenzijo celic smo prenesli v centrifugirko in jo centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli, celice pa resuspendirali v svežem gojišču ter vse skupaj prenesli v novo centrifugirko. Resuspendirane celice smo s pomočjo brizge 6-8x potegnili skozi injekcijsko iglo (0.9x40 mm, Becton Dickenson, Fraga, Španija). Na ta način smo dobili suspenzijo posameznih celic, ki smo jih nasadili na novo plstenko.

Za odlepljanje celic smo uporabili 0.1% raztopino tripsina. Za 1 l te raztopine smo zatehtali 1 g tripsina, 0.1 g EDTA, 8 g NaCl, 0.4 g KCl, 1 g glukoze monohidrata in 0.84 g NaHCO₃. Pripravljeno raztopino tripsina smo sterilizirali s filtriranjem skozi filter s porami velikosti 0.22 µm. Za določanje števila celic med gojenjem in nasajanjem smo uporabili 0.4% tripansko modrilo.

3.5. Določanje citotoksičnega delovanja XN in kombinacije MeIQx s XN na celice HepG2 s testom MTT

3.5.1 Test MTT

Pri ugotavljanju genotoksičnega delovanja določenih snovi je pomembno, da le-te ugotavljamo pri netoksičnih koncentracijah., zato moramo najprej ugotoviti ali testirana snov v izbranih koncentracijah zmanjša preživetje celic. V ta namen lahko uporabimo različne kolorimetrične teste. Ti temeljijo na pretvorbi brezbarvnega substrata v barvni produkt, kar se

zgodi ob prisotnosti živih celic. Eden izmed kolorimetričnih testov je tudi MTT test, ki ga je opisal Mosman (1983). MTT (1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid) je rumena vodotopna substanca, katero mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste kristale formazana. Ti kristali niso topni v vodi, so pa topni v DMSO, izopropanolu in v podobnih organskih topilih (povzeto po navodilih 10G-Pos02-01, MTT test, laboratorija GEN).

Količino nastalega formazana določimo kolorimetrično, z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 570 nm in z referenčnim filtrom valovne dolžine 690 nm. Obe vrednosti sta pri homogeni celični populaciji sorazmerni, linearni s številom živih celic (povzeto po navodilih 10G-Pos02-01, MTT test, laboratorija GEN). Linearnost med količino formazana in številom celic pokriva široko območje gostote celic. Iz tega je razvidno, da je test izredno občutljiv in lahko zazna nizko število živih celic (Mosman, 1983). Vendar pa je razmerje med količino nastalega formazana in številom celic specifično za vsako celično linijo, kar je predvsem posledica razlik v metabolni aktivnosti med posameznimi celičnimi linijami. MTT test je natančna, enostavna in kvantitativna kolorimetrična metoda, ki se uporablja za določevanje števila celic. Z njim lahko posredno zaznavamo žive celice in je primeren le za celice, ki rastejo v enem sloju ali suspenziji. Uporablja se za določevanje citotoksičnosti snovi in vpliva teh snovi na celično proliferacijo. Odčitavanje rezultatov je avtomatizirano in relativno hitro, saj lahko le-te odčitamo že nekaj minut po dodatku topila v katerem se formazan raztaplja. Sprememba barve je opazna tudi s prostim očesom, kar je lahko zelo koristno če rezultate potrebujemo takoj (Mosman, 1983).

3.5.2 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem.

Test MTT smo izvedli po postopku, kot je opisan v laboratorijskih navodilih (10G-Pos02-01, MTT test, laboratorija GEN). Celice HepG2 smo gojili po postopku opisanem v poglavju 3.4.2 ter jih nasadili na mikrotitrsko ploščo s 96-timi luknjicami (iz ang. 96-well plates) s prozorni dnem za gojenje celičnih kultur. V vsako luknjico smo dodali 200 µl celične suspenzije z gostoto 40.000 celic na ml (kar ustreza gostoti 8000 celic/luknjico) in ploščo inkubirali 24 ur (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera), da so se celice prilepile na podlagu plošče.

Po končani inkubaciji smo gojišče zamenjali z 200 µl raztopine vzorcev. Celice smo izpostavili kontroli medija, pri katerem smo le zamenjali medij s svežim in kontroli topila, kjer smo celice izpostavili 1% DMSO, z namenom, da bi izločili morebiten vpliv topila na celice. Celice smo izpostavili tudi XN (0.01, 0.1, 1, 10 in 100 µM) in kombinaciji MeIQx (350 µM) s XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 µM).

3.5.3 Izvedba testa MTT

Po zamenjavi medija s testiranimi snovmi je sledila 24-urna inkubacija celic pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Po končani inkubaciji smo dodali 10% reagent MTT (končna koncentracija 0.5 mg/ml). Celice smo na 37 °C inkubirali še dodatne 3 ure, kar je dovolj, da nastanejo kristali formazana. Nato smo previdno odstranili ostanke gojišča in pri tem pazili, da nismo odstranili kristalov formazina. Te smo raztopili z dodatkom 200 µl DMSO. Za tem smo s spektrofluorimetrom (Tecan, Genios) izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 570 nm in referenčnem filtru 690 nm. Količina nastalih kristalov formazana, oziroma izmerjena optična gostota sta sorazmerni številu živih celic. Vsako koncentracijo vzorca smo testirali v petih paralelah in celoten poskus ponovili v dveh neodvisnih ponovitvah, ki se med seboj nista značilno razlikovala. V diplomski nalogi smo predstavili le rezultate ene ponovitve.

3.6 Določanje genotoksičnega delovanja XN in antigenotoksičnega delovanja XN zoper MeIQX

3.6.1 Test komet

Test komet ali elektroforeza posamezne celice (SCGE; iz ang. single cell gel electrophoresis) je relativno preprosta, hitra in zelo občutljiva metoda za zaznavanje DNA poškodb na nivoju posamezne evkariotske celice (Singh in sod., 1988; Žegura in Filipič, 2004). S to metodo lahko zaznamo različne tipe DNA poškodb, npr. enoverižne (SSB; iz ang. single-strand breaks) in dvojerižne (DSB; iz ang. double-strand breaks) prelome DNA, alkalno labilna mesta (ALS; iz ang. alkali labile sites), kot so apurinska in apirimidinska mesta (AP), DNA-DNA in DNA-protein prečne povezave ter tudi enoverižne prelome DNA, ki so posledica nepopolnega popravljalnega mehanizma celice (Žegura in Filipič, 2004). Visok nivo zabeleženih prelomov s testom komet lahko kaže na visoko stopnjo DNA poškodb ali na učinkovito popravljanje le-teh (Collins in sod., 1997).

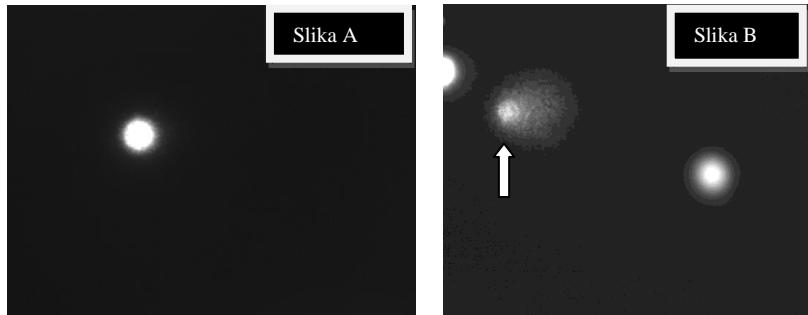
Metodo sta prvič opisala Östling in Johanson leta 1984, pri kateri sta DNA sproščeno iz ene celice vključila v agarozo in jo za kratek čas izpostavila električnem polju v nevtralnih pogojih. To je omogočilo zaznavanje dvojerižnih prelomov DNA (Östling in Johanson, 1984). Nekaj let za tem, ko sta Östling in Johanson razvila test komet, sta začeli dve skupini raziskovalcev neodvisno druga od druge razvijati postopek izpostavljanja celic pri visokem pH (Collins, 2004). Ena skupina, ki jo je vodil Singh in sod. (1988), je celice lizirala pri pH 10 in jih izpostavila elektroforetskim pogojem pri pH večjem od 13. Pri teh alkalnih pogojih se lahko zaznajo tako SSB kot tudi ALS (Tice in sod., 2000). Druga skupina, ki jo je vodila Olive in sod. (1990), je celice eno uro pred elektroforezo lizirala v šibko alkalni raztopini. Tudi izpostavitev električnemu polju je potekala v šibko alkalnih pogojih, pri katerih pa se ALS ne izrazijo kot SSB (Olive in sod., 1990).

Pri alkalni različici testa komet je suspenzija posameznih celic vključena v agarozo na objektnih stekelcih, lizirana z detergenti in visokimi koncentracijami soli pri pH 10 (Singh in sod., 1988). Med liziranjem se odstranijo vse celične komponente razen jeder s super zvitimi molekulami DNA. V naslednji stopnji, ki prav tako poteka v alkalnih pogojih, pride do denaturacije in odvajanja super zvite DNA (povzeto po Žegura in Filipič, 2004), ki se začne odvijati s smeri verižnih prelomov (iz ang. strand brakes). Do tega pride zaradi porušenja vodikovih vezi med dvema enoverižnima molekulama DNA, kar se zgodi že pri pH vrednostih nad 12 (Kohn, 1991). Zaradi alkalnih pogojev se lahko zaznajo tako SSB kot tudi ALS (Tice in sod., 2000). Pri pH 12.6 ali višjem, se ALS hitro pretvorijo v SSB (Kohn, 1991). Pri pH 13 in več (mi smo uporabili različico alkalnega kometa s pH 13) se pričakuje, da bo pretvorba ALS v SSB maksimalna (Tice in sod., 2000). Ta pretvorba je pomembna, saj večina genotoksičnih agensov povzroči v večji meri nastanek SSB in/ali ALS, kot DSB (Tice in sod., 2000). Zaradi tega se alkalna, kjer je pH večji od 13, različica testa komet priporoča kot optimalna za identifikacijo takih agensov (Tice in sod., 2000). Odvijanju sledi korak, v katerem je DNA izpostavljena električnem polju, pri pH višjem od 13. Pri tem pH-ju je potovanje DNA v električnem polju povečano zaradi večjega števila delcev SSB, SSB povezanih z nepopolno popravljalnimi mesti in ALS (Tice in sod., 2000). Ker imajo nukleinske kisline negativen naboj, bodo v električnem polju potovale proti anodi, vendar z različno hitrostjo. Hitrost potovanja je odvisna od velikosti molekul in od števila prelomov, zato potuje poškodovana DNA v električnem polju hitreje kot nepoškodovana, s čimer tvori tako imenovan rep kometa, medtem ko je nepoškodovana DNA počasnejša in ostane v tako imenovani glavi kometa. Zaradi tega dajejo taka jedra videz kometa (povzeto po Žegura in Filipič, 2004), po čemer je ta test tudi dobil ime. Elektroforezi sledi nevtralizacija DNA, tej pa ovrednotenje kometov. Da postane DNA vidna, jo barvamo s flourescenčnimi barvili, ki se vrvajo med bazne pare. Najpogosteje uporabljeni barvila so etidijev bromid (EtBr), propidijev jodid in DAPI (4,6-diamidin-2-fenilindol) (Žegura in Filipič, 2004). V naših poskusih smo uporabili EtBr, ki se veže na dvojno verigo DNA učinkoviteje kot na enojno (Collins, 2004).

Za analizo slik kometov obstaja več računalniških programov. Najpogosteje uporabljeni parametri za izražanje DNA poškodb so dolžina repa (razdalja od DNA v glavi kometa do zadnjega fragmenta DNA v repu, izražena v mikrometrih), odstotek DNA, ki je prepotovala iz glave kometa v rep kometa, Olivni repni moment (produkt odstotka DNA v repu in razdalje od centra repa kometa do centra glave kometa) in razširjeni repni moment (produkt DNA v repu in dolžina repa) (povzeto po Žegura in Filipič, 2004).

V zadnjem desetletju je test komet postal eden izmed standardnih metod za določanje DNA poškodb (Collins, 2004). Zelo uporaben je v genetski toksikologiji, in sicer za identifikacijo genotoksičnih snovi, v študijah popravljanja DNA, ekotoksikologiji, okoljskem biomonitoringu, prehranski toksikologiji, klinični aplikaciji, človeških populacijskih študijah, analizi celičnega cikla in biologiji prostih radikalov (Tice in sod., 2000). Prednost te metode pred drugimi testi za ugotavljanje genotoksičnosti je visoka občutljivost, zaznavanje nizkih

količin DNA poškodb, fleksibilnost, nizki stroški, enostavna aplikacija, ne zahteva ogromnega števila celic, potreba po majhni količini testnih substanc in relativno kratek čas za dokončanje študij (Östling in Johanson, 1984). Pomanjkljivost pa je v tem, da ne moremo natančno določiti naravo poškodbe, ki jo zaznamo s tem testom (Horváthová in sod., 1998).



Slika 5: Primeri različno poškodovanih jedr celic oz. kometov (A slika-primer nepoškodovanega jedra celice, približno 10 % DNA v repu in slika B (puščica)-primer poškodovanega jedra celice, približno 50 % DNA v repu).

3.6.1.1 Priprava raztopin in reagentov za test komet

Raztopina za liziranje celic

- 2.5 M NaCl (29.28 g/200 ml H₂O)
- 100 mM EDTA (7.44 g/200 ml H₂O)
- 100 mM TRIS (0.24 g/200 ml H₂O)

pH vrednost raztopine smo uravnali na 10 z 10 M NaOH in jo do uporabe shranili na 4 °C. Tik pred uporabo smo dodali 2 ml Tritona X-100 (končne koncentracije 1 %) ter na magnetnem mešalu dobro premešali.

Pufer za elektroforezo:

- 0.3 M NaOH (30 ml 10 M NaOH/l H₂O)
- 1 mM EDTA (5 ml 0.2 M EDTA/l H₂O)

Raztopini 10 M NaOH (200 g/500 ml H₂O) in 0.2 M EDTA (37.2 g/ 500 ml H₂O) smo pripravili vnaprej, medtem ko smo ostale zmeraj pripravili sveže. 10 M NaOH smo do uporabe shranili na sobni temperaturi, 0.2 M EDTA pa pri 4 °C. Pripravili smo 1.25 l pufera za elektroforezo in ga do uporabe shranili na 4 °C.

Pufer za nevtralizacijo:

- 0.4 M TRIS (9.67 g/200 ml H₂O)

Pripravili smo 200 ml pufra za nevtralizacijo in mu s HCl uravnali pH na 7.5. Raztopino smo do uporabe shranili na 4 °C.

Agaroza:

- 1 % NMP; agaroza z normalno točko tališča (iz ang. Normal melting point agarose),
- 1 % LMP; agaroza z nizko točko tališča (iz ang. Low melting point agarose).

Agarozi smo ob segrevanju v mikrovalovni pečici in mešanju raztopili v 1x PBS. Med samim poskusom smo jo po potrebi ponovno segreli v mikrovalovni pečici.

3.6.1.2 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem

Test komet smo izvedli po postopku, kot ga je opisal Singh in sod. (1988), vendar z manjšimi spremembami. Celice smo gojili in poželi, kot smo opisali v poglavju 3.4.2 in jih nato z gostoto 40.000-60.000 celic/luknjico nasadili na ploščo z 12-luknjicami. Plošče s celicami smo čez noč inkubirali na 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂, da so se celice pritrstile na podlago.

Naslednji dan smo odstranili medij, celice sprali z 1x PBS in jih za 24 ur izpostavili MeIQx (250 µM) v kombinaciji s XN (0, 0.01, 0.1, 1, 10 µM). V test smo vključili tudi kontrolo gojišča (pri čemer smo celicam zamenjali gojišče), kontrolo topila (0.1% DMSO) in pozitivno kontrolo (benzo(a)piren, 30 µM).

Po inkubaciji smo celicam odstranili testirane snovi, jih sprali z 1x PBS ter jih nato odlepili z dodatkom 0.1% tripsina (200 µl/luknjico). Zatem smo celice za 5 minut centrifugirali na 800 obratih/minuto. Supernatant smo zavrgli, sediment pa resuspendirali v 70-80 µl medija. Suspenzijo celic smo prenesli v dve epici, v vsako po 30 µl.

3.6.1.3 Priprava stekelc in nanos celične suspenzije

Pri testu komet smo uporabili objektna stekelca, peskana po celotni površini (iz ang. fully frosted slides), ki smo jih čez noč namočili v metanolu, da so se razmasti. Pred uporabo smo jih posušili z obžiganjem in jih primerno označili. Agarozo, tako NMP kot LMP, smo pred nanašanjem gelov v mikrovalovni pečici segreli do vrela. Nato smo na stekelca nanesli 80 µl 1% NMP agaroze, jih pokrili s krovnimi stekelci in objektnike za 5 minut prestavili na hladno, da se je agarozna strdila. Po inkubaciji na hladnem smo odstranili krovnike in nanesli drugo plast, ki je vsebovala 70 µl 1% LMP agaroze pomešane s 30 µl suspenzije tretiranih celic ter jih prekrili s krovniki. Objektnike smo prestavili na hladno in počakali, da se je agarozna strdila ter nato previdno odstranili krovnike.

3.6.1.4 Liziranje celic

Objektna stekelca, ki smo jim odstranili krovnike, smo prestavili v kadičko z raztopino za liziranje celic ter jih inkubirali 1 uro pri 4 °C v temi. Zaradi visokega pH pride do razgradnje proteinov in RNA, visoka koncentracija detergentov pa povzroči razpad celičnih membran. EDTA, ki smo ga dodali raztopini, veže iz zunanje membrane dvovalentne kovinske ione in jo na ta način zrahlja, poleg tega pa prepreči tudi delovanje DNaz. Z liziranjem smo odstranili vso celično vsebino, razen jeder s superzvito DNA.

3.6.1.5 Odvijanje DNA

Po končanem liziranju celic smo stekelca prenesli v elektroforetsko kadičko in jo napolnili s pufrom za odvijanje, ki ima visok pH. Zaradi visokega pH pride do odvitja superzvite DNA in pretvorbe ALS v enoverižne prelome. Alkalno odvijanje je potekalo 20 minut pri 4 °C v temi.

3.6.1.6 Elektroforeza

Po 20 minutah odvijanja DNA smo prižgali elektroforezo in jedra celic izpostavili električnemu polju pri napetosti 25 V (0.5-1 V/cm) in toku 300 mA. Elektroforeza je prav tako potekala 20 minut pri 4 °C v temi.

3.6.1.7 Nevtralizacija in shranjevanje stekelc

Po končani elektroforezi smo stekelca prenesli v kadičko z nevtralizacijskim pufrom in jih za 15 minut inkubirali pri 4 °C v temi. Nato smo stekelca prenesli v novo kadičko z ovlaženo papirnato brisačko. Na ta način smo zagotovili zadostno vlago in s tem preprečili izsušitev preparatov. Kadičko smo prekrili z alufolijo, jo zavili v plastično vrečko in jo do obdelave preparatov shranili na 4 °C.

3.6.1.8 Barvanje jeder

Jedra celic na preparatih smo pred mikroskopiranjem barvali z 20 µl EtBr s koncentracijo 5 µg/ml.

3.6.1.9 Slikanje in analiza jeder celic

Slike kometov smo zajemali s pomočjo CCD kamere (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies, Velika Britanija) in pri tem uporabili fluorescenčno svetlobo (Nikon HB-10104AF, Japonska). Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515-560 nm, zaporni filter pa 590 nm. Slike smo prenesli na računalnik in jih obdelali s pomočjo programa Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). V vsaki skupini izpostavljenih celic smo obdelali 50 jeder. Program izračuna več parametrov, s katerimi je določena stopnja poškodovanosti posameznih jeder. V diplomski nalogi smo za prikaz poškodovanosti DNA izbrali odstotek DNA v repu, ki nam pove koliko DNA je prepotovalo iz glave v rep kometa. S pomočjo statističnega programa (Graph Pad Prism 5) smo izračunali ali se izpostavljene skupine celic razlikujejo od kontrolne skupine. Uporabili smo enosmerno analizo variance ANOVA (Kruskal Wallis test). Za primerjavo median kontrolnih skupin in vzorcev izpostavljenih skupin smo uporabili Dunet test. Celoten poskus smo ponovili v treh neodvisnih ponovitvah.

3.6.2 Test mikrojeder

Test mikrojeder (CBMN; iz ang. the cytokinesis-block micronucleus assay) je metoda za določanje genomske nestabilnosti na nivoju kromosoma/molekule. Je pristop za merjenje kromosomskih poškodb preko merjenja mikrojeder, ki je za hematologe znan tudi kot Howell-Jolly telesa in sta ga neodvisno drug od drugega razvila Schmid (1975) in Heddle (1973). Test mikrojeder, na celicah kostnega mozga in krvnih eritrocitov, je postal eden izmed najbolj uveljavljenih *in vivo* citogenetskih testov na področju genetske toksikologije (Fenech, 1993).

S to metodo lahko zaznavamo kromosomske prelome, prerazporeditve, neločevanje in izgubo kromosomov, amplifikacije genov, apoptozo ali nekrozo (Fenech, 2000). Razvoj metode je omogočil razlikovanje med mikrojedri nastalimi iz celih (aneugeni) in iz dela kromosomov (klastogeni) (Parry in sod., 1995). Test mikrojeder je relativno neobčutljiv pri *in vitro* zaznavanju genotokinov, ki raje povzročajo DNA adukte ali bazne modifikacije, kot pa verižne prelome ali izgube kromosomov (Fenech, 1993). Mikrojedra se lahko izražajo le pri delečih se evkariontskih celicah, zato metoda ni uporabna za populacijo celic, ki se ne delijo ali kinetika celične delitve ni dobro kontrolirana (Fenech, 1993).

Za štetje mikrojeder pri testu CBMN v populaciji celic je pomembno, da prepoznamo celice, ki so zaključile z mitotsko delitvijo. Take celice prepoznamo po dvojedrnem izgledu, ki nastane če celice, po tem ko jih je večina končala z jedrno delitvijo, tretiramo s citohalazinom b (cyt-b), ki blokira celično citokinezo, katera sledi delitvi jedra (Fenech, 1993). Cyt-b je inhibitor polimerizacije aktina, ki je potreben za tvorbo mikrofilamentnega obroča. Med citokinezo je mikrofilamentni obroč tisti, ki stiska citoplazmo med novo nastalima hčerinskima jedroma, s čimer povzroči nastanek dveh celic (Carter, 1967). Cyt-b s preprečitvijo citokinezom omogoči kopiranje vseh delečih se celic na dvojedrnem ali

štirijedrnem (če pride do druge jedrne delitve) nivoju v deleči se populaciji, in sicer v odvisnosti od sinhronosti ter od deleža delečih se celic (Fenech, 1993).

S testom mikrojeder se lahko ugotavlja ali določen agens povzroča nastanek mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov ali jedrnih brstov v gojenih človeških in ostalih sesalčjih celicah. Mikrojedra se izrazijo pri delečih se celicah s kromosomskimi prelomi, kateri se ne pripajajo na centromere-acentrični fragmenti in/ali celimi kromosomi, ki med mitozo niso sposobni potovanja na nasprotne pole (Fenech, 1993), zaradi česar zaostanejo v anafazi celične delitve. Tako se med anafazo pojavljajo kromosomi ali fragmenti zunaj delitvenega vretena (Smaka-Kincl, 1993). Do tega lahko pride tudi zaradi napak v delovanju ali zaradi poškodb delitvenega vretena, kot tudi zaradi okvar kinetohora (Smaka-Kincl, 1993, Glasenčnik in sod., 2004). Kromosomski fragment brez centromere ali kromosom, ki zaradi različnih razlogov ni pripel na delitveno vreteno, ne moreta v anafazi celične delitve usklajeno potovati na pol celice, kjer se kasneje oblikujeta novi jedri. Tako lahko ostaneta zunaj glavnega jedra, razen če do pola ne prispeta zgolj po naključju in na ta način postaneta del novo nastalega jedra, kar pa je odvisno tako od velikosti fragmenta (ali kromosoma) kot tudi od velikosti celice. V telofazi se okrog zaostajajočih kromosomov in fragmentov tvori jedrna ovojnica. Po končani delitvi se ti delci odvijejo in so podobni interfaznemu jedru, le da so precej manjši od glavnega jedra (Fenech, 2000). Iz tega tudi izhaja izraz mikrojedra, ki predstavljajo zelo priročen in zanesljiv indeks tako kromosomskih prelomov kot kromosomskih izgub. Običajno je mikrojedro, ki vsebuje celoten kromosom večje od tistega, ki vsebuje samo kromosomski fragment (Heddle in sod., 1991).

Nukleoplazmatski mostički (NPBs; iz ang. nucleoplasmic bridges) nastanejo, ko v anafazi celične delitve potujejo centromere dicentričnih kromosomov ali kromatid na nasprotne pole celic, s čimer nakazujejo preureditve kromosomov (Fenech in Crott, 2002).

Jedrni brsti so posledica pomnoževanja genov. Pomnožena DNA se selektivno locira na obrobju jedra in se izloči v obliki jedrnih brstov, ki lahko med S-fazo celičnega cikla tvorijo mikrojedra (Shimizu in sod., 1998; Shimizu in sod., 2000). Jedrni brsti imajo enako morfologijo kot mikrojedra, le da so z jedrom povezani s širokim ali ozkim pečljem nukleoplazmatskega materiala (Fenech in Crott, 2002).

3.6.2.1 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem

Test mikrojeder smo izvedli po postopku, kot je opisan v Fenech (2000). Celice smo najprej nagojili, kot smo že predhodno opisali v poglavju 3.4.2 ter jih nato z gostoto 600.000-800.000 celic/ploščo nasadili na T-25 plošče. Temu je sledila 24-urna inkubacija plošč (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera).

Naslednji dan smo odstranili medij in celice sprali z 1x PBS. Nato smo celice izpostavili delovanju XN (0.01, 0.1, 1 in 10 μ M) ter kombinaciji MeIQx (250 μ M) s XN (0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M). V test smo vključili tudi kontrolo gojišča (pri čemer smo celicam zamenjali gojišče), kontrolo topila (0,1% DMSO) in pozitivno kontrolo benzo(a)pirena (10 μ M). Izpostavljenе celice smo inkubirali za 24 ur.

3.6.2.2 Izpostavitev celic HepG2 citohalazinu b

Po končani 24-urni inkubaciji smo celice sprali z 1x PBS in dodali sveže gojišče s cyt-b končne koncentracije 2 μ g/ml. Temu je sledila 26-urna inkubacija (37 °C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). V tem času je v kontrolni populaciji 40–60 % dvojedrnih celic.

3.6.2.3 Priprava preparatov in nanos na stekelca

Naslednji dan smo celicam odstranili gojišče in jih sprali z 1x PBS. Gojišče in pufer smo spravili v ustrezno označene centrifuirke. Celice smo odlepili s podlage z 1 ml 0.1% tripsina. Delovanje encima smo zaustavili z dodatkom medija in nato plošče nekoliko sprali. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirke ter jih za 5 minut centrifugirali pri 800 obratih/minuto.

Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant do 1 cm nad dnom centrifugirke in dodali 1 ml PBS. Zatem smo resuspendirali sediment in dodali še 3 ml PBS ter 5 minut centrifugirali pri 800 obratih/minuto.

Nato smo odsesali supernatant, resuspendirali sediment ter dodali 5 ml hipotonične raztopine (75 mM KCl). Vsebino centrifugirk smo premešali z obračanjem in jih 2 do 5 minut inkubirali na sobni temperaturi ter jih nato centrifugirali 5 minut pri 600 obratih/minuto.

Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali 1 ml Karnojevega fiksativa (metanol : ocetna kislina, 3:1). Nato smo resuspendirali sediment in dodali 3 kapljice formaldehyda ter 4 ml Karnojevega fiksativa. Vsebino centrifugirk smo premešali in jih 5 minut centrifugirali pri 600 obratov/minuto.

Odsesali smo supernatant, dodali 1 ml Karnojevega fiksativa, resuspendirali sediment ter nato dodali še 4 ml Karnojevega fiksativa. Vsebino centrifugirk smo premešali in jih 5 minut centrifugirali pri 600 obratov/minuto. Ta del postopka smo ponovili še enkrat.

Po zadnjem centrifugiranju smo odstranili čim več supernatanta in nato resuspendirali sediment. Na vsako od stekelc, ki so bila čez noč namočena v etru, smo dodali 15 μ l celične

suspencije ter nato preverili gostoto celic pod mikroskopom. Za vsak vzorec smo pripravili vsaj 3 preparate.

Zakodirane preparate smo prestavili v škatlo in jih do štetja shranili na sobni temperaturi. V tej fazi so preparati obstojni tudi več mesecev.

3.6.2.4 Barvanje in štetje mikrojeder

Preparate smo imeli med štetjem mikrojeder zakodirane. Celice smo barvali z akridin oranžem (AO) koncentracije 10 µg/ml.

Na vsakem preparatu smo prešteli 1000 dvojedrnh celic, ki smo jih nato razdelili v skupine:

- dvojedrne celice z enim mikrojedrom,
- dvojedrne celice z dvema in večimi mikrojedri,
- dvojedrne celice z nukleoplazmatskim mostičkom,
- dvojedrne celice z jedrnimi brsti,
- in dvojedrne celice z različnimi kombinacijami zgoraj navedenih.

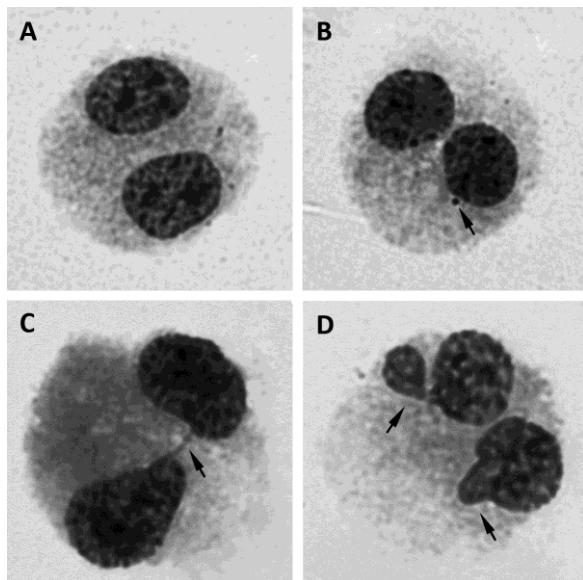
Poleg mikrojeder smo šteli tudi eno- (M1), dvo- (M2) in več-jedrne celice (M3) in na ta način določili delitveni indeks celic (NDI; iz ang. nuclear division index). Pri tem smo prešteli 500 celic. S pomočjo NDI smo določili ali preiskovana snov vpliva na delitveni cikel celic ali ne.

Pri štetju mikrojeder (MN) smo upoštevali naslednje:

- MN smo šteli le v dvojedrinih celicah,
- med posameznimi celicami je morala biti vidna meja med citoplazmami celic,
- obe jedri v dvojedrinih celicah sta morali biti približno enake velikosti,
- jedri v celici se naj ne bi prekrivali,
- jedri sta lahko bili povezani z nukleoplazmatskim mostičkom, vendar njegova dolžina ni smela biti večja od tretjine premera jedra,
- MN je moralo biti okrogle ali ovalne oblike, če je imelo oster rob ni bilo mikrojedro,
- barva MN je morala biti enaka ali temnejša od barve glavnih jeder, če je bila svetlejša je to verjetno samo del membrane, ki se je odcepil od jeder in ne vsebuje DNA,
- MN ni smelo biti povezano z jedrom,
- MN naj ne bi bilo oddaljeno od glavnih jeder več kot 2x premera glavnega jedra,
- če ima celica glavni jedri in veliko manjših jeder je verjetno apoptotska in tega nismo šteli kot mikrojedra,
- MN mora biti manjši kot $\frac{1}{4}$ glavnega jedra.

(povzeto po Fenech (1993) in 10G-Pos20-01, test mikrojeder, laboratorija GEN).

S pomočjo statističnega programa (Graph Pad Prism 5) smo izračunali enosmerno analizo variance ANOVA (Kruskal Wallis test). Za primerjavo median kontrolnih skupin in vzorcev izpostavljenih skupin smo uporabili Dunet test. Celoten poskus smo ponovili v dveh neodvisnih ponovitvah.



Slika 6: Primeri dvojedrne celice (slika A), dvojedrne celice z mikrojedrom (slika B), dvojedrne celice z nukleoplazmatskim mostičem (slika C) in dvojedrne celice z jedrnim brstom (slika D). Foto: dr. Bojana Žegura

3.7. Vpliv XN in kombinacije MeIQx s XN na izražanje izbranih genov pri celicah HepG2

3.7.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Kleppe in sod. so že leta 1971 objavili članek, v katerem opisujejo pomnoževanje specifične molekule DNA z DNA polimerazo. Ob koncu 80-ih let prejšnjega stoletja je postala ta metoda, zaradi svoje enostavnosti in uporabnosti, ena izmed osnovnih laboratorijskih tehnik v molekularni biologiji (Edwards in sod., 2004).

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, iz ang. polymerase chain reaction) je *in vitro* metoda, uporabna za sintezo nukleinskih kislin. Pri tej metodi se uporablja temperaturno obstojna DNA polimeraza, ki lahko v kratkem času pomnoži določen odsek DNA v velikem številu kopij (Poljak in sod., 1994). Zato je za analizo zadostna že relativno majhna količina vzorca, kar je bistvena prednost te metode pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije pri katerih potrebujemo večje količine vzorcev (Coleman in Tsongalis, 1997; Albert in sod., 1994). Metoda je uspešna, če vsebuje reakcijska mešanca: tarčno dvovijačno DNA, dva oligonukleotidna začetnika, encim DNA polimerazo, pufer z optimalnim pH in ionsko jakostjo (v okviru tega je najpomembnejša koncentracija Mg^{2+} , saj le-ta vpliva na encimsko aktivnost) ter deoksinukleotidtrifosfate vseh štirih baz (dNTP) (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Standarden PCR poteka v treh fazah, ki se ponavlja (Jakše, 2007; Jeršek, 2003):

- 1. faza: denaturacija dvostranske matrične DNA v dve enoverižni DNA pri 94–95 °C. Korak traja od 20 sekund do 1 minute.
- 2. faza: pripajanje oligonukleotidnih začetnikov na homologne sekvene vzorčne DNA. Po prileganju oligonukleotidnega začetnika je del DNA spet dvostran. Poteka pri 45–75 °C in traja 5–60 sekund.
- 3. faza: sinteza nove komplementarne verige DNA iz nukleotidov v smeri od 5' konca proti 3' koncu s pomočjo termostabilne DNA polimeraze pri 60–72 °C. Novi molekuli DNA sta med seboj komplementarni in sposobni vezave enakih začetnih oligonukleotidov. Z vsakim cikлом narašča število pomnoženih molekul DNA eksponentno. Podaljševanje traja od 30 sekund do več minut, kar je odvisno od dolžine pomnožka.

Celoten proces se ponovi od 20 do 40-krat (20–40 ciklov). V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. Število ciklov je odvisno od količine produkta, ki ga želimo (Jakše, 2007) in od začetne količine DNA v vzorcu (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Verižna reakcija s polimerazo ima tudi določene pomanjkljivosti, ki se kažejo predvsem v njeni ceni in v možnosti pojavljanja lažno pozitivnih in negativnih rezultatov. Omejitve klasične metode PCR so tudi v relativno nizki občutljivosti, saj je za analizo potrebno veliko izhodiščnega materiala, ki pa nam ni vedno na voljo. Zato so se razvile nove metode, ki so občutljivejše in pri katerih so potrebne manjše količine vzorcev, ki jih želimo analizirati (Valasek in Repa, 2005).

3.7.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Ta metoda je nadgradnja običajnega PCR (Klein, 2002). Poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih, podobno kot pri klasičnem PCR (Mackay, 2004). Merjenje količine produkta poteka v vsakem ciklu med samo reakcijo (Valasek in Repa, 2005; Mackay, 2004). Rezultat je fluorescentni signal, ki se meri v ciklih v katerih je podvojevanje linearno (Mackay, 2004; Richards in sod., 2004). Ker spremljamo potek reakcije v vsakem ciklu, lahko izmerimo količino pomnožka, ko je reakcija še v eksponentni fazi. To naredimo tako, da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, katera prikazuje intenziteto flourescence (ΔR_n) posameznih vzorcev v odvisnosti od števila ciklov. Krivulja je sestavljena iz treh faz: eksponentne, linearne in plato faze. V eksponentni fazi fluorescencija produkta preseže fluorescenco ozadja, s čimer določimo linijo pražne vrednosti (C_t vrednost). V tej fazi je pomnoževanje DNA optimalno in z vsakim naslednjim cikлом se v idealnih reakcijskih pogojih količina produkta podvoji. Linearni fazi sledi plato faza, kjer se intenziteta flourescentnega signala ne povečuje več, saj zaradi zmanjšane koncentracije nukleotidov pride do upočasnitve reakcije in akumulacije inhibitorjev. C_t vrednost je odvisna od začetne količine tarčne DNA, tipa in koncentracije fluorografa,

občutljivosti in sposobnosti sistema, da razloči med specifičnim flourescentnim signalom in flourescentnim signalom ozadja (Mackay, 2004). PCR v realnem času je izjemno občutljiv, saj lahko zazna manj kot 5 kopij tarčne sekvene. Omogoča tudi kvantificiranje nukleinskih kislin v izjemno širokem dinamičnem razponu (vsaj 5 logaritemskih enot), kar je uporabno predvsem takrat, ko delamo z omejeno količino vzorca v katerem je manjša začetna količina DNA (Dhar in sod., 2008).

Za pomnoževanje specifičnih delov DNA se najpogosteje uporablja DNA-polimeraza *Taq* (iz organizma *Thermus aquaticus*) ali DNA-polimeraze *Pfu* (iz organizma *Pyrococcus furiosus*). Obe polimerazi sta odporni na visoke temperature. Odpornost na visoke temperature je zelo pomembna lastnost, saj se le-te uporabljo za denaturacijo dvojerižne DNA po vsakem ciklu pomnoževanja DNA. Denaturaciji sledi vezava začetnih oligonukleotidov na nove enoverižne matrice DNA. DNA-polimeraza ustvarja novo verigo, z dodajanjem posameznih komplementarnih nukleotidov. Nova veriga se spet uporabi pri naslednjem ciklu pomnoževanja.

Spremljanje pomnoževanja DNA je mogoče s sondami, oligonukleotidnimi začetniki ali pomnožki označenimi s fluorescentnimi molekulami (Mackay in sod., 2002). Te molekule povzročijo spremembo signala, ki je odvisen od količine pomnožka med vsakim ciklom in se poveča, če se poveča količina specifičnega pomnožka (Mackay, 2004). Za določanje pomnožkov lahko uporabljam specifične ali nespecifične metode (Mackay in sod., 2002; Bel in Ranford-Cartwright, 2002). Pri nespecifičnih metodah se uporablja flourescentna barvila (npr. SYBR Green I), ki se vgradijo v dvojerižno molekulo DNA nespecifično in pri tem oddajo flourescenco. Na ta način zaznamo vse dvojne vijačnice, zaradi česar je tudi večja verjetnost lažnih pozitivnih rezultatov (Giulietti in sod., 2001), saj flourescirajo tudi nespecifični produkti in dimeri začetnikov. S specifičnimi metodami pa pride do specifične vezave oligonukleotidnih sond označenih s fluorofori na odsekih, ki jih pomnožujemo. Ta sonda se veže na odsek tarčne DNA med obema oligonukleotidnima začetnikoma (Hein in sod., 2006).

Kljub številnim prednostim ima ta metoda tudi nekaj slabosti. Je relativno draga, predvsem zaradi inštrumentov in kemikalij, ki jih potrebujemo za izvedbo. Zelo pomembna je tudi primerena izbira sond, začetnih oligonukleotidov in ostalih reagentov. Reakcije lahko inhibirajo tudi snovi, ki so prisotne v določenih bioloških vzorcih, čemur se lahko izognemo z uporabo odporne DNA-polimeraze (npr. Tfl, Pwo, Tth...) (Valasek in Repa, 2005). PCR v realnem času je uporabna metoda na vseh področjih, kjer je potrebna kvantifikacija nukleinskih kislin. V medicini se uporablja pri diagnostiki patogenov, ki jih je težko ali nemogoče gojiti, pri spremjanju uspešnosti zdravljenja, napovedovanju poteka bolezni, prognozi in ugotavljanju rezistence na zdravila. Pomembna je tudi pri diagnostiki malignih obolenj, saj omogoča ugotavljanje sprememb v številu kopij genov, izražanju genov, translokacije, inverzije in tudi točkaste mutacije. Uporablja se tudi v prehrambeni industriji, in

sicer za zaznavanje mikrobov, parazitov ali gensko spremenjenih organizmov (Valasek in Repa, 2005; Arko, 2004; Lovatt, 2002; Klein, 2002; Brodman in sod., 2002).

3.7.2.1 Obratno prepisovanje ali reverzna transkripcija

Ena izmed glavnih omejitev metode PCR, kot tudi PCR v realnem času, je uporaba DNA kot matrice za pomnoževanje, saj DNA-polimeraze ne podvojujejo RNA. Z uporabo encima reverzna transkriptaza je ta pomanjkljivost odpravljena. Ta encim je od RNA odvisna polimeraza, ki prepiše enoverižno RNA v stabilnejšo, komplementarno enoverižno cDNA, ki jo nato kot matrico uporabimo v reakciji PCR. Reverzna transkriptaza ima DNA-polimerazno in ribonukleazno aktivnost, saj ne le, da prepiše RNA v cDNA ampak tudi omogoči razgradnjo RNA molekule. Obratno prepisovanje lahko poteka z naključnimi začetnimi oligonukleotidi, oligo (dT) začetniki ali gensko specifičnimi oligonukleotidi (Valasek in Repa, 2005). Več kot je želene RNA v izhodnem vzorcu več bo prepisane cDNA in s tem bo tudi signal, ki ga odda hibridizacijska sonda večji (Nolan in sod., 2006).

PCR v realnem času, združen z obratnim prepisovanjem, se imenuje RT-PCR in je trenutno najobčutljivejša tehnika za detekcijo in kvantifikacijo mRNA (Valasek in Repa, 2005). Razvoj novih sond in opreme, ki omogočajo detekcijo PCR produktov realnem času je pripeljal do sprejetja te metode v namen kvantificiranja sprememb izražanja genov. RT-PCR v realnem času je postala preferenčna metoda za vrednotenje rezultatov, pridobljenih na podlagi analize mrež in drugih tehnik, ki ocenjujejo spremembe izražanja genov na globalni ravni (Prediger in sod., 2008).

3.7.2.2 Izražanje genov z verižno reakcijo pomnoževanja v realnem času

Je relativno občutljiva tehnika, ki omogoča določevanje nizkega nivoja izražanja genov. Temelji na prepisu mRNA v cDNA s pomočjo reverzne transkriptaze, na pomnoževanju tarčne cDNA, zaznavanju in kvantifikaciji pomnoženega produkta s pomočjo fluorescenčnih označevalcev (Fennell in Baker, 2005; Espy in sod., 2006). Pri pomnoževanju tarčne cDNA se poleg začetnih oligonukleotidov veže tudi fluorescenčno označena sonda (Taqman sonda), ki se specifično prilega na zaporedje med obema začetnima oligonukleotidoma. Sonda je kratko zaporedje DNA, ki ima na 5' koncu vezano reportersko fluorescentno barvilo in na 3' koncu dušilec fluorescence, kateri v nerazgrajeni sondi absorbira fluorescenco reporterskega barvila. Med pomnoževanjem DNA polimeraza s svojo eksonukleazno aktivnostjo odcepi sondu. S tem pride do sprostitev obeh barvil, ki sta sedaj ločeni, zaradi česar je onemogočeno dušenje emisijskega spektra, ki ga oddaja reportersko barvilo. Med pomnoževanjem cDNA pride do naraščanja florescence, ki je sorazmerno s količino odcepljenih sond in nastalega produkta (povzeto po Valasek in Repa, 2005).

3.7.3 Nasajanje in izpostavitev celic HepG2 testiranim snovem.

Celice HepG2 smo gojili in presajali po postopku, ki smo ga opisali v poglavju 3.4.2. Za test, v katerem smo ugotavljali izražanje genov, smo celice nasadili na plošče T-25 z gostoto 800.000 celic/ploščo. Sledila je 24-urna inkubacija, na 37 °C, 5 % CO₂ in v vlažni atmosferi.

Naslednji dan smo odstranili medij in celice sprali z 1 x PBS. Nato smo celice izpostavili XN (0.01, 0.1, 1 in 10 µM) ter kombinaciji MeIQx (250 µM) s XN (0, 0.01, 0.1, 1, 10 µM). V test smo vključili tudi kontrolo gojišča (pri čemer smo celicam zamenjali gojišče), kontrolo topila (0,1% DMSO) in pozitivno kontrolo benzo(a)pirena (30 µM). Plošče s celicami smo čez noč inkubirali na 37 °C, 5 % CO₂ in v vlažni atmosferi.

3.7.4 Izolacija mRNA

3.7.4.1 Separacija in precipitacija

Po 24-urni izpostavitvi celic vzorcem smo celice dvakrat sprali z 1x PBS in nato dodali 1.5 ml TRIZOL reagenta (GibcoBRL Life Technologies), ki je monofazična raztopina fenola in gvanidin izotiocianata. TRIZOL omogoči izolacijo celokupne RNA iz celičnih kultur, saj razbije celice, razgradi celične komponente in povzroči popoln razpad nukleoproteinskih kompeksov, pri vsem tem pa ostane RNA intaktna.

Ko so se vse celice odlepile od podlage, smo celice s TRIzol reagentom razdelili v dve epici, v vsako po 750 µl. V vsako epico smo dodali 150 µl kloroform, s katerim smo ločili organsko in vodno fazo, v kateri je raztopljeni RNA. Nato smo dodali 8 µl (2mg/ml) glikogena, ki se veže na RNA in močno premešali vsebino epic. Zatem smo 15 minut centrifugirali pri 4 °C in 12000g. Po centrifugiranju smo dobili tri plasti, spodnjo fenol - kloroformno z raztopljeni DNA in preostalimi nečistočami, srednjo plast, v kateri so beljakovine in lipidi ter zgornjo vodno plast, v kateri je raztopljeni RNA.

Zgornjo vodno fazo smo prenesli v nove epice in dodali 375 µl izopropilalkohola, ki povzroči precipitacijo RNA in nastanek oborine. Epice smo premešali in jih čez noč zamrznili na -20 °C.

3.7.4.2 Spiranje in raztplavljanje

Naslednji dan smo vzorce odmrznili in jih za 10 minut centrifugirali pri 4 °C in 12000g. Supernatant smo zavrgli, sediment pa sprali s 750 µl 75 % EtOH, ki smo ga pripravili z DEPC (iz ang. diethylpyrocarbonate) vodo. Sediment smo z mešanjem odlepil od stene epic in nato 5 minut centrifugirali pri 4 °C in 7500g. Postopek smo ponovili dvakrat.

Po zadnjem centrifugiraju smo odstranili čim več supernatanta in sediment posušili na zraku. Ko se je RNA posušila, smo dodali 10 µl DEPC vode, v kateri smo raztopili RNA in nato vzorce postavili na led.

3.7.4.3 Merjenje mRNA

Vzorce v epicah smo prenesli v termoblok in jih 10 minut segrevali na 55–60 °C. Pri tej temperaturi se RNA boljše razaplja. Nato smo obe epici istega vzorca združili. Količino RNA smo merili v 1 µl vzorca in za ta nemen uporabili aparaturo nanodrop. Po meritvah smo z DEPC vodo uravnali koncentracije vseh vzorcev na 1000 ng/ml in vzorce zamrznili na -80 °C.

3.7.5 Reverzna transkripcija (prepis mRNA v cDNA)

Izolirano mRNA smo z encimom reverzna transkriptaza v postopku verižne reakcije s polimerazo obratno prepisali v cDNA. Naključni začetni oligonukleotidi se naključno vežejo na več mestih na RNA in omogočijo pomnoževanje vseh v vzorcu prisotnih RNA molekul.

Tabela 2: Priprava raztopine za reverzno transkripcijo

Reakcijska zmes	10x RT pufer	25x raztopina dNTP-jev	10x začetni oligonukleotidi	Reverzna transkriptaza (50U/µl)	Rnazni inhibitor (20U/µl)	Voda brez RNaz
1 vzorec skupaj 25 µl	5 µl	2 µl	5 µl	2,5 µl	2,5 µl	8 µl
8 vzorcev (+1) skupaj 225 µl	45 µl	18 µl	45 µl	22,5 µl	22,5 µl	72 µl

V vsaki PCR-mikrocentrifugirki smo pripravili 25 µl raztopine za reverzno transkripcijo. Temu smo dodali 1 µl izolirane mRNA, dobro premešali ter centrifugirali. Nato smo PCR-mikrocentrifugirke prestavili v ciklični termostat in izvedli PCR. Po končanem postopku smo prepisane vzorce do nadaljnje uporabe shranili na -20 °C.

Prepis RNA v cDNA poteka v štirih stopnjah:

- na molekuli RNA se z encimom reverzna transkriptaza sintentizira veriga DNA, pri čemer nastane hibridna dvovijačna RNA/DNA,
- encim reverzna transkriptaza ima aktivnost RNase H, ki po prepisu RNA v DNA razgradi RNA verigo,

- na predhodni molekuli DNA se sintetizira komplementarna veriga DNA, s čimer nastane dvovijačna cDNA (dsDNA, iz ang. double stranded DNA),
- nastala dsDNA je kopija RNA molekule, ki se nato pomnoži z metodo PCR (Singleton in Sainsbury, 2001).

3.7.6 Preamplifikacija genov z nizkim izražanjem

Preamplifikacijo smo izvedli le za določanje izražanja gena *SULT1A1*, saj imajo celice HepG2 zelo nizko bazalno izražanje tega gena. V ta namen smo uporabili preamplifikacijski kit, ki se uporablja za povečanje količine specifične tarčne cDNA za analizo izražanja genov.

V epico smo dodali 13.5 µl DEPC vode in 1.5 µl *SULT/GAPDH* primera. Nato smo 10 µl te redčine prenesli v 90 µl TE, s čimer smo dobili 0.2x ekspresijski sistem h kateremu smo dodali reakcijske zmesi kot je opisano v tabeli 3.

Tabela 3: Priprava raztopine za preamplifikacijo genov

Reakcijska zmes	PreAmp mix 2x	Kombinacija ekspresijskih sistemov (0,2 x vsak)	Voda brez RNaze
Vsota za en vzorec	12.5 µl	6.25 µl	5.25 µl
Vsota za 9 vzorcev	112.5 µl	56.25 µl	47.25 µl

Nato smo prenesli 24 µl pripravljene raztopine v PCR mikrocentrifugirke in dodali 1 µl cDNA vzorca.

Klasični PCR je potekal na cikličnem termostatu po naslednjem programu:

- začetna denaturacija: 10 minut pri 95 °C,
- pomnoževanje: 14 ciklov 95 °C, 15 sekund 60 °C,
- hlajenje: neskončno pri 4 °C.

Produkte preampifikacije smo do uporabe shranili na -20 °C.

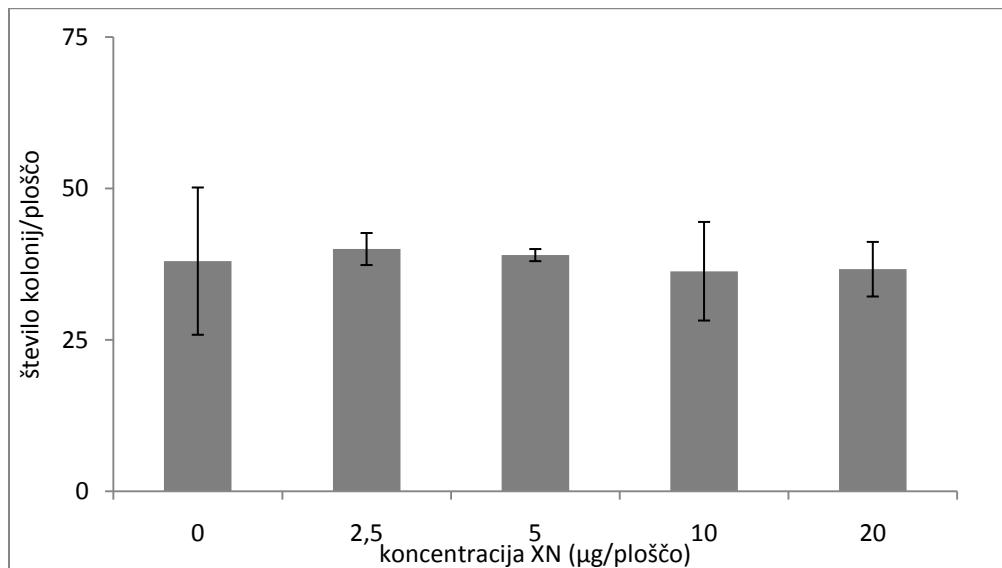
4 REZULTATI

4.1 Mutageno in antimutageno delovanje XN na bakteriji *Salmonella typhimurium* TA98

4.1.1 Amesov test

V prvem delu diplomske naloge smo želeli najprej preveriti ali XN povzroča mutacije pri bakteriji *S. typhimurium* sev TA98, predvsem nas je zanimalo ali deluje antimutageno v kombinaciji s heterocikličnim aminom MeIQx.

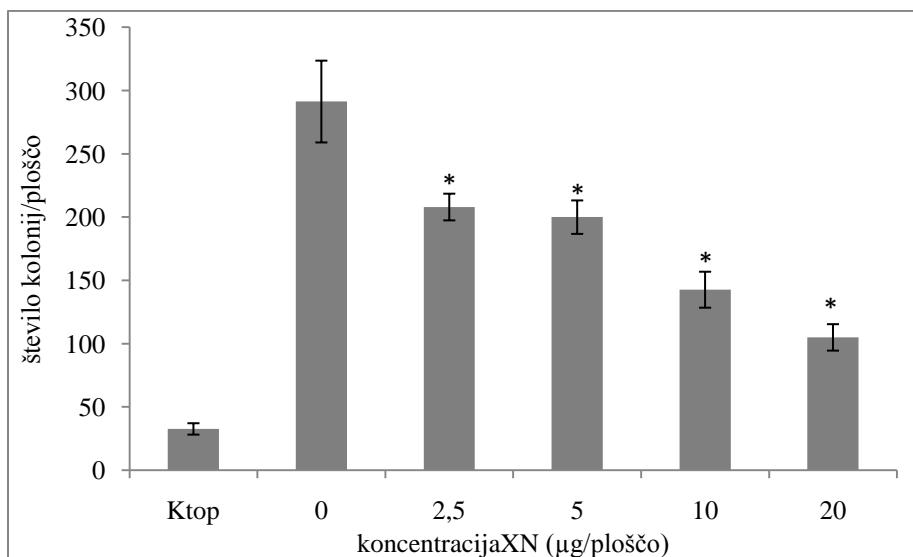
Bakterije *S. typhimurium* sev TA98 smo izpostavili različnim koncentracijam XN (0, 2,5, 5, 10 in 20 µg/ploščo) in na ta način ugotavljali njegovo potencialno mutageno delovanje. Rezultati so pokazali, da XN sam po sebi ne poviša števila revertant, kar pomeni, da ne povzroča mutacij -1 premika bralnega okvirja (delecije) pri bakteriji *S. typhimurium* sev TA98 (Slika 7).



Slika 7: Število kolonij *S. typhimurium* seva TA98 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam XN

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 smo izpostavili različnim koncentracijam XN (0, 2,5, 5, 10, 20 µg/ploščo). Rezultati so prikazani kot povprečno število kolonij zraslih na treh ploščah (\pm SD).

Nadalje smo proučevali antimutageno delovanje XN v kombinaciji z MeIQx. XN je statistično značilno znižal število z MeIQx induciranih revertant v odvisnosti od doze. Najvišja uporabljená koncentracija XN (20 µg/ploščo) je znižala število z MeIQx induciranih revertant za približno 64 % (Slika 8).



Slika 8: Število kolonij *S. typhimurium* seva TA98 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene MeIQx v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN

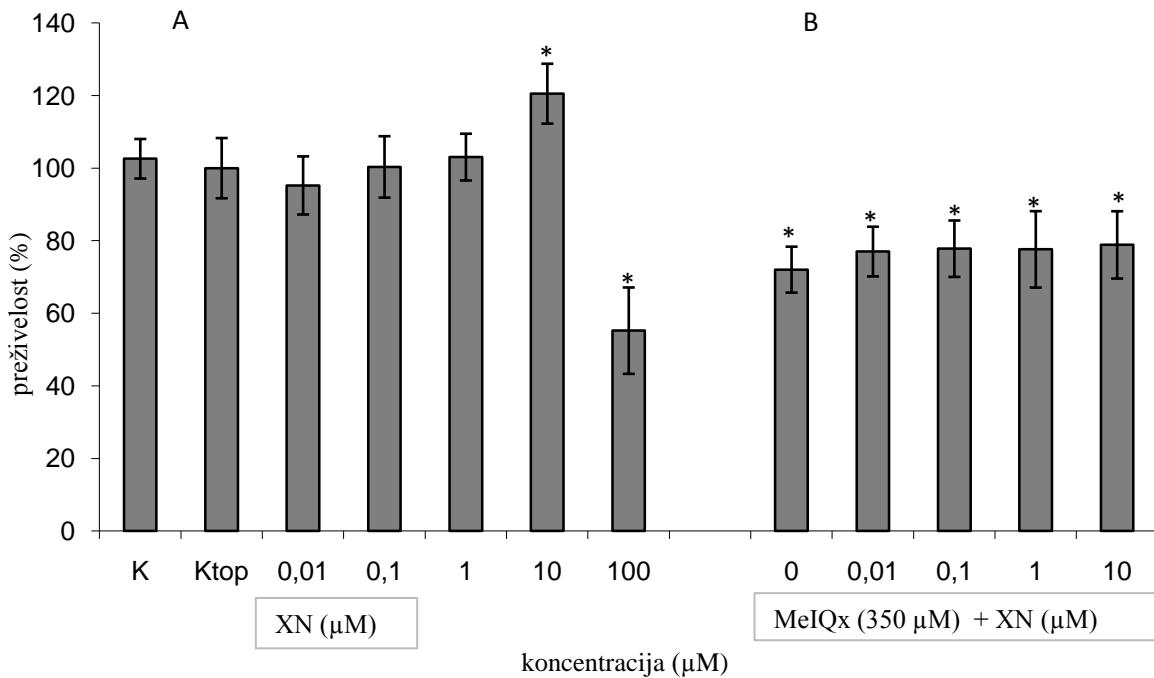
Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 smo izpostavili MeIQx (8.536 ng/ploščo; na grafu označeno kot 0) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (2.5, 5, 10 in 20 $\mu\text{g}/\text{ploščo}$). Rezultati so prikazani kot povprečno število kolonij zraslih na treh ploščah ($\pm\text{SD}$). * predstavlja statistično značilno razliko glede na skupino bakterij izpostavljenih MeIQx (Studentov t-test, $p<0.05$). Ktop= kontrola topila.

4.2 Genotoksično in antigenotoksično delovanje XN na modelu sesalčjih celic humanega hepatoma

V drugem delu diplomske naloge smo ugotavljali genotoksično delovanje XN in njegovo antigenotoksično delovanje v kombinaciji z MeIQx na modelu celične linije humanega hepatoma (HepG2 celice).

4.2.1 Test MTT

Najprej smo preverili ali XN zniža preživetje celic HepG2 po 24-urni izpostavitvi in nato ugotavljali ali vpliva na preživetje celic v kombinaciji z MeIQx. To smo ugotavljali s testom MTT.



Slika 9: Preživelost celic glede na kontrolno skupino (%)

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam A) XN (0.01, 0.1, 1, 10 in 100 μM) in B) MeIQx (350 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0.01, 0.1, 1, 10 μM). Rezultate smo podali kot odstotek živih celic glede na kontrolo topila ±SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolo topila (Studentov t-test, $p < 0.05$). K=kontrola, Ktop=kontrola topila.

Po 24-urah izpostavite celic XN (0.01, 0.1, 1, 10 μM) nismo opazili zmanjšane preživelosti celic v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je najvišja testirana koncentracija (100 μM) znižala preživetje celic za 50 %. MeIQx (350 μM) je zmanjšal preživelost celic za približno 35 % (Slika 9).

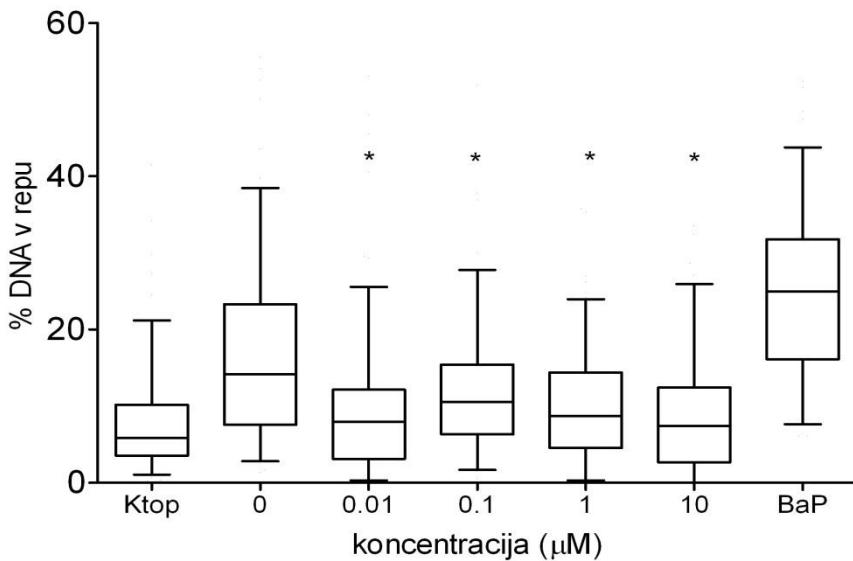
Nadalje smo želeli preveriti ali XN vpliva na citotoksično delovanje samega MeIQx, vendar so rezultati pokazali, da ni bilo razlike med delovanjem samega MeIQx in kombinacije s XN (0.01, 0.1, 1 in 10 μM) (Slika 9).

V nadaljnjih poskusih smo uporabljali koncentracije XN: 0.01, 0.1, 1, 10 μM, ker le-te niso statistično značilno vplivale na preživelost celic.

4.2.2 Antigenotoksično delovanje XN proti poškodbam DNA povzročenih z MeIQx

Za določanje antigenotoksičnega učinka XN zoper MeIQx na celicah HepG2 smo uporabili test komet in test mikrojeder.

4.2.2.1 Test komet



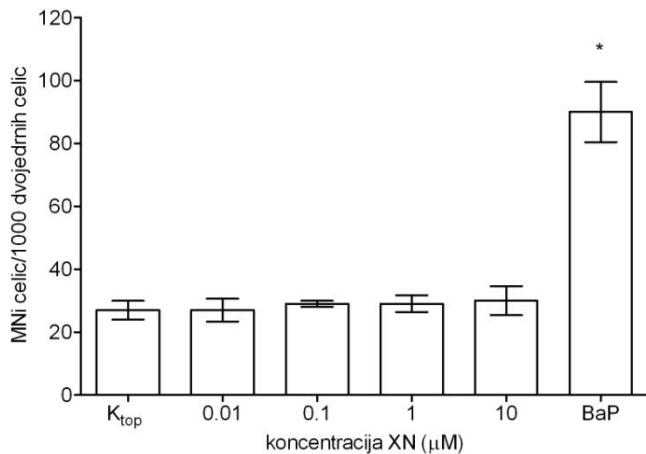
Slika 10: Antigenotoksično delovanje XN zoper heterociklični amin MeIQx

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili MeIQx (250 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi ter tretji in četrti interkvartilni razmik. Črta, ki razmejuje boks je mediana. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil. *statistično značilna razlika glede na skupino celic izpostavljenih le MeIQx (Kruskal Wallis test, $p<0.05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

Rezultati so pokazali, da je pri poskusih, v katerih smo celice izpostavili MeIQx v kombinaciji s XN (0.01, 0.1, 1, 10 μM), prišlo do statistično značilnega zmanjšanja količine poškodb glede na skupino celic, ki so bile izpostavljene le MeIQx. Zmanjšanje količine DNA poškodb ni bilo odvisno od koncentracije XN (Slika 10).

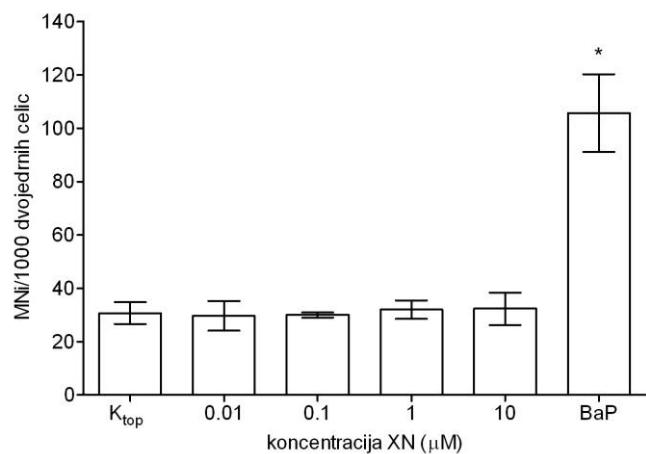
4.2.3 Test mikrojeder

Najprej smo preverili ali XN (0.01, 0.1, 1, 10 μM) poviša nastanek mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov in jedrnih brstov v celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi.



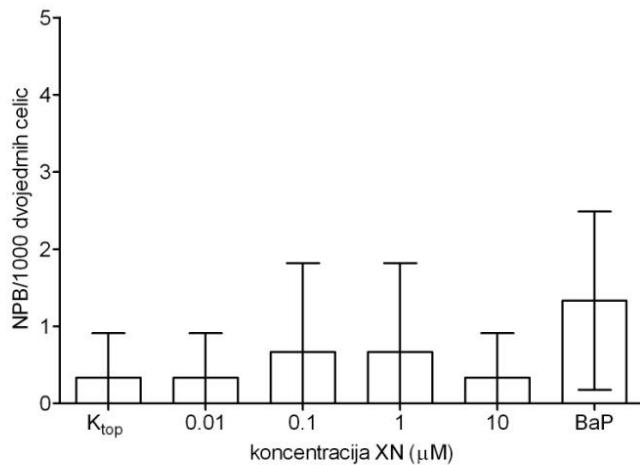
Slika 11: Število celic z mikrojedri/1000 dvojedrinskih celic, ki so bile izpostavljene XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot število celic z mikrojedri (enim ali več) na vzorcu 1000 preštetih dvojedrinskih celic $\pm\text{SD}$. *statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Kruskal Wallis test, $p<0.05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



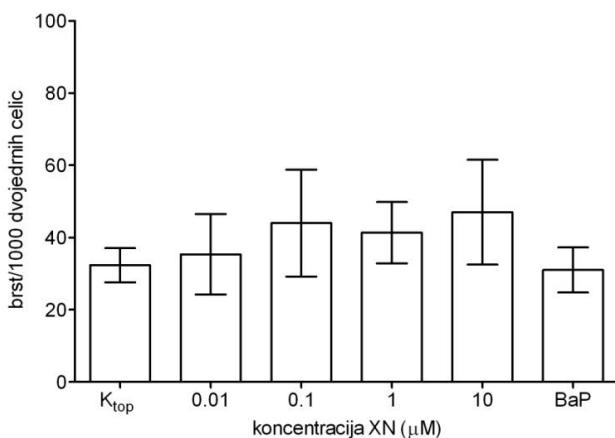
Slika 12: Števili mikrojeder/1000 dvojedrinskih celic, ki so bile izpostavljene XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot število mikrojeder na vzorcu 1000 preštetih dvojedrinskih celic $\pm\text{SD}$. *statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Kruskal Wallis test, $p<0.05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



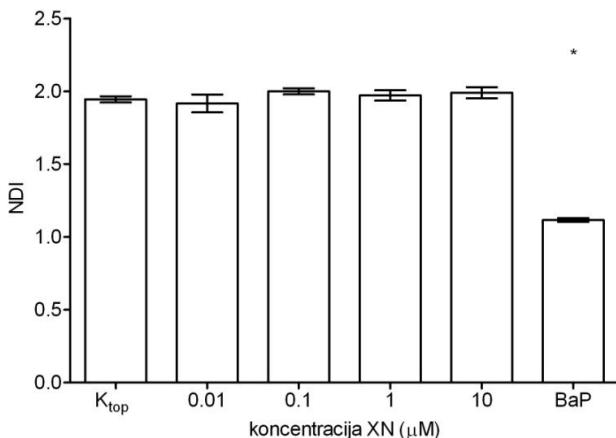
Slika 13: Število celic z nukleoplazmatskimi mostiči/1000 dvojedrnih celic, ki so bile izpostavljene XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot število celic z nukleoplazmatskimi mostiči na vzorcu 1000 preštetih dvojedrnih celic ±SD. K_{top}=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



Slika 14: Število celic z jedrnimi brsti/1000 dvojedrnih celic, ki so bile izpostavljene XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot število celic z jedrnimi brsti na vzorcu 1000 preštetih dvojedrnih celic ±SD. K_{top}=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

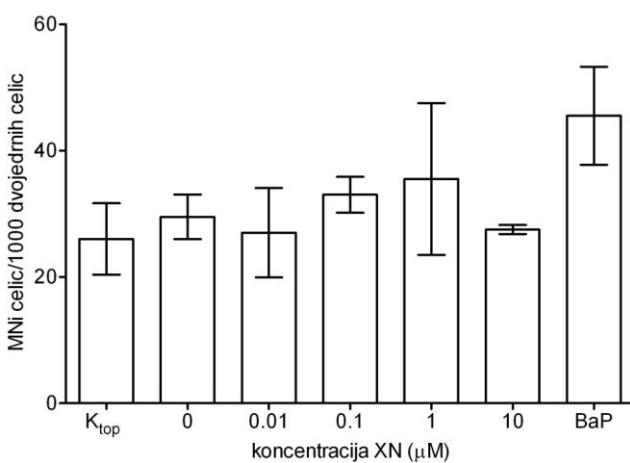


Slika 15: Delitveni indeks celic (NDI), ki so bile izpostavljene XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). NDI smo izračunali po formuli: $\text{NDI} = (\text{M}_1 + 2 \cdot \text{M}_2 + 3 \cdot \text{M}_3)/\text{N}$. Rezultati so prikazani kot povprečje vrednosti $\pm \text{SD}$. *statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Kruskal Wallis test, $p < 0.05$). $K_{\text{top}} = \text{kontrola topila}$, BaP = benzo[a]piren.

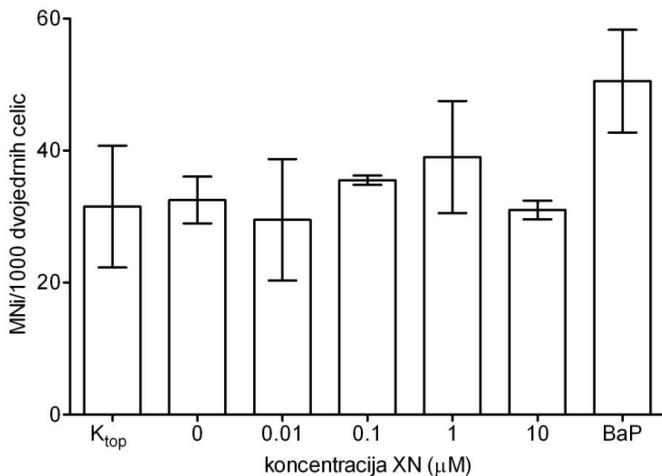
Rezultati so pokazali, da XN pri nobeni testirani koncentraciji ni povišal nastanka mikrojeder (Sliki 11 in 12), nukleoplazmatskih mostičkov (Slika 13) kot tudi ne jedrnih brstov (Slika 14). Prav tako nismo opazili vpliva na delitev celic, saj se NDI celic, ki so bile izpostavljene XN, ni značilno razlikoval od NDI kontrolnih celic (Slika 15).

Nato smo celice HepG2 izpostavili MeIQx v kombinaciji s XN in preverjali ali XN zmanjša število mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov in jedrnih brstov po 24-urni izpostavitvi.



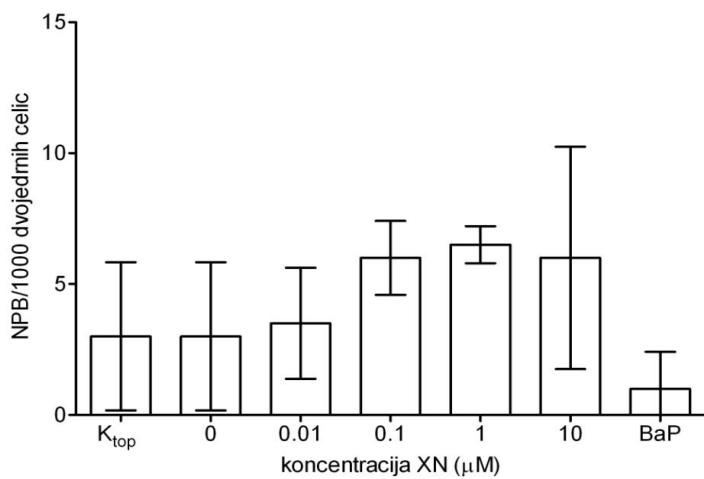
Slika 16: Število celic z mikrojedri/1000 dvojedrinih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili MeIQx (250 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot število celic z mikrojedri (enim ali več) na vzorcu 1000 preštetih dvojedrnih celic $\pm\text{SD}$. Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



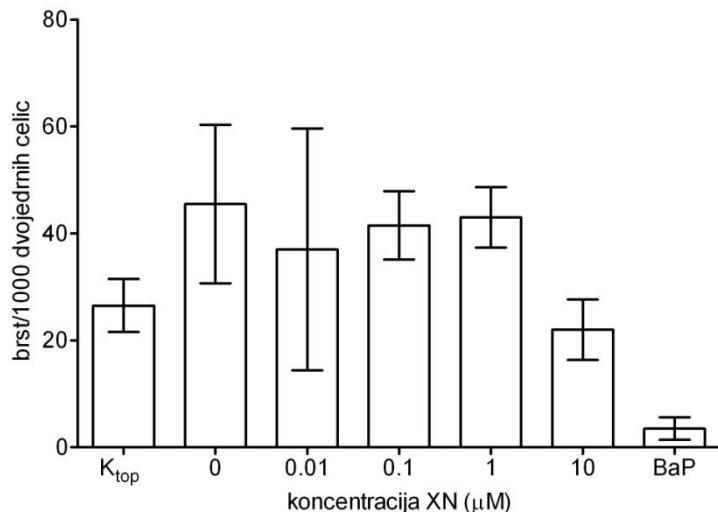
Slika 17: Število mikrojeder/1000 dvojedrnih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili delovanju MeIQx (250 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot seštevek vseh mikrojedr na vzorcu 1000 preštetih dvojedrnih celic $\pm\text{SD}$. Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



Slika 18: Število celic z nukleoplazmatskimi mostiči/1000 dvojedrnih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN

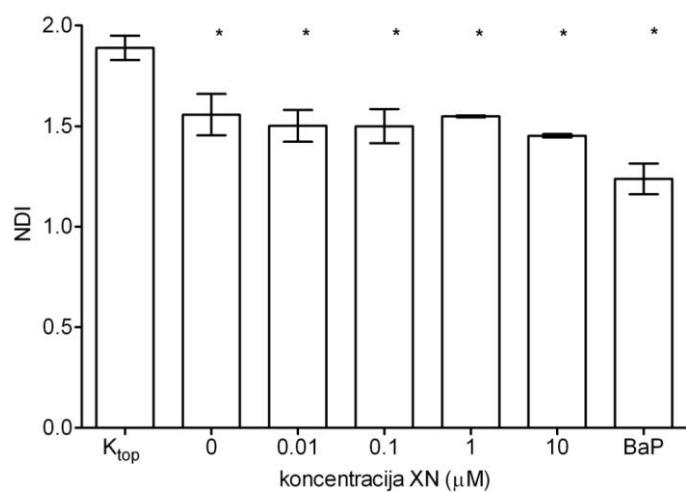
HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili MeIQx (250 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot število celic z nukleoplazmatskimi mostiči na vzorcu 1000 preštetih dvojedrnih celic $\pm\text{SD}$. Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



Slika 19: Število celic z jedrnimi brsti/1000 dvojedrnih celic, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN

HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili delovanju MeIQx (250 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 μM). Rezultati so podani kot število celic z brsti (ne glede na njihovo število v posamezni celici) na vzorcu 1000 preštetih dvojedrnih celic $\pm\text{SD}$. $\text{K}_{\text{top}}=\text{kontrola topila}$, $\text{BaP}=\text{benzo[a]piren}$.

Ugotovili smo, da sam MeIQx ni povišal števila mikrojeder v celicah HepG2, zaradi česar nismo zaznali razlike med celicami, ki smo jih izpostavili le MeIQx in celicami, katere so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN (Slike 16-19). Zato s testom mikrojeder nismo mogli ovrednotiti antigenotoksičnega potenciala XN.



Slika 20: Delitveni indeks celic (NDI), ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN

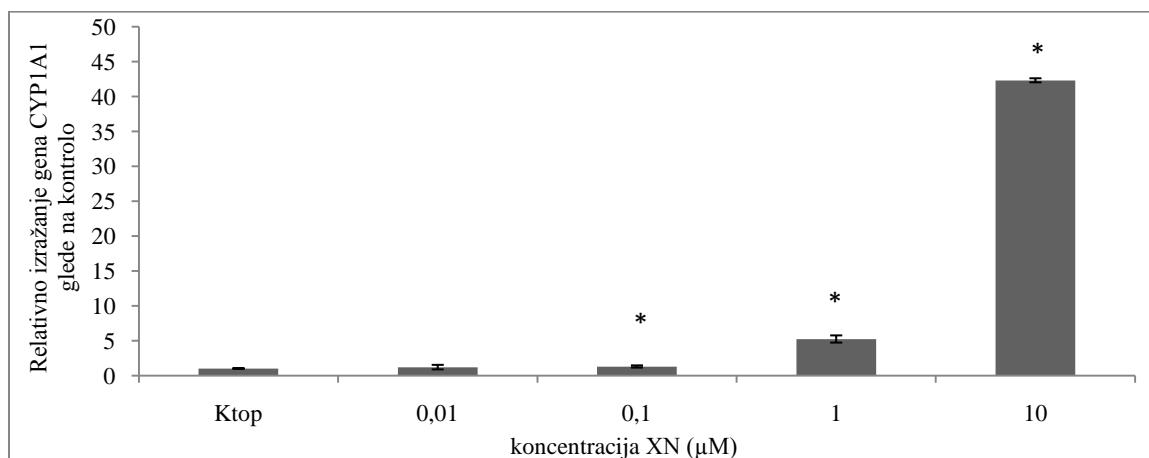
HepG2 celice smo za 24 ur izpostavili MeIQx (250 µM) v kombinaciji z različnim koncentracijami XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 µM). NDI smo izračunali po formuli: $NDI = (M1+2*M2+3*M3)/N$. Rezultati so prikazani kot povprečje vrednosti $\pm SD$. *statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Kruskal Wallis test, $p<0.05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

Rezultati poskusov v katerih smo celice izpostavili MeIQx samemu ali v kombinaciji s XN (0.01, 0.1, 1 in 10 µM) so pokazali, da je prišlo pri vseh skupinah celic, ki so bile izpostavljene našim vzorcem, do statistično značilnega znižanja delitve celic glede na kontrolo topila, kar odraža delitveni indeks. Na znižanje delitvenega indeksa celic prisotnost XN ni vplivala (Slika 20).

4.3 Kvantitativni PCR

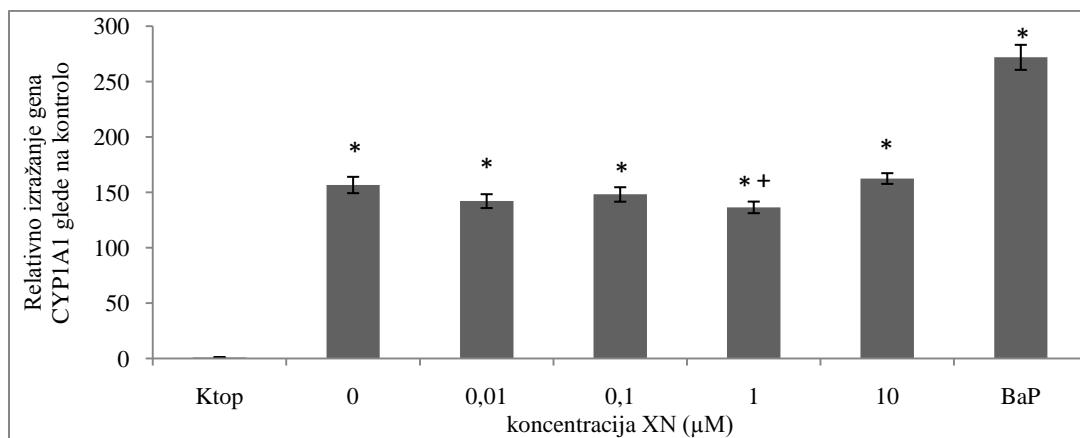
V diplomski nalogi nas je zanimalo ali vpliva XN na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v aktivacijo in detoksifikacijo ksenobiotikov. Za vsak izbran gen smo najprej preverili, kako se spremeni njegovo izražanje zaradi vpliva XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 µM), nato pa še njegovo izražanje zaradi vpliva kombinacije MeIQx (250 µM) in XN (0, 0.01, 0.1, 1 in 10 µM).

4.3.1 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQx na izražanje gena *CYP1A1*



Slika 21: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena *CYP1A1*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju XN (0.01, 0.1, 1, 10 µM). Rezultati so podani kot relativno izražanje glede na kontrolo $\pm SD$. * statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Student t-test, $p<0.05$). BaP je povišal izražanje tega gena za 361x glede na kontrolo, vendar le-tega zaradi boljše preglednosti Slike 21 nismo prikazali. Ktop=kontrola topila.

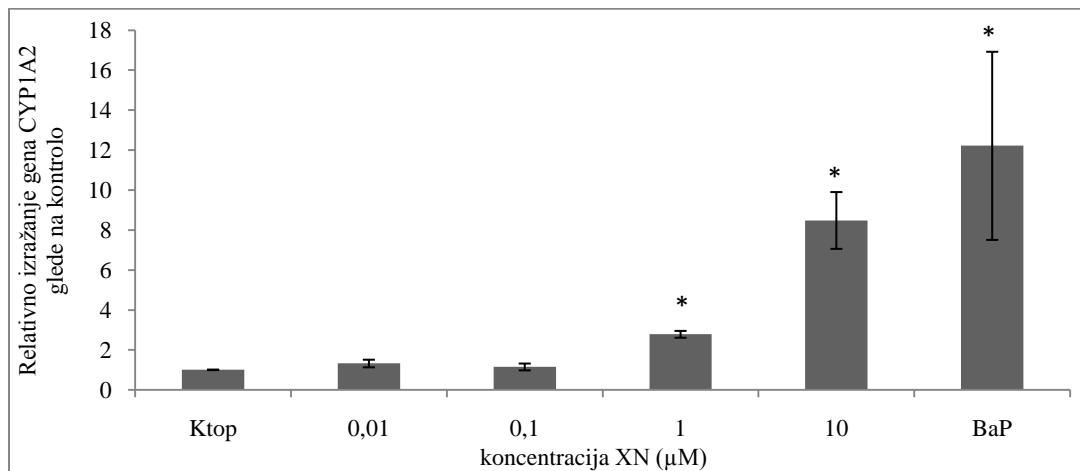


Slika 22: Vpliv kombinacije MeIQx z različnimi koncentracijami XN na izražanje gena *CYP1A1*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju MeIQx (250 μ M) v kombinaciji s XN (0, 0,01, 0,1, 1, 10 μ M). Rezultati so podani kot relativno izražanje gena CYP1A1 glede na kontrolo \pm SD. * statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Student t-test, $p<0,05$), + statistično značilna razlika glede na MeIQx (Student t-test, $p<0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

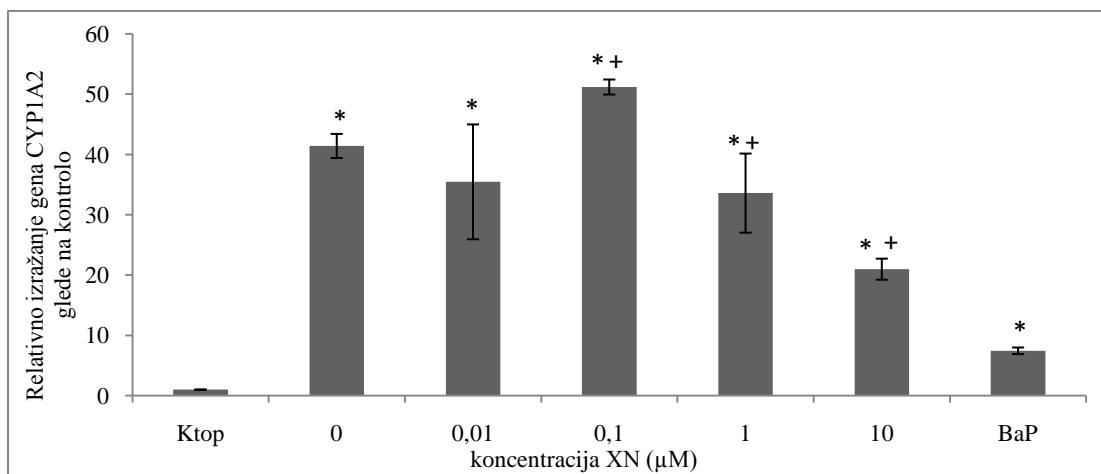
Iz Slike 21 je razvidno, da je XN (0,1, 1 in 10 μ M) statistično značilno povišal izražanje gena *CYP1A1* v primerjavi s kontrolno skupino. Pri najvišji testirani koncentraciji (10 μ M) je bilo izražanje gena približno 42-krat povisano v primerjavi s kontrolno skupino. XN v kombinaciji s heterocikličnim aminom MeIQx ni značilno spremenil izražanja gena *CYP1A1* glede na sam MeIQx. Pri koncentraciji 1 μ M lahko opazimo statistično značilno znižano izražanje tega gena, vendar pa razlika verjetno ni biološko pomembna (Slika 22).

4.3.2 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena *CYP1A2*



Slika 23: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena *CYP1A2*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju XN (0,01, 0,1, 1, 10 μ M). Rezultati so podani kot relativno izražanje glede na kontrolo \pm SD. * statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Student t-test, $p<0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

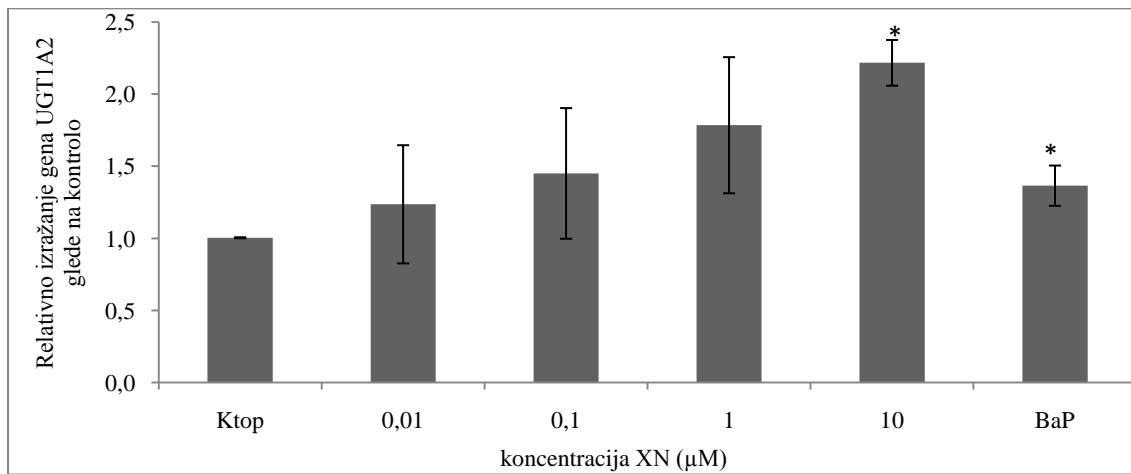


Slika 24: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena *CYP1A2*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju MeIQx ($250 \mu\text{M}$) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0,01, 0,1, 1, 10 μM). Rezultati so podani kot relativno izražanje gena *CYP1A2* glede na kontrolo \pm SD. * statistično značilna razlika glede na kontrolno topila (Student t-test, $p < 0,05$), + statistično značilna razlika glede na MeIQx (Student t-test, $p < 0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

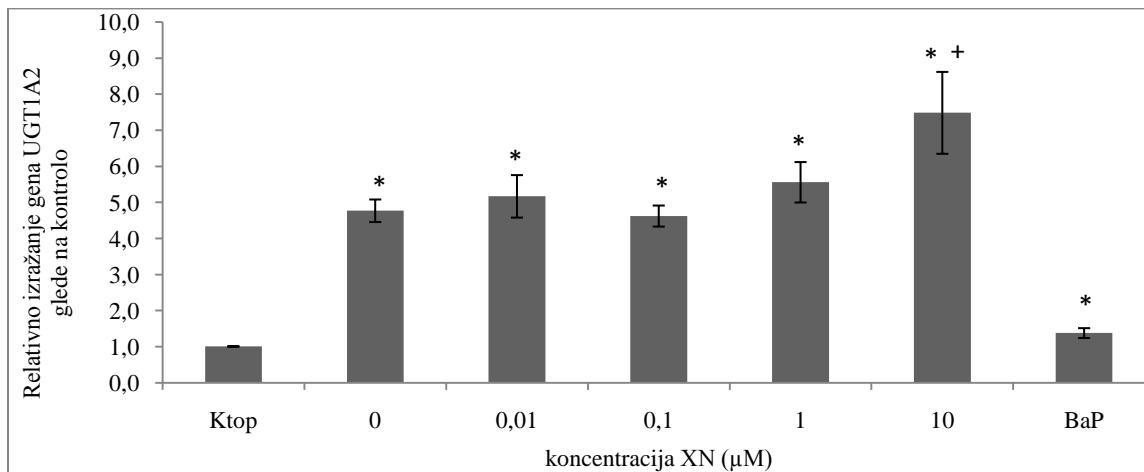
Iz Slike 23 je razvidno, da je XN (1 in 10 μM) statistično značilno povišal izražanje gena *CYP1A2* v primerjavi s kontrolno skupino. Pri najvišji testirani koncentraciji (10 μM) je bilo v primerjavi s kontrolno skupino izražanje tega gena povisano za približno 8.5-krat. V kombinaciji s heterocikličnim aminom MeIQx lahko opazimo, da sta koncentraciji 1 in 10 μM XN v odvisnosti od doze statistično značilno znižali izražanja gena *CYP1A2* glede na izražanje tega gena zaradi delovanja MeIQx. Pri koncentraciji 0,1 μM XN smo zaznali statistično značilno povišanje gena *CYP1A2* glede na MeIQx. Najnižja testirana koncentracija XN (0,01 μM) pa ni povzročila sprememb v izražanju *CYP1A2* (Slika 24).

4.3.4 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena *UGT1A2*



Slika 25: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena *UGT1A2*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju XN (0.01, 0.1, 1, 10 μ M). Rezultati so podani kot relativno izražanje glede na kontrolo \pm SD. * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Student t-test, $p<0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

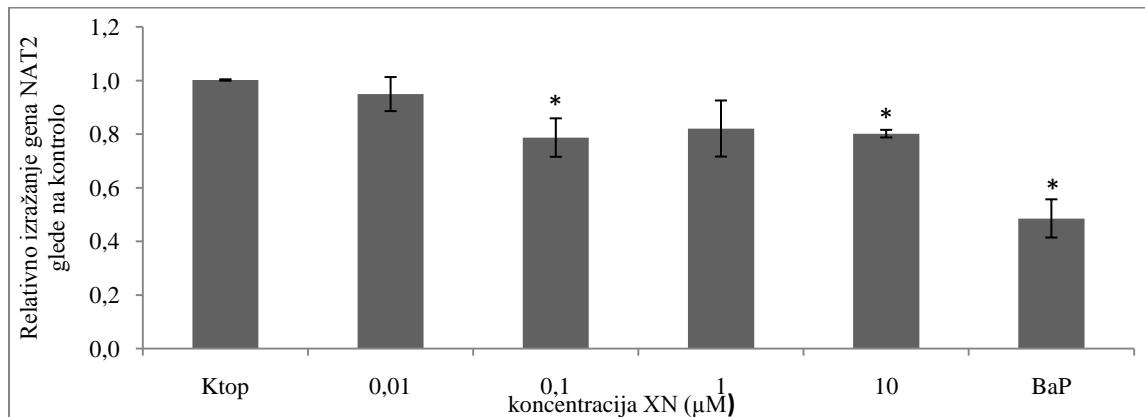


Slika 26: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena *UGT1A2*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju MeIQx (250 μ M) v kombinaciji s XN (0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M). Rezultati so prikazani kot relativno izražanje glede na kontrolo \pm SD. * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Student t-test, $p<0,05$), + statistično značilna razlika glede na MeIQx (Student t-test, $p<0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

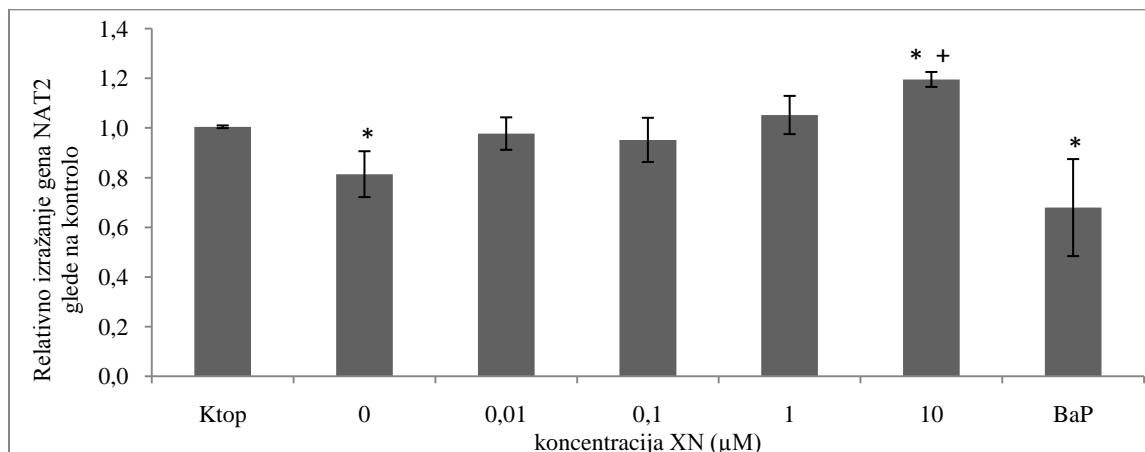
Iz slike 25 je razvidno, da je XN od doze odvisno povišal izražanje gena *UGT1A2*, vendar je do statistično značilne razlike od kontrolne skupine prišlo le pri koncentraciji 10 μ M. Izražanje tega gena je bilo pri najvišji testirani koncentraciji (10 μ M) približno za 2.5x povisano glede na kontrolno skupino. V kombinaciji s heterocikličnim aminom MeIQx lahko opazimo, da je 10 μ M XN statistično značilno povišal izražanje gena *UGT1A2* v primerjavi z MeIQx (Slika 26).

4.3.4 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena *NAT2*



Slika 27: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena *NAT2*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju XN (0,01, 0,1, 1, 10 μM). Rezultati so podani kot relativno izražanje glede na kontrolno skupino (Student t-test, $p<0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



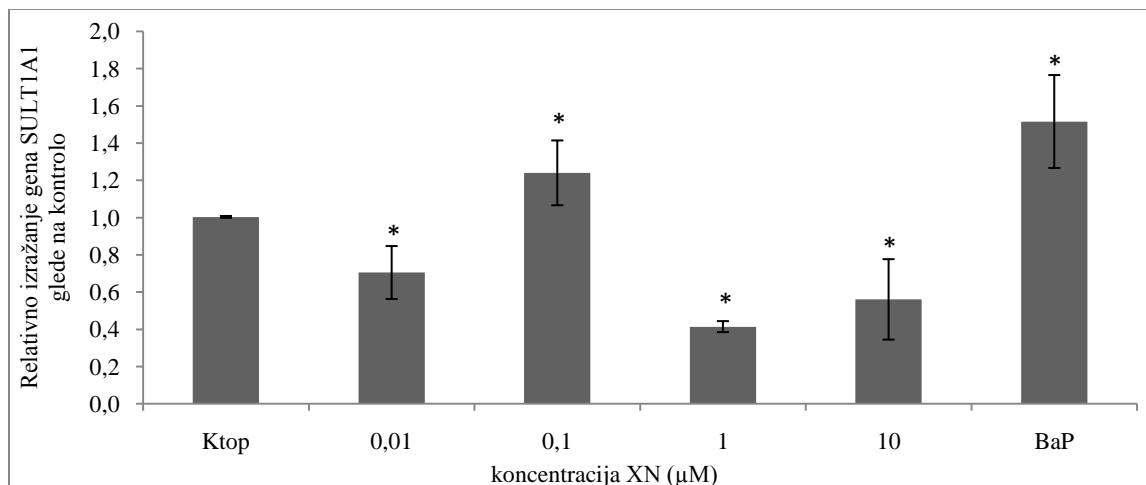
Slika 28: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena *NAT2*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju MeIQx (250 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0,01, 0,1, 1, 10 μM). Rezultati so podani kot relativno izražanje glede na kontrolno topila (Student t-test, $p<0,05$), + statistično značilna razlika glede na MeIQx (Student t-test, $p<0,05$). (Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren).

Iz Slike 27 je razvidno, da je XN (0,1 in 10 μM) od doze odvisno statistično značilno znižal izražanje gena *NAT2* v primerjavi s kontrolno skupino. V kombinaciji z MeIQx je le 10 μM XN statistično značilno povišala izražanja gena *NAT2* glede na skupino celic izpostavljenih le MeIQx (Slika 28).

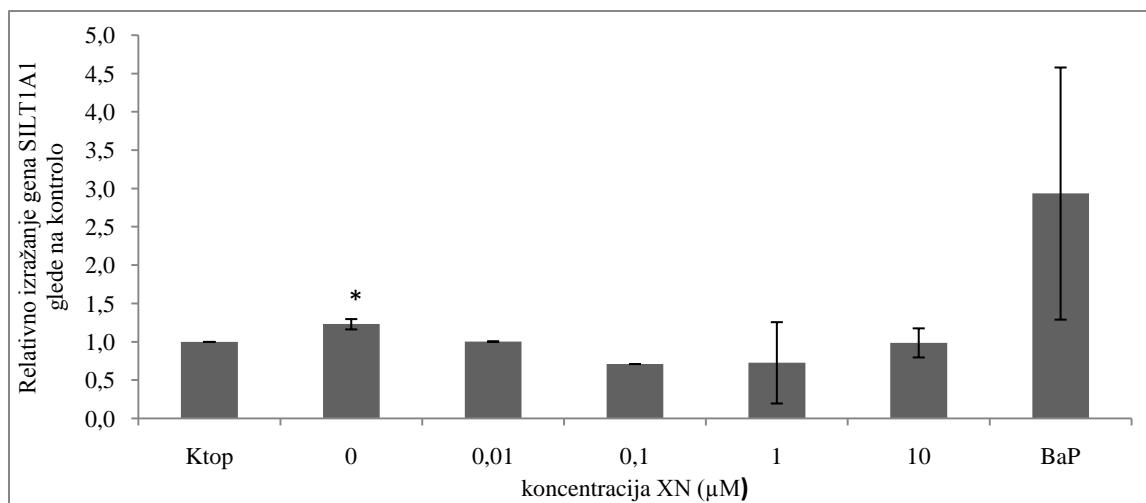
4.3.5 Vpliv XN in kombinacije XN z MeIQ na izražanje gena *SULT1A1*

Celice HepG2 zelo slabo izražajo gen *SULT1A1*, zato smo qPCR izvedli s preamplifikacijo omenjenega gena, vendar smo kljub temu zaznali slabo izražanje omenjenega gena v modelnih celicah.



Slika 29: Vpliv različnih koncentracij XN na izražanje gena *SULT1A1*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju XN (0,01, 0,1, 1, 10 μM). Rezultati so podani kot relativno izražanje glede na kontrolo $\pm\text{SD}$. * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Student t-test, $p<0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.



Slika 30: Vpliv kombinacije MeIQx in različnih koncentracij XN na izražanje gena *SULT1A1*

Celice HepG2 smo za 24 ur izpostavili delovanju MeIQx (250 μM) v kombinaciji z različnimi koncentracijami XN (0, 0,01, 0,1, 1, 10 μM). Rezultati so podani kot relativno izražanje glede na kontrolo $\pm\text{SD}$. * statistično značilna razlika glede na kontrolo topila (Student t-test, $p<0,05$). Ktop=kontrola topila, BaP=benzo[a]piren.

Iz Slike 29 je razvidno, da je XN (0.01, 1 in 10 μM) statistično značilno znižal izražanje gena *SULT1A1* v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko smo pri koncentraciji 0.1 μM zaznali statistično značilno povišanje izražanja tega gena. MeIQx je statistično značilno povišal izražanje gena *SULT1A1* v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko vpliva XN na izražanje tega gena v prisotnosti MeIQx nismo zaznali (Slika 30).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

Pri toplotni obdelavi hrane, predvsem mesa, nastanejo heterociklični amini (HCA), katerim je človek zaradi načina prehranjevanja dnevno izpostavljen. Te snovi imajo dokazano mutageno in kancerogeno delovanje (Sugimura in sod., 1997; Felton in Knize, 1990). Zato je prišlo do razvoja in testiranja številnih snovi, tudi naravnih, ki kažejo potencial za zmanjšanje neugodnih učinkov heterocikličnih aminov na človeško telo. Ena izmed takih snovi je ksantohumol (XN), ki je eden izmed najpomembnejših preniliranih flavonoidov hmelja (Yilmazer in sod., 2001b; Stevens in Page, 2004) in spada v skupino monomernih heterocikličnih polifenolov. V zadnjem desetletju so začeli številni znanstveniki intenzivno raziskovati njegove zdravilne učinke in v mnogih raziskavah potrdili širok spekter njegovega pozitivnega delovanja kot na primer protivnetno, protitumorsko in antioksidativno delovanje (Margalhães in sod., 2009; Gerhäuser, 2005a; Stevens in Page, 2004).

V diplomski nalogi smo želeli preveriti njegove antimutagene in antigenotoksične učinke zoper delovanje heterocikličnega amina MeIQx, ki je eden izmed 25 do sedaj znanih HCA, ki so jih izolirali iz termično obdelane hrane.

Mutageno delovanje XN smo preverili z Amesovim testom, s katerim smo pokazali, da XN do koncentracije 20 µg/ploščo (najvišja uporabljeni koncentraciji) na bakterije *Salmonella typhimurium* sev TA98 ni deloval mutageno. V literaturi nismo zasledili drugih raziskav, ki bi preučevale mutagenost samega XN. So pa Kac in sodelavci (2008) na bakteriji *S. typhimurium* sev TA98 raziskovali mutagenost izvlečka iz peletov hmelja, v katerem je med drugim prisoten tudi XN. Dokazali so, da izvleček do koncentracije 1000 µg/ploščo ni kazal mutagenega delovanja na bakterije.

Antimutageno delovanje XN zoper MeIQx smo prav tako preverjali na bakteriji *S. typhimurium*, sev TA98. HCA so močni bakterijski mutageni (Gooderham in sod., 2001), saj povzročajo v Amesovem testu mutacije premika bralnega okvirja in točkovne mutacije (Felton in Knize, 1990). Znano je, da spada MeIQx med najmočnejše bakterijske mutagene (Sigimura in sod., 2004). V naši raziskavi smo ugotovili, da je XN pri vseh testiranih koncentracijah v odvisnosti od doze statistično značilno znižal število z MeIQx (8,536 ng/ploščo) induciranih revertant. Najvišja uporabljeni koncentracija XN (20 µg/ploščo) je znižala število z MeIQx induciranih revertant za približno 64 %. Kac in sod. (2008) so v svoji raziskavi prav tako dokazali antimutageno delovanje XN (1-100 µg/ploščo) zoper heterociklični amin, IQ (1 ng/ploščo). Podobne rezultate navajajo tudi Miranda in sod. (2000c), ki so delali s podganjim in humanim citokromom P450 na metabolno aktivacijskem sistemu. Nakazali so, da naj bi XN deloval antimutageno z inhibicijo aktivnosti citokroma P450, s čimer vpliva na metabolno aktivacijo IQ in s tem na zaviranje pretvorbe prokarcinogena v aktivno obliko, ki bi lahko povzročila nastanek mutacij. MeIQx je podobno

kot IQ prokarcinogen, ki potrebuje za izražanje mutagenih lastnosti metabolno aktivacijo, zato predvidevamo, da deluje XN na MeIQx podobno kot na IQ, preko inhibicije njegove aktivacije. Pomen metabolne aktivacije MeIQx in s tem izražanje njegove mutagenosti so dokazali tudi Boyce in sod. (2004), saj MeIQx brez dodatka S9 frakcije ni induciral mutacij bakterij. Aktivacija mutagena IQ je učinkovitejša z rekombinantnim humanim CYP1A2 kot s podganjim jetrnim S9 izvlečkom (Miranda in sod., 2000c). V nasprotju z rezultati teh raziskav (Kac in sod., 2008; Miranda in sod., 2000c), pa so Arimoto-Kobayashi in sod. (1999) pokazali, da pivo ni zmanjšalo mutagenosti, povzročene z IQ. Ker je v pivu med drugimi snovmi prisoten v sledovih tudi XN (Stevens in sod., 1999), za katerega so kasneje dokazali, da ima antimutageno delovanje (Miranda in sod., 2000c; Kac in sod., 2008), je najverjetnejše, da v raziskavi (Arimoto-Kobayashi in sod., 1999) niso uporabili piva z zadostno količino prenilflavonoidov, ki bi inhibirali mutagenost, povzročeno z IQ (Miranda in sod., 2000c). Da snov z inhibitornim učinkom v pivu res izhaja iz hmelja, so dokazali Nozawa in sod. (2004), saj je antimutageni učinek hmeljevega piva (varjenega s 4x večjo količino hmelja, kot je običajno) zoper MeIQx večji, kot pa je antimutageni učinek piva, narejenega brez hmelja. Tudi izvlečki hmeljevih peletov so zmanjšali število z IQ induciranih revertant v odvisnosti od doze (Kac in sod., 2008). Inhibicije mutagenega delovanja zoper MeIQx so poleg XN sposobne tudi druge snovi. Med te spadata tudi naringenin in apigenin, ki sta prav tako kot XN flavonoida (Felton in sod., 2004) in inhibirata z MeIQx povzročeno mutagenost na bakteriji *S. typhimurium*. Dozno odvisno inhibicijo z MeIQx induciranimi revertantami kaže tudi resveratrol (Boyce in sod., 2004), kateremu je človek, podobno kot XN, izpostavljen s pijačo, kot je rdeče vino, v kateri se resveratrol nahaja v manjši količini. Antimutagено delovanje proti HCA kaže tudi diklorostearična kislina, ki so jo izolirali iz ribjih maščob (Vereskuns in sod., 1998) in ne spada med flavonoide. Antigenotoksični učinek diklorostearične kisline bi naj bil posledica fizičnega ujetja mutagenov ali njihovih metabolitov v micel maščobnih kislin (Vereskuns in sod., 1998; Nadathur in sod., 1996; Ho in sod., 1992) in verjetno tudi zaradi interakcije te kisline z encimi S9, s čimer je preprečen metabolizem MeIQx (Vereskuns in sod., 1998) in nastanek reaktivnih intermediarov, ki bi povzročili poškodbe. Podobno delovanje kaže tudi XN.

V nadaljevanju smo potencialno antigenotoksično delovanje XN v kombinaciji z MeIQx raziskovali na celični liniji HepG2, ki ima ohranjeno aktivnost številnih encimov, ki sodelujejo pri metaboliziranju ksenobiotikov (Knasmüller in sod., 1998). Ta celična linija se je izkazala kot primeren model za raziskovanje genotoksičnega in antigenotoksičnega delovanja najrazličnejših snovi v prehrani, saj prav zaradi ohranjenih encimov, ki niso prisotni v drugih *in vitro* modelih, omogoča zaznavanje številnih mehanizmov, vpletenih v različne celične procese (Knasmüller in sod., 2004b). Številne študije so pokazale, da določene snovi, ki so v bakterijskih testih kazale zaščitno delovanje, na humanih celičnih modelih niso kazale podobnih rezultatov, vendar so celo nasprotno delovale genotoksično (Knasmüller in sod., 2004b). Zaradi teh razlogov smo se odločili, da antigenotoksično delovanje XN potrdimo in raziščemo tudi na celični liniji humanega hepatoma, HepG2 celicah.

Najprej smo morali preveriti, ali XN deluje citotoksično na celice HepG2, kar smo ugotovljali s testom MTT. XN v koncentraciji do $10 \mu\text{M}$, po 24-urni izpostavitevi celic, ni vplival na njihovo preživelost, medtem ko je $100 \mu\text{M}$ XN znižal preživetje za približno 50 %. V raziskavi na omenjenih celicah so Plazar in sod. (2007) opisali, da je XN znižal preživetje celo za 85 %. Podobno so opisali tudi Kac in sod. (2008). V študiji na HepG2 celicah so ugotovili, da znaša LC_{50} za XN $30.7 \mu\text{M}$ (Plazar in sod., 2007). Podoben dozno odvisen učinek XN na viabilnost so opisali tudi pri celicah Hepa1c1c7, kar so ugotovljali s pomočjo kristal vijoličnega (Dietz in sod., 2005).

Podobne rezultate učinka XN na viabilnost celic so prikazali tudi v študiji na *in vitro* modelu na podganjih jetrnih rezinah. Jetrne rezine izražajo cel spekter metabolnih encimov faze I in II in nam lahko zaradi tega podajo pomembne informacije o metabolnih pretvorbah snovi in njihovem delovanju. Metabolizem ksenobiotikov je v rezinah, ki na nek način predstavljajo tkiva, za razliko od celičnih modelov primerljivejši s tistimi v *in vivo* pogojih (Plazar in sod., 2008). Slabost tega sistema pa je, da gre tukaj za podganje celice, ki se lahko v številnih mehanizmih in celičnih procesih razlikujejo od človeških celic. Pri koncentraciji $20 \mu\text{M}$ in višji so opazili povečano iztekanje laktat dehidrogenaze (LDH) in alanin aminotransferaze (ALAT) v gojitveni medij, kar kaže na to, da je XN pri teh koncentracijah za jetrne rezine citotoksičen (Plazar in sod., 2008). Viabilnost celic je zmanjšana v odvisnosti od koncentracije, kar se ujema s citotoksičnim delovanjem številnih drugih flavonoidov (Galati in O'Brien, 2004; Plochman in sod., 2007). Podobne učinke XN na viabilnost celic so opazili tudi pri rakavih celicah dojk (MCF-7), debelega črevesa (HT-29) in jajčnikov (A-2780), C8166 limfocitih (Wang in Hu, 2000) ter humanih T limfoblastih (Plochmann in sod., 2007).

V naši študiji so rezultati MTT testa pokazali, da je MeIQx ($350 \mu\text{M}$) zmanjšal preživelost celic na 65 % glede na kontrolno skupino celic. Ugotovili smo, da XN do koncentracije $10 \mu\text{M}$ ni vplival na citotoksično delovanje MeIQx. V literaturi nismo zasledili drugih študij, ki bi raziskovale citotoksično delovanje kombinacije XN in MeIQx. Zasledili pa smo podatek, da MeIQx že v zelo nizkih koncentracijah (20 nM) zmanjša preživelost metabolno kompetentnih celic MCL-5 (humane limfoblastoidne celice) (Pfau in sod., 1999), medtem ko pri metabolno nekompetentnih C3H/M2 mišjih fibroblastih deluje citotoksično šele pri višjih koncentracijah ($250 \mu\text{M}$) (Pfau in sod., 1999), kar kaže na pomembnost metabolne aktivacije MeIQx. Tudi daljša in ponavljača izpostavitev človeških jetrnih celic HepaRG nižjim koncentracijam MeIQx ($10 \mu\text{M}$) ni povzročila statistično značilnega zmanjšanja preživetja celic (Dumont in sod., 2010). Je pa visoka koncentracija ($1000 \mu\text{M}$) heterocikličnega amina, IQ, znižala preživelost celic HepaRG za 25 % glede na kontrolno skupino (Hegarath in sod., 2010).

Za testiranje antigenotoksičnega delovanja XN smo uporabili koncentracije, ki na celice HepG2 niso delovale citotoksično. Plazar in sod. (2007) so dokazali, da XN ($0.01, 0.1, 1$ in $10 \mu\text{M}$) na HepG2 celicah ne povzroča nastanka verižnih prelomov DNA, kar so potrdili tudi Kac in sod. (2008). Podobne rezultate so dobili v *in vitro* raziskavah na podganjih jetrnih

rezinah, kjer so opisali, da so šele koncentracije XN nad 25 µM statistično značilno povišale nivo DNA poškodb, vendar pa so omenjene koncentracije že vplivale na viabilnost celic (Plazar in sod., 2008). Možno je, da je izpostavitev jetrnih rezin citotoksičnim koncentracijam XN povzročila nastanek DNA verižnih zlomov, kateri so najverjetneje povezani z DNA fragmentacijo, ki je posledica celične apoptoze in/ali nekroze, ne pa z genotoksičnostjo (Henderson in sod., 1998; Quintana in sod., 2000, Collins, 2004). Koncentracija, kjer XN doseže 50% učinek (EC_{50}), je 22.8 µM XN (Plazar in sod., 2008). Na modelu celic HepG2 smo uporabili nižje koncentracije XN (0.01-10 µM), ki so imele antigenotoksičen učinek.

Potencialne antigenotoksične učinke XN smo ugotavljali s testom komet na celicah HepG2, ki smo jih izpostavili delovanju MeIQx. Rezultati so pokazali, da je XN statistično značilno znižal nivo DNA poškodb, povzročenih z MeIQx po 24-urni izpostavitvi, vendar neodvisno od koncentracije. Tudi Plazar in sod. (2007) ter Kac in sod. (2008) so pokazali, da je XN inhibiral nastanek DNA poškodb, ki jih povzroča heterociklični amin, IQ (1 mM). Podobno kot v naši študiji, je tudi v študiji Plazar in sod. (2008) XN inhibiral z IQ povzročene poškodbe neodvisno od koncentracije, medtem ko so Kac in sod. (2008) opisali od doze XN odvisno zmanjšanje nastanka DNA verižnih prelomov. V naši raziskavi na celicah HepG2 smo, podobno kot študija Plazar in sod. (2007), s testom komet pokazali, da je najnižja testirana koncentracija XN (0,01 µM) popolnoma preprečila nastanek DNA poškodb, povzročenih s heterocikličnima aminoma MeIQx ozziroma IQ. Tudi druge *in vitro* raziskave, podganje jetrne rezine (Plazar in sod., 2008) ter celo *in vivo* testi na podganah (Ferk in sod., 2010) so pokazali, da ima XN antigenotoksične učinke zoper heterociklične amine. XN je pri podganah, ki so jih izpostavili delovanju IQ, zmanjšal nastanek poškodb DNA in tudi predneoplastičnih lezij v jetrih in na debelem črevesu (Ferk in sod., 2010). Na modelu *in vitro* na podganjih jetrnih rezinah je znašala koncentracija, ki je imela 50% učinek (EC_{50}) zaščite pred z IQ induciranimi DNA poškodbami 0.7 nM (Plazar in sod., 2008). XN je v celicah Hepa1c1c7 med drugim induciral tudi aktivnost kinon reduktaze (NADPH: quinone reductase, QR). Ta je pomemben encim, ki sodeluje pri detoksifikaciji reaktivnih metabolitov (Miranda in sod., 2000a; Dietz in sod., 2005). Številni avtorji navajajo, da naj bi zaščitni učinek XN zoper poškodbe, povzročene s HCA, potekal preko indukcije encimov detoksifikacije, faze II, in/ali inhibicije encimov, ki so udeleženi pri karcinogeni aktivaciji, CYP1A izoencimi (faza I) (Gerhäuser in sod., 2002; Nozawa in sod., 2004; Miranda in sod., 2000c). Vendar v literaturi največkrat omenjajo, da bi naj bil najpomembnejši zaščitni mehanizem XN zoper genotoksično delovanje HCA prav inhibicija metabolne aktivacije HCA (Henderson in sod., 2000; Miranda in sod., 2000c; Gerhäuser in sod., 2002). V študiji na HepG2 celicah so pokazali, da XN prav tako učinkovito ščiti celice pred genotoksičnim delovanjem prokarcinogena benzo(a)pirena (BaP) in oksidirajočega agensa *tert*-butil hidroperoksida (*t*-BOOH) (Plazar in sod., 2007). Ugotovitve antigenotoksičnega potenciala XN na sesalčjih celicah so zelo pomembne, saj se je velikokrat izkazalo, da številne snovi (kofein, vanilin, kumarin in tanična kislina), ki v bakterijskih sistemih izražajo antimutageno ozziroma antioksidativno delovanje, na sesalčjih sistemih nimajo takšnih učinkov ozziroma lahko celo povzročajo poškodbe DNA (Sanyal in sod., 1997; Knasmüller in sod., 2002).

V številnih študijah so pokazali, da HCA (PhIP, MeIQx, DiMeIQx) povzročajo pri različnih celičnih linijah (MCL-5, HepG2) nastanek mikrojeder (Pfau in sod. 1999; Knasmüller in sod. 1999; Majer in sod. 2004). Zato smo se tudi v naši študiji odločili preveriti antigenotoksično delovanje XN s testom mikrojeder. V literaturi nismo zasledili raziskav, v katerih bi s testom mikrojeder preučevali vpliv XN na genetsko nestabilnost celic. V naši študiji smo najprej preverili ali XN sam po sebi povzroča spremembe na nivoju kromosomov. Nadalje pa nas je zanimalo, kakšen je njegov vpliv na zmanjšanje števila mikrojeder, jedrnih brstov in nukleoplazmatskih mostičkov, ki jih povzroča MeIQx. Rezultati so pokazali, da XN sam po sebi ni povišal števila mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov in jedrnih brstov, prav tako ni vplival na delitev celic. Presenetljivo pa smo ugotovili tudi, da sam MeIQx ni povišal števila mikrojeder kot tudi ne nukleoplazmatskih mostičkov in jedrnih brstov v primerjavi s kontrolno skupino, kar je bilo v nasprotju s pričakovanimi rezultati. Zaradi teh rezultatov s testom mikrojeder nismo mogli primerno ovrednotiti antigenotoksičnega učinka XN. Tudi novejše študije na HepaRG celicah kažejo, da nekateri HCA (PhIP in IQ) po 24-urni izpostavitvi ne povzročajo nastanka mikrojeder (Hegarat, 2010). Tudi *in vivo* študije na miših so pokazale, da hranjenje miši s hrano, ki so ji dodali MeIQx, ni povzročila razlik v številu mikrojeder med skupinami živali, ki so jim v hrano dali MeIQx in kontrolno skupino (Breneman in sod., 1996). Kot že omenjeno, je to v nasprotju z rezultati, ki jih opisujejo na celični liniji MCL-5, katera izraža visok nivo encimov CYP1A1 in ostalih humanih citokromov (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2E1). Na tej celični liniji pa so opazili povišanje nivoja mikrojeder, in sicer v odvisnosti od doze MeIQx (Pfau in sod., 1999). Hegarat in sod. (2010) navajajo, da bi vzrok za nezmožnost indukcije mikrojeder lahko iskali v različnem nivoju izražanja encimov, ki so udeleženi pri metabolni aktivaciji in detoksifikaciji HCA. Knamüller in sod. (1999) so za razliko od naše študije pokazali, da sta PhIP in MeIQx na celicah HepG2 povzročila nastanek mikrojeder v odvisnosti od doze in to že po eni uri izpostavitve. Na CHO celicah pa kljub dodatku celičnega homogenata, izoliranega iz HepG2 celic, MeIQx kot tudi IQ nista povišala števila nastalih mikrojeder, tudi pri visokih koncentracijah MeIQx ($4700 \mu\text{M}$) (Knasmüller in sod., 1999). Kasnejše raziskave so pokazale, da so negativni rezultati s testom mikrojeder na celicah CHO, ki so jih izpostavili HCA, posledica nizke acetiltransferazne aktivnosti (Hein in sod., 1994; Otsuka in sod., 1996; Wu in sod., 1997), saj naj bi bila acetilacija pomembna pri aktivaciji HCA (Aeschbacher in Turesky, 1991). V nasprotju s temi celicami pa je acetiltransferazna aktivnost HepG2 celic dovolj visoka, da nastanejo z DNA reaktivni metaboliti MeIQx (Knasmüller in sod., 1999), ki jih nato zaznajo s testom mikrojeder.

V zadnjem delu diplomske naloge smo želeli ugotoviti ali XN ($0, 0.01, 0.1, 1$ in $10 \mu\text{M}$) vpliva na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v aktivacijo/detoksifikacijo ksenobiotikov. Predvsem pa nas je zanimalo, kakšen je vpliv kombinacije MeIQx in XN na izražanje preučevanih genov. Spremembe v izražanju genov na nivoju mRNA smo ugotavljali s kvantitativno verižno reakcijo v realnem času (qrt-PCR). Citokrom P450 monooksigenaze (CYP) so skupina encimov, ki imajo pomembno vlogo pri metabolizmu številnih endogenih substratov kot tudi telesu tujih snovi, ksenobiotikov, in jih v glavnem pretvarjajo v manj

toksične produkte, ki se izločijo iz telesa (Hodek in sod., 2002) ali pa se izločijo šele po nadalnjem metabolizmu z encimi faze II (Hodek in sod., 2009). CYP encimi pa lahko pretvorijo ksenobiotike, med njimi tudi HCA, v bolj reaktivne intermediate, ki povzročajo poškodbe v celicah (Hodek in sod., 2009). Obstaja več poddružin CYP genov, vendar smo se v diplomski nalogi osredotočili le na dva gena iz te družine, *CYP1A1* in *CYP1A2*, katerih produkta sta pri presnovi ksenobiotikov najaktivnejša. Ugotovili smo, da je XN povišal relativno izražanje gena *CYP1A1* in *CYP1A2* na nivoju mRNA glede na kontrolo v odvisnosti od doze, in sicer gen *CYP1A1* močneje kot gen *CYP1A2*. Že Yilmazer in sod. (2001a) so opisali, da encimi iz družine CYP sodelujejo pri metabolizmu XN. Uporabili so inhibitorje encimov CYP in s tem vplivali na količino nastalih metabolitov XN v podganjih jetnih mikrosomih. Pokazali so, da je pri biotransformaciji XN udeleženih več CYP encimov (Yilmazer in sod., 2001a). Poleg encimov faze I so v metabolizem flavonoidov vključeni tudi encimi faze II (Hodek in sod., 2002). V nasprotju z našimi rezultati pa so Plazar in sod. (2008) dokazali, da XN nima vpliva na izražanje *CYP1A2* mRNA pri podganih jetnih rezinah in da je bil nivo *CYP1A1* mRNA pod mejo detekcije, kar je seveda lahko specifično povezano s podganjimi celicami.

Encima CYP1A1 in CYP1A2 imata zelo pomembno vlogo pri metabolni aktivaciji številnih ksenobiotikov, tudi HCA, saj katalizirata N-hidroksilacijo eksociklične amino skupine (Crofts in sod., 1998), pri čemer nastanejo reaktivni intermediati, N-hidroksilirani HCA, ki se lahko vežejo na DNA. Lahko pa so podvrženi nadaljnemu aktivacijskemu koraku z acetilacijo ali sulfacijo do bolj reaktivnih oblik (Yanagawa in sod., 1994; Yamazoe in sod., 1995), ki se še lažje vežejo na DNA ali proteine v celicah (Snyderwinw in sod., 1988; Lodovici in sod., 1989; Wallin in sod., 1992). Številni flavonoidi imajo lahko vpliv na te encime, saj lahko inducirajo biosintezo številnih CYPov, lahko pa tudi inhibirajo ali stimulirajo encimsko aktivnost CYP (Hodek in sod., 2002). Zato smo preverili, kakšen vpliv ima XN na izražanje z MeIQx induciranih genov *CYP1A1* in *CYP1A2*. Ugotovili smo, da XN ni povzročil biološko pomembnih razlik v izražanju gena *CYP1A1* glede na sam MeIQx, medtem ko sta najvišji koncentraciji XN (1 in 10 µM) v odvisnosti od doze statistično značilno znižali izražanje gena *CYP1A2*, ki ga je induciral MeIQx. 0.1 µM XN je statistično značilno povišal izražanje izbranega gena glede na sam MeIQx. MeIQx je podobno kot XN močneje povišal izražanje gena *CYP1A1* kot gena *CYP1A2*. V diplomski nalogi smo merili le spremembe v izražanju izbranih genov, ne pa tudi spremembe v aktivnosti proteinov, zaradi česar ne moremo zagotovo vedeti, kaj se dogaja na postranslacijskem nivoju kot tudi ne trditi, da XN vpliva na aktivnost encimov in na nivo proteinov. Vendar pa na podlagi dobljenih rezultatov lahko vidimo, da prihaja do sprememb na transkripcijskem nivoju, kar na nek način nakazuje na mehanizem delovanja XN v kombinaciji s heterocikličnim aminom MeIQx.

O inhibitornem in stimulativnem vplivu flavonoidov na aktivnost CYP poročajo številne raziskave. Nekatere snovi, med drugim tudi tiste, ki se nahajajo v rastlinah, katere spadajo med križnice (Brassicaceae), inducirajo aktivnost encimov (*CYP1A2*) (Walters in sod., 2004) preko večih mehanizmov, in sicer preko direktne stimulacije izražanja CYP genov s

specifičnim receptorjem in/ali s stabilizacijo CYP proteina ali mRNA (Lin in Lu, 1998; Shih in sod., 2000). S tem pa lahko ti induktorji encimov posredno stimulirajo aktivacijsko pot ostalih ksenobiotikov, tudi HCA, in imajo s tem pomembno vlogo pri modulaciji kemijске karcinogenosti (Hodek in sod., 2009). Po drugi strani pa so nekatere druge snovi (purpurin, alizarin, ksantohumol, resveratrol, klorofilin) sposobne inhibicije encimske aktivnosti CYP1A1 (Takahashi in sod., 2002; Henderson in sod., 2000; Chun in sod., 1999; Yun in sod., 1995) kot tudi inhibicije aktivnosti že induciranih encimov (Miranda in sod., 2000a), tudi z direktno vezavo na njih, s čimer zaščitijo celice pred nastankom DNA aduktov (Hodek in sod., 2009). Vendar pa lahko inhibicija teh encimov vodi tudi v povečano akumulacijo citotoksičnih snovi v celicah (Hodek in sod., 2009). S tem je lahko modulacija CYP encimov z določenimi ksenobiotiki dvorenzen meč, saj lahko predstavlja porušenje ravnovesja med aktivacijo in detoksifikacijo prokarcinogenov (Hodek in sod., 2009). Številne *in vitro* študije so pokazale, da je prav inhibicija CYP encimov eden izmed glavnim mehanizmov, po katerem določeni ksenobiotiki ščitijo celice pred nastankom DNA aduktov in s tem genotoksičnostjo (Hodek in sod., 2009). Inhibicija aktivnosti CYP1A2 bi naj bil pomemben mehanizem za preprečevanje nastanka raka, ki ga pri ljudeh povzročajo HCA (Miranda in sod., 2000a). Takšno delovanje so opisali tudi za XN, saj ščiti človeške celice pred vplivi HCA prav na ta način, da inhibira aktivnost encima CYP1A2 (Henderson in sod., 2000). Inhibira tudi aktivnost CYP1A1, ki igra pomembno vlogo pri izvenjetrni aktivaciji karcinogenov (Crofts in sod., 1998; King in sod., 2000). Gerhäuser in sod. (2002) poročajo, da XN pri celični liniji Hepa 1c1c7 inhibira aktivnost družine CYP1A že v submikromolarnih koncentracijah. Prav tako pa pri tej celični liniji zniža nivo izražanja proteina CYP1A1 (Miranda in sod., 2000a). Zaradi tega so Miranda in sod. (2000b) predpostavili, da bi naj bil zaščitni učinek XN pred z IQ povzročenimi DNA poškodbami posledica inhibicije encimske aktivnosti CYP1A, s čimer je zmanjšan tudi nastanek DNA reaktivnih metabolitov. Inhibicije encimske aktivnosti CYP1A2 in posledično zmanjšanja poškodb, povzročenih z MeIQx, sta (pri višjih koncentracijah, 50 in 100 µM) sposobna tudi flavonoida naringenin in kvercetin (iz ang. quercetin) (Kang in sod., 2004). Številni avtorji poročajo, da je v *in vivo* študijah na podganah inhibicija encimske aktivnosti cyp1a1 in cyp1a2 glavni mehanizem, po katerem I3C (indol-3-karbinol) zaščiti celice pred z IQ in PhIP povzročenimi DNA aduktami in ACF (iz ang. aberrant crypt foci) (Xu in sod., 1997; He in sod., 1997; Schut in Dashwood, 1995). Prav nasprotno z rezultati teh študij, ki govorijo o inhibiciji cyp kot o glavnem mehanizmu zaščite pred genotoksičnostjo HCA, pa se lahko tudi indukcija cyp1A encimov (uporaba induktorja 3-metilholanrena), pred vnosom IQ, odraža v zmanjšanem nastanku IQ-DNA aduktov v jetrih in debelem črevesu podgan. S tem ta induktor okrepi inaktivacijsko pot bolj kot pa aktivacijsko pot (Hodek in sod., 2009). Tako ima CYP1A pomembno vlogo tako pri detoksifikaciji kot tudi pri aktivaciji HCA do bolj reaktivnih intermediatov (Turesky, 2010).

MeIQx je povišal izražanje genov *CYP1A1* (približno 156x glede na kontrolo) in *CYP1A2* (približno 41x glede na kontrolo), kar lahko kaže na morebitno indukcijo teh encimov z MeIQx in s tem posledično tudi povišanje nivoja DNA poškodb, ki smo jih dobili s testom komet, vendar aktivnosti encimov nismo merili. Statistično značilno povišanje izražanja

CYP1A1 in *CYP1A2* so zaznali tudi pri HepaRG celicah, ki so jih izpostavili nizki koncentraciji MeIQx ($1 \mu\text{M}$) (Dumont in sod., 2010). Pri metabolizmu MeIQx je pomembnejši encim CYP1A2 (Sinha in sod., 1995), kar so dokazali Boobis in sod. (1994) z uporabo selektivnega inhibitorja tega encima. Na ta način se je velik del (91 %) MeIQx izločil v nespremenjeni obliki.

Kot smo omenili že prej, lahko N-hidroksilirani HCA, katerih nastanek katalizirajo encimi faze I, reagirajo tudi z encimi faze II v drugem koraku encimatske aktivacije, ki je sestavljen iz acetilacije ali sulfamacije (Turesky, 2002). V tej fazici se od N-hidroksiliranih HCA odcepijo visoko nestabilni estri, pri čemer nastane kot končna karcinogena oblika nitrenijev ion (Turesky, 2002). Ta za razliko od N-hidroksiliranih HCA lažje tvori DNA adukte, pretežno na C-8 ali N-2 atomu gvanina (Turesky in sod., 1992). Za MeIQx velja, da začetni metabolni aktivaciji s CYP1A2 sledi nadaljnja aktivacija z N-acetyltransferazami (NAT), pri čemer nastane N-acetoksi-MeIQx, iz katerega s heterolitskimi odcepitvami nastane nitrenijev ion-acetat, ki je zelo reaktiv in se veže na DNA baze (Turesky in Vourus, 2004). Estrifikacijo N-hidroksi-HCA katalizirata predvsem NAT2 in SULT1A1 (Turesky, 2007). MeIQx se lahko metabolno aktivira s CYP1A1, vendar ja za nastanek DNA aduktov in mutagenosti potrebna nadaljnja aktivacija metabolitov z NAT2, saj MeIQx pri celicah, ki niso izražale NAT2, ni povzročil teh poškodb (Bendaly in sod., 2007). Nadaljnja aktivacija IQ z NAT lahko tudi do 30x poveča nastanek IQ-DNA aduktov (Snyderwine in sod., 1988), kar kaže na pomembnost tega encima pri nastanku teh poškodb. Zaradi tega smo v naši študiji preverili, kakšne so spremembe v izražanju teh dveh genov. XN je pri koncentraciji 0.1 in $10 \mu\text{M}$ statistično značilno znižal izražanje gena *NAT2* v primerjavi s kontrolno skupino. V kombinaciji z MeIQx pa je le najvišja koncentracija XN ($10 \mu\text{M}$) povišala izražanje gena *NAT2* na nivoju mRNA glede na skupino celic, izpostavljenih le MeIQx. Povišana transkripcija gena *NAT2* pri skupini celic, ki smo jih izpostavili $10 \mu\text{M}$ XN v kombinaciji z MeIQx, je lahko mehanizem za indukcijo tega encima in s tem povečanje nastanka poškodb, kar pa nismo dokazali s testom komet. Hernaez in sod. (1997) so pokazali, da so antimutageni in antikarcinogeni učinki čaja zoper IQ predvsem posledica inhibicije encimov NAT. V tem primeru je inhibicija drugega aktivacijskega koraka pomembnejša od inhibicije encima CYP1A2. Pri HepG2 celicah bi lahko podoben učinek na NAT imel tudi XN, vendar pa v naši študiji nismo merili aktivnosti encimov, zato tega ne moremo trditi z zagotovostjo. Schut in Snyderwine (1999) poročata, da HCA niso podvrženi detoksifikaciji z NAT2, ampak le bioaktivaciji in s tem k nastanku reaktivnih metabolitov, ki se vežejo na DNA.

Nadaljnje bioaktivacije N-hidroksiliranih metabolitov HCA so sposobni tudi encimi sulfotransferaze (SULT), pri čemer nastanejo N-sulfat estri, ki se pretvorijo do nitrenijevih ionov, kateri se vežejo na DNA (Turesky, 2010). Na ta način encim poveča tudi genotoksični učinek IQ na bakterijah in sesalčjih celicah (Glatt, 2006). Zato smo preverili vpliv samega XN in kombinacije MeIQx s XN na izražanje gena *SULT1A1*. XN (0.01, 1 in $10 \mu\text{M}$) je statistično značilno znižal izražanje gena *SULT1A1* v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je le pri koncentraciji 0.1 μM povišal izražanje tega gena. Zaradi zelo nizkega bazalnega nivoja

izražanja tega gena je lahko to povišanje zgolj slučaj. V kombinaciji z MeIQx pa XN ni imel vpliva na nivo mRNA *SULT1A1*. O encimski aktivnosti na podlagi teh rezultatov ne moremo sklepati. So pa Lewis in sod. (1998) pokazali na humanih epiteljskih celicah dojke, da 1 µM estron zmanjša vezavo metabolita PhIP (N-hidroksiliran PhIP) na DNA, kar naj bi bila predvsem posledica inhibicije estrogen sulfotransferaze, ki je edina identificirana sulfotransferaza v teh celicah. Posledično pride zaradi inhibicije encima SULT tudi do inhibicije nadaljnje bioaktivacije N-hidroksi-PhIP s tem encimom, s čimer se zmanjša nivo DNA poškodb. Zaradi nadaljnje aktivacije HCA z encimi SULT in NAT je končna stopnja v karcinogenem delovanju teh snovi odvisna ne le od encimov CYP ampak tudi od aktivnosti encimov SULT in NAT (Hodek in sod., 2009).

Encimi faze II lahko poleg nadaljnje bioaktivacije HCA katalizirajo tudi detoksifikacijo in s tem zmanjšajo učinka HCA na celice. Številne študije so pokazale, da je nivo HCA-DNA aduktov v glavnem odvisen od delovanja encimov faze II (Ozawa in sod., 1994; Turesky in sod., 1991). Tako je modulacija delovanja teh encimov z določenimi kemozaščitnimi snovmi in s tem vpliv na detoksifikacijo prav tako primeren mehanizem v boju proti DNA poškodbam in raku. XN ima lahko ugodne učinke na detoksifikacijo karcinogenov z inhibicijo encimov faze I kot tudi z indukcijo encimov faze II (Steven in Page, 2004). Humani SULT1A1 katalizira, poleg nadaljnje bioaktivacije HCA, tudi detoksifikacijo IQ in MeIQx, pri čemer se tvorijo sulfamati (Ozawa in sod., 1995; King in sod., 2000). Ob tem se negativni učinek teh snovi na celice zmanjša. Tako je indukcija encimov SULT lahko učinkovit zaščitni mehanizem pred vplivi HCA (Grant in sod., 1997). Ker se lahko indukcija encimov SULT odraža tudi v povečanem nastanku visoko reaktivnih snovi, ki predstavljajo končne karcinogene, je indukcija teh encimov, podobno kot indukcija CYP, dvorenzen meč. Ta se kaže v izločanju detoksifikacijskih metabolitov in posledično v zmanjševanju genotoksičnosti ksenobiotikov. Hkrati pa se lahko v določenih primerih kaže tudi v povečanem nastanku reaktivnih elektrofilov (Dashwood in sod., 2002).

V nasprotju s SULT in NAT, ki so navadno vključeni v nastanek končnih karcinogenov HCA, pa obstajajo tudi encimi faze II, ki zmanjšujejo karcinogeni potencial nekaterih ksenobiotikov (Hodek in sod., 2009). To so encimi glukuronoziltransferaze (UGT, iz ang. uridine diphosphate glucuronosyltransferases), ki imajo ponavadi ugodne učinke na zdravje ljudi (Hodek in sod., 2009), saj katalizirajo glukuronidacijo številnih endogenih snovi in ksenobiotikov (Turesky, 2010). Pri tem nastanejo bolj hidrofilne snovi, ki se lažje izločijo iz telesa (Duton, 1980). V diplomski nalogi smo dokazali, da je XN od doze odvisno povišal izražanje gena *UGT1A2*, vendar je do statistično značilnega povišanja tega gena glede na kontrolno skupino prišlo le pri najvišji testirani koncentraciji (10 µM). V kombinaciji s heterocikličnim aminom MeIQx lahko opazimo, da je 10 µM XN statistično značilno povišal izražanje gena *UGT1A2* v primerjavi z MeIQx. O sami translaciji in aktivnosti tega encima na podlagi teh podatkov ne moremo sklepati, je pa indukcija encimov UGT pomemben mehanizem zaščite pred HCA. Številni polifenoli v čaju inducirajo UGT encime (Bu-Abbas in sod., 1995; Stoner in sod., 1997), kar je najverjetnejši razlog, da beli, zeleni ter črni čaj

zmanjšajo z IQ in PhIP povzročene DNA adukte in ACF pri podganah (Xu in sod., 1996; Santana-Rios in sod., 2002). Pri konjugaciji PhIP in tudi MeIQx s humanim UGT1A nastanejo detoksifikacijski produkti (Sinha in sod., 1998b; Turesky in sod., 1998; Langouët in sod., 2002), ki se izločijo iz telesa. O indukciji aktivnosti UGT poročajo tudi na skupini prostovoljcev, ki so prejemali hrano, bogato s križnicami (fam. *Brassicaceae*). Taka hrana je vsebovala snovi, ki so povečale produkcijo in izločanje detoksifikacijskih metabolitov PhIP. S tem se je zmanjšala količina reaktivnih metabolitov, ki bi lahko reagirali z DNA in na ta način povzročili DNA poškodbe (Walters in sod., 2004). Konjugacija XN s sulfatom, kar katalizira SULT1A1, je manj pomembna za fazo II metabolizma pri podganah in verjetno tudi pri ljudeh kot glukoronidacija z UGT (Ruefer in sod., 2005). Zato je lahko morebitno povišanje aktivnosti UGT pomembnejše za antigenotoksično delovanje XN zoper MeIQx.

Zelo pomemben encim, ki je prav tako vpletен v detoksifikacijo HCA, je GST (glutation-S-transferaza) (Alexander in sod., 1991), vendar v diplomski nalogi nismo merili spremembe v izražanju tega gena. Njegov pomen pokažejo Nozawa in sod. (2006), saj je pri izpostavitvi liofiliziranega piva v kombinaciji s PhIP prišlo do povečane aktivnosti encima GST (in znižanje aktivnosti CYP1A2) in s tem do zmanjšanja DNA aduktov ter posledično zmanjšanja genotoksičnega delovanja.

5.2 Sklepi

Na podlagi dobljenih rezultatov smo oblikovali naslednje sklepe:

- Ksantohumol (XN) pri testiranih koncentracijah (2.5, 5, 10, 20 µg/ploščo) na bakteriji *Salmonella typhimurium*, sev TA98, ni povzročil mutacij premika bralnega okvirja, medtem ko je deloval anti-mutageno, saj je zmanjšal število s heterocikličnih aminov, MeIQx, induciranih revertant.
- XN deluje citotoksično na celice HepG2 pri visokih testiranih koncentracijah (100 µM).
- Heterociklični amin, MeIQx (350 µM), je zmanjšal preživetje celic HepG2 za približno 35 %. XN ni vplival na smrtnost celic, ki jo povzroča MeIQx.
- XN ima antigenotoksično delovanje, saj je zmanjšal količino DNA verižnih prelomov, ki jih na celicah HepG2 povzroča prehrambeni mutagen MeIQx.
- XN pri nobeni testirani koncentraciji ni povišal nastanka mikrojeder, jedrnih brstov in nukleoplazmatskih mostičev. Tudi ni vplival na delitev celic HepG2.

- S testom mikrojeder nismo mogli ovrednotiti antigenotoksičnega potenciala XN zoper MeIQx, saj sam MeIQx ni povišal števila mikrojeder kot tudi ne jedrnih brstov in nukleoplazmatskih mostičev, zaradi česar nismo zaznali razlike med celicami, ki smo jih izpostavili le MeIQx in celicami, ki so bile izpostavljene kombinaciji MeIQx in XN.
- XN (0.1, 1 in 10 μM) je statistično značilno povišal izražanje gena *CYP1A1* v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko ni značilno spremenil izražanja gena *CYP1A1*, ki smo ga inducirali z MeIQx.
- XN (1 in 10 μM) je statistično značilno povišal izražanje gena *CYP1A2* v primerjavi s kontrolno skupino. V kombinaciji z MeIQx je XN (1 in 10 μM) v odvisnosti od doze statistično značilno znižal izražanje tega gena, ki smo ga inducirali z MeIQx. V kombinaciji z MeIQx je le 0.1 μM XN statistično značilno povišal izražanje gena *CYP1A2* v primerjavi z MeIQx.
- XN je od doze odvisno povišal izražanje gena *UGT1A2*. Do statistično značilne razlike glede na kontrolno skupino je prišlo le pri 10 μM XN. V kombinaciji z MeIQx je le najvišja testirana koncentracija XN (10 μM) statistično značilno povišala izražanje gena *UGT1A2* v primerjavi z MeIQx.
- XN (0.1 in 10 μM) je statistično značilno znižal izražanje gena *NAT2* v primerjavi s kontrolno skupino. V kombinaciji z MeIQx je najvišja koncentracija XN statistično značilno povišala izražanje gena *NAT2* v primerjavi z MeIQx.
- XN (0.01, 1 in 10 μM) je statistično značilno znižal izražanje gena *SULT1A1* v primerjavi s kontrolno skupino, med tem ko je 0.1 μM XN statistično značilno povišal izražanje tega gena. MeIQ je značilno povišal izražanje gena *SULT1A1* v primerjavi s kontrolno skupino, med tem ko XN na izražanje gena v pristonosti MeIQ ni vplival.

Na podlagi navedenih sklepov lahko potrdimo zastavljeno hipotezo, da ima XN antimutagen in antigenotoksičen potencial zoper MeIQx ter da vpliva na izražanje izbranih genov, ki so vpleteni v metabolno aktivacijo/detoksifikacijo heterocikličnih aminov.

6 POVZETEK (SUMMARY)

Ljudje smo v okolju izpostavljeni številnim mutagenim karcinogenom. Človek tekom svojega življenja zaužije velike količine hrane, zato je le-ta, predvsem njena kakovost, pomemben dejavnik, ki lahko znatno pripomore k povečanemu tveganju za razvoj rakavih obolenj. Da zagotovimo mikrobiološko varnost in oblikujemo želeno senzorično kakovost živil, le-te toplotno obdelujemo. Pri toplotni obdelavi hrane, tudi na način, ki poteka v običajnih gospodinjstvih, pride do nastanka različnih genotoksičnih snovi. Ene izmed takih snovi, ki nastanejo pri termični obdelavi pretežno mesnih in ribjih jedi so heterociklični amini (HCA). Ti so dokazano mutageni in karcinogeni. Eden izmed najpogostejsih HCA je MeIQx, ki spada v skupino možno karcinogenih snovi za ljudi (Skupino 2B). MeIQx in ostali HCA so genotoksični karcinogeni, ki zahtevajo metabolno aktivacijo. Pri tem nastanejo nukleofilni vmesni produkti, ki povzročijo poškodbe dednega materiala. Zato lahko izpostavljenost tem snovem, tudi če so koncentracije zelo nizke, privede pri ljudeh do povečane pogostnosti rakavih obolenj. Zaradi stranskih učinkov in dnevne izpostavljenosti HCA, se je zanimanje za te snovi povečalo. Negativen vpliv, ki ga imajo HCA na organizem, lahko zmanjšjo določene snovi, ki so lahko sestavni del prehrane. Ena izmed takih snovi, ki kažejo kemopreventivne lastnosti je ksantohumol (XN), prenilirani flavonoid, ki se nahaja v hmelju (*Humulus lupulus L.* (*Cannabinaceae*)) in v nizkih koncentracijah tudi v pivu. Izredno učinkovito zavira genotoksične učinke HCA, kar kaže na njegovo potencialno uporabnost v obliki prehranskega ali farmacevtskega dopolnila za zaviranje nastanka raka.

V diplomski nalogi smo ugotavljali antimutagene in antigenotoksične lastnosti XN zoper delovanje MeIQx. Poskusi za ugotavljanje mutagenosti/antimutagenosti so potekali na bakteriji *Salmonella typhimurium*, sev TA98 (Amesov test). Mutacije smo povzročili z MeIQx in nato spremljali antimutageno delovanje XN. Rezultati so pokazali, da XN ne povzroča mutacij premika bralnega okvirja in da je v odvisnosti od doze znižal število z MeIQx induciranih revertant, s čimer smo potrdili njegovo antimutageno delovanje.

Potencialno antigenotoksično delovanje XN smo testirali na celični liniji humanega hepatoma (HepG2 celice), ki ima ohranjene metabolne encime I in II faze. Najprej smo s testom MTT preverili citotoksično delovanje samega XN in nato kombinacije MeIQx s XN. Ugotovili smo, da je le najvišja testirana koncentracija XN (100 µM) značilno znižala preživelost celic, medtem ko nižje koncentracije niso bile toksične za HepG2 celice. V kombinaciji z MeIQx XN ni vplival na citotoksično delovanje samega MeIQx, saj ni bilo razlike med delovanjem čistega MeIQx in kombinacije s XN. Nadalje smo spremljali delovanje XN na nivoju DNA. DNA poškodbe smo povzročili z MeIQx ter antigenotoksično delovanje XN spremljali s testom komet. XN je neodvisno od koncentracije zmanjšal količino DNA poškodb povzročenih z MeIQx.

S testom mikrojeder smo preverili ali XN poviša nastanek mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov in jedrnih brstov ter ali XN v kombinaciji z MeIQx zmanjša število teh

kromosomskih struktur. XN pri nobeni testirani koncentraciji ni povišal nastanka mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičev, kot tudi ne jedrnih brstov ter ni vplival na jedrni delitveni indeks. S tem testom nismo mogli primerno ovrednotiti antigenotoksičnega potenciala XN, saj MeIQx ni povišal števila mikrojeder kot tudi ne nukleoplazmatskih mostičev in jedrnih brstov v celicah HepG2. Zaradi tega nismo uspeli ovrednotiti razlik med celicami, ki smo jih izpostavili le MeIQx in celicami, ki smo jih izpostavili kombinaciji MeIQx s XN. Razlog je lahko premajhna občutljivost tega testa, oziroma nespecifičnost za zaznavanje poškodb, ki jih povzročajo HCA na celicah HepG2.

Mehanizem, po katerem XN zaščiti celice pred DNA poškodbami, poteka verjetno na ravni inhibicije encimov, ki so udeleženi pri aktivaciji MeIQx in z povišanjem izražanja encimov, ki sodelujejo pri detoksifikaciji tega mutagena. Zato smo z metodo kvantitativnega PCR v realnem času preverili ali XN vpliva na izražanje genov, ki so vpleteni v aktivacijo in detoksifikacijo ksenobiotikov. Preverili smo tudi ali se njihovo izražanje spremeni zaradi vpliva kombinacije MeIQx in XN.

XN je povečal izražanje določenih genov (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *UGT1A2*) predvsem pri višjih koncentracijah, med tem ko je izražanje drugih genov zmanjšal (*NAT2*, *SULT1A1*). V kombinaciji z MeIQx, XN ni biološko pomembno spremenil izražanje gena *CYP1A1* glede na sam MeIQx, med tem ko sta koncentraciji 1 in 10 µM v odvisnosti od doze statistično značilno znižali izražanje gena *CYP1A2* glede na sam MeIQx. 0.1 µM XN je statistično značilno povišal izražanje gena *CYP1A2* glede na MeIQX. XN v kombinaciji z MeIQx je le pri najvišji koncentraciji statistično značilno povišal izražanje gena *UGT1A* in *NAT2* glede na MeIQx. Vpliv na izražanje gena *SULT1A1* pa XN v prisotnosti MeIQx ni pokazal.

Raziskava je pokazala, da ima XN antimutagen in antigenotoksičen potencial zoper MeIQx ter da test mikrojeder ni primeren za ovrednotenje antigenotoksičnega potenciala zoper MeIQx. XN sam in v kombinaciji z MeIQx, pri določenih koncentracijah, spremeni tudi izražanje nekaterih genov vpletenih v presnova in metabolno aktivacijo MeIQx.

7 VIRI

- Abdulkarim B. G., Smith J. S. 1998. Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 11: 4680-4687
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573-589
- 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
- Aeschbacher H. U., Turesky R. J. 1991. Mammalian cell mutagenicity and metabolism of heterocyclic aromatic amines. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259, 3-4: 2235-250
- Ames B. N., Gold L. S., Willet W. C. 1995. Review: The causes and prevention of cancer. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 92: 5258-5265
- Anderson K. E., Kadlubar F. F., Kulldorff M., Harnack L., Gross M., Lang N. P., Barber C., Rothman N., Sinha R. 2005. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: Associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevew*, 14, 9: 2261-2265
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York, Garland publishing, inc. : 1294 str
- Alexander J., Wallin H., Rossland O. J., Solberg K. E., Holme J. A., Becher G., Andersson R., Grivas S. 1991. Formation of a glutathione conjugate and a semistable transportable glucuronide conjugate of N2-oxidized species of 2-amino-1- methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)in rat liver. *Carcinogenesis*, 12: 2239-2245
- Arimoto-Kobayashi S., Sugiyama C., Harada N., Takemura M., Hayatsu H. 1999. Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 221-230
- Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in medicini. *Farmacevtski Vestnik*, 55: 215-220
- Avula B., Ganzena M., Warnick J. E., Feltenstein M. W., Sufka K. J., Khan I. A. 2004. High performance liquid chromatografic determination of xanthohumol in rat plasma, urine, and fecal samples. *Journal Chromatographic Science*, 42, 7: 378-82
- Bel A. S., Ranford-Catwright L. C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology*, 18: 337-342
- Bendaly J., Zhao S., Neale J. R. 2007. 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline-induced DNA adduct formation and mutagenesis in DNA repair – deficient chinese hamster ovary cell expressing human cytochrome P4501A1 and rapid or slow acetylator N-acetyltransferaze 2. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16: 1503-1509
- Bertl B., Herhaus C., Kapadia G. 2004b. Inhibition of endothelial cell functions by novel potential anti-angiogenic agents. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 325: 287-295
- Bertl E., Klimo K., Heiss E. 2004a. Identification of novel inhibitors of angiogenesis using a human *in vitro* anti-angiogenesis assay. *Internnatiional Journal of Cancer Prevention*, 1: 47-61

- Bogen K. T., Keating G. A. 2001. U. S. dietary exposures to heterocyclic amines. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 11, 3: 155-168
- Bohm B.A. 1998. Introduction to flavonoids. *Chemistry and biochemistry of organic natural products*. Vol. 2. Amsterdam: Harwood Academic Publishers
- Boobis A. R., Gooderham N. J., Rich K. J., Zhao K., Edwards R. J., Murray B. P., Lynch A. M., Murray S., Davies D. S. 1995. Enzymatic studies of the activation of heterocyclic food mutagens in man. *Princess Takamatsu Symposium*, 23: 134–144
- Boobis A. R., Lynch A. M., Murray S., Tore R., Solans A., Farre M., Segura J., Gooderha, 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
- Botta B., Vitali A., Menendez P., Misiti D., Delle Monache G. 2005. Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 6: 717-39
- Boyce A., Doehmer J., Gooderham N. J. 2004. Phytoalexin resveratrol attenuates the mutagenicity of the heterocyclic amines 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8 dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Journal of Chromatography B*, 802 : 217-223
- Breneman J. W., Briner J. F., Ramsey M. J., Directr A., Tucker J. D. 1996. Cytogenetic results from a chronic feeding study of MeIQx in mice. *Food and Chemical toxicology*, 34: 717-724
- Briviba K., Sies H. 1994. Natural antioxidants in human health and disease. Academic press, San Diego, CA, 107-128
- Brodmann P. D., Ilg E., Berthaud H., Hermann A. 2002. Real-time quantitative polymerase chain methods for genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. *Journal of AOAC International*, 85, 3: 646-653
- 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
- Bu-Abbas A., Clifford M. N., Ioannides C., Walker R.. 1995. Stimulation of rat hepatic UDP-glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 27–30
- Buckwold V. E., Wilson R. J., Nalca A. 2004. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antiviral Research* 61: 57–62
- Busquets R., Bords M., Toribio F., Puignou L., Galceran M. T. 2004. Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 79-86
- Carter S. B. 1967. Effects of cytohalasins on mammalian cells. *Nature*, 213: 261-264
- Casaschi A., Maiyoh G. K., Rubio B. K. 2004. The chalcone xanthohumol inhibits triglyceride and apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *Journal Nutrition*, 134: 1340–1346
- Cheng K. W., Chen F., Wang M. 2006. Heterocyclic amines: Chemistry and health. *Mol. Nutrition Food Research*, 50: 1150-1170
- Chun Y. J., Kim M. Y., Guengerich F. P. 1999. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 262: 20–24
- Claxton L. D., Stewart-Houk V., Warren S. 2001. Methods for the spiral *Salmonella* mutagenicity assays incuding specialized applications. *Mutation Research*, 488: 241-257

- Coleman W. B., Tsongalis G. J. 1997. Molecular diagnostic for the clinical laboratorian. Totova, Human Press, 110-210
- Colins A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair, Principles, applications, and limitations. Molecular Biotechnology, 26, 3: 249-261
- Collins A. R., Dobson V. L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? Mutation Research, 375: 183-193
- Crofts F.G., Strickland P. T., Hayes C. L., Sutter T. R. 1997. Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by human cytochrome P4501B1. Carcinogenesis, 18, 9: 1793-1798
- Crofts F. G., Sutter T. R., Strickland P. T.. 1998. Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. Carcinogenesis, 19: 1969–1973
- Černa M., Pastorkova A., Šmid J., Bavorova H., Ocadlikova D., Rossner P., Zavadil J 1996. Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and *in vitro* cytogenetic assays. Toxicology Letters, 88: 191-197
- Černa M., Pastorkova A., Šmid J., Dobiaš L., Rossner P. 1998. The use of YG bacterial strains for the monitoring of drinking water mutagenicity. Toxicology Letters, 96/97: 335-339
- Dargel. R. 1992. Lipid peroxidation-a common pathogenetic mechanism? Experimental and Toxicologic Pathology, 44, 4: 169-181
- Dashwood R. H. 2002. Review Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. Mutation Research, 511: 89-112
- 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
- Dermastia M. 2006. Sekundarni metaboliti. Zbornik projektov problemsko orientiranega učenja študentov prvega letnika študija Biologija 2005/2006. (http://botanika.biologija.org/predmeti/BIO-1L-0506-POU_Zbornik.pdf (10. Jan. 2011)
- Dhar A. K., Bowers R. M., Licon K. S., LaPatra S. E. 2008. Detection and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by SYBR green real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 147: 157-166
- Dietz B. M., Kang Y. H., Liu G., Eggler A. L., Yao P., Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R., Mesecar A. D., Breemen R. B., Bolton J. L. 2005. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. Chemical Research in Toxicology 18: 1296–1305.
- Dumont J., Josse R., Lambert C., Anthérieu, Laurent V., Loyer P., Robin M. A., Guillouzo A. 2010. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. Toxicology and Applied Pharmacology, 249, 1: 91-100
- Dutton G. J. 1980. Glucuronidation of drugs and other compounds. CRC Press, Boca Raton, Florida 1980.
- Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). 2004. Real-time PCR an essential guide. Norfolk, Horizon bioscience: 346 str

- Edwards R. J., Murray B. P., Murray S., Schulz T., Neubert D., Gant T.W., Thorgeirsson S. S., Boobis A. R., Davies D. S. 1994. Contribution of CYP1A1 and CYP1A2 to the activation of heterocyclic amines in monkeys and human. *Carcinogenesis*, 15 :829–836
- Espy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A. 2006. Real Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 1: 165–256
- Felton J. S., Jägerstad M., Knize M.G., Skog K., Wakabayashi K. 2000. Contents in food, beverages and tobacco. V: Food borne carcinogenes. Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.). New York, John Wiley and Sons, LTD: 31-72
- Felton J. S., Knize M. G. 1990. Heterocyclic-amine mutagens/carcinogens in foods. V: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Cooper C. S., Grover P. L. (eds.). I, Springer-Verlag, Berlin, 94: 471–502
- Felton J. S., Knize M. G., Benett L. M., Malfatti M. A., Colvin M. E., Kulp K.S. 2004. Impact of environmental exposures on the mutagenicity/carcinogeneity of heterocyclic amines. *Toxicology*, 198: 135-145
- Felton J. S., Knize M. G., Cynthia P. S., Malfatti M. A., Kulp K. S. 2002. Human exposure to heterocyclic amine food mutagens/carcinogens: Relevance to breast cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39: 112-118
- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285, 1: 35-44
- Fenech M., Crott J. W. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, 504: 131–136
- Fennell J. P., Baker A. H. 2005. Hypertension: methods and protocols. Totowa, Humana Press: 501
- Ferk F., Huber W. W., Filipič M., Bichler J., Haslinger E., Mišík M., Nersesyan A., Grasl-Kraupp B., Žegura B., Knasmüller S. 2010. Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*, 691, 1-2: 17-22
- Filipič M. 1995. Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area. *Mutation Research*, 342: 1-8
- Flamand N., Meunier J. R., Meunier 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
- Forster A., Koberlein A. 1998. The location of xanthohumol from hops during beer production. *Brauwelt*, 138: 1677–1679
- Frantz C. E., Bangerter C., Fultz E., Mayer K. M., Vogel J. S., Turteltaub K. W. 1995. Dose–response studies of MeIQx in rat liver and liver DNA at low doses. *Carcinogenesis*, 16: 367–374
- Furihata C., Matsushima T. 1986. Mutagens and carcinogens in foods. *Annual Reviews Nutritions*, 6: 67–94
- Galati G., O'Brien P. J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 3: 287-303

- Gauvin J., Broyde S., Shapiro R. 2001. The food mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline: A conformational analysis of its major DNA adduct and comparison with the 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline adduct. *Chemical Research Toxicology*, 14: 476-482
- Gaylor, D. W., Kadlubar F. F. 1991. Quantitative cancer risk assessment of heterocyclic amines in cooked foods, V: Mutagens in food: Detection and prevention. Hayatsu H. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 229–236
- Gerhäuser C. 2005a. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus L.*) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition Food Research*, 49, 9: 827-831
- Gerhäuser C. 2005b. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal Cancer*, 41, 13: 1941-54
- Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauf J., Neumann I., Scherf H. R., Frank N., Bartsch H., Becker H. 2002. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 959–969
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallome B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 356-401
- Glasenčnik E., Ribarič-Lasnik C., Savinek K., Zaluberšek M., Mueller M., Batič F. 2004. Impact of air pollution on genetic material of (*Allium cepa L.* var. *ascalonicum*) exposed at differently polluted sites of Slovenia. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49: 363-376
- Glatt H. 2006. Metabolic factors affecting the mutagenicity of heterocyclic amines. V: Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods. Skog K., Alexander J. (eds.). Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, bia: 358–404
- Gold L. S., Slone T. H., Manley N. B., Ames B. N. 1994. Heterocyclic amines formed by cooking food: comparison of bioassay results with other chemicals in the carcinogenic potency database. *Cancer Letters*, 83: 21–29
- Gooderham N. J., Murray S., Lynch A. M., Yadollahi-Farsani M., Zhao K., Boobis A. R., Davies S. D. 2001. Food-derived heterocyclic amine mutagens: variable metabolism and significance to humans. *Drug Metabolism Disposition*, 29, 4: 529-534
- Gooderham N. J., Watson D., Rice J. C., Murray S., Taylor G. W., Davies D. S. 1987. Metabolism of the mutagen MeIQx in vivo: Metabolite screening by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148: 1377–1382.
- Goto K., Asai T., Hara S. 2005. Enhanced antitumour activity of xanthohumol, a diacylglycerol acyltransferase inhibitor, under hypoxia. *Cancer Letters*, 219: 215–222
- Grant D. M., Hughes N. C., Janezic S. A., Goodfellow G. H., Chen H. J., Gaedigk A., Yu V. L., Grewal R. 1997. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutation Research*, 376: 61–70
- Gutteridge J. M. C., Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15, 4: 129-135
- Hammons G. J., Milton D., Stepps K., Guengerich F. P., Kadlubar, F. F. 1997. Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis*, 18: 851–854

- Harborne J. B., Baxter H., Moss G.P. 1999. London: Editors, Pyrochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.), Taylor & Francis: 976 str
- He Y. H., Smale M. H., Schut H. A. 1997. Chemopreventive properties of indole-3-carbinol (I3C): inhibition of DNA adduct formation of the dietary carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), in female F344 rats. *Journal Cellular Biochemistry*, 27: 42–51
- Heddle J. A. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutation Research*, 18: 187-192
- Heddle J. A., Cimino M. C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M. D., Tucker J. D., Vanparys P., MacGregor J. T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environmental and molecular mutagenesis*, 18: 277–291
- Hegarat L. L., Dumont J., Josse R., Huet S., Lanceleur R., Mourot A., Poul J. M., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A., Fessard V. 2010. Assesment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, 25, 6: 555-560
- Hein I., Flekna G., Krassing M., Wagner M. 2006. Real-time PCR for detection of *Salmonella* ssp. In food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the Food-PCR project. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 538-547
- Hein D. W., Rustan D. T., Ferguson R. J., Doll M. A., Gray K. 1994. Metabolic activation of aromatic and heterocyclic arylamines by wild type mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Archives Toxicology*, 68: 129-133
- Hellmold H., Rylander T., Magnusson M., Reihner E., Warner M., Gustafsson J.A. 1998. Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83: 886–895
- Henderson M. C., Miranda C. L., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R. 2000. *In vitro* inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*, 30, 3: 235-51
- Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. 1998. The ability of the Comet assay to dicriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13, 1: 89-94
- Hernaez J., Xu M., Dashwood R. 1997. Effects of tea and chlorophyllin on the mutagenicity of N-hydroxy-IQ: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation, and degradation/scavenging of the active metabolites. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 30: 468–474
- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije-teoretični del. Ljubljana, Študentska založba: 59-64
- Ho T. A., Coutts T. M., Rowland I. R., Alldrick A. J. 1992. Inhibition of the metabolism of mutagens occurring in food by arachidonic acid. *Mutation Research*, 269: 279–284
- Hodek P., Križkova J., Burdova K., Šulc M., Hudeček J., Stiborova M. 2009. Chemopreventive compounds-View from the other side. *Chemico-Biological Interactions*, 180, 1: 1-9
- Hodek P., Trefil P., Stiborova M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochrome P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139: 1-21
- Hoffmann G. R., Fuchs R. P. 1997. Mechanisms of frameshift mutations: Insight from aromatic amines. *Chemical Resarch in Toxicology*, 10: 347–359

- Hollman P.C., Katan M.B. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effect and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 937-942
- Horváthová E., Slamenová D., Hlincíková L., Mandal T. K., Gábelová A., Collins A. R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research*, 409, 3: 163-171
- Jakše J. 2007. Rastlinksa biotehnologija: Vaje 2006/2007: Vaja 4: Verižna reakcija s polimerazo (PCR), PCR ITS regije in RAPD markerji. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 1-19
- Jägerstad M., Reuterswärd A. L., Olsson R., Grivas S., Nyhammar T., Olsson K., Dahlqvist A. 1983. Creatin(in)e and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds: Effects of various amino acids. *Food Chemistry*, 12, 4: 255-264
- Jägerstad, M., Skog, K., Arvidsson, P., Solyakov, A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Food Research and Technology*, 207, 6: 419 –427
- Jägerstad M., Skog K., Grivas S., Olsson K. 1991. Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutation Research*, 259: 219–233
- Jeršek B. 2003. Higiena živil: laboratorijske vaje za predmet Higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Kac J., Plazar. J., Mlinariš A., Žegura B., Lah T.T., Filipič M. 2008. Antimutagenicity of hops (*Humulus lupulus* L.): bioassay-directed fractionation and isolation of xanthohumol. *Phytomedicine* 15; 216-220
- Kang I. H., Kim H. J., Oh H., Park Y. I., Dong M. S. 2004. Biphasic effects of the flavonoids quercetin and naringenin on the metabolic activation of 2-amino- 3,5-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline by *Salmonella typhimurium* TA1538 co-expressing human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5. *Mutation Research*, 545: 37–47
- 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, 4: 747-752
- Kato T., Harashima T., Moriya N., Kikugawa K., Hiramoto K. 1996. Formation of the mutagenic/carcinogenic imidazoquinoxaline-type heterocyclic amines through the unstable free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidants. *Carcinogenesis*, 17: 2469–2476
- Kato T. H., Ohgaki H., Hasegawa S., Sato S., Takayama S., Sugimura T. 1988. Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Carcinogenesis*, 9: 71–73
- Keating G. A., Bogen K. T. 2004. Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 802: 127–133
- Kikugawa K., Kato T., Hiramoto K., Takada C., Tanaka M., Maeda Y., Ishihara T. 1999. Participation of the pyrazine cation radical in the formation of mutagens in the reaction of glucose/glycine/creatinine. *Mutation Research*, 444: 133-144
- King R. S., Kadlubar F. F., Turesky R. J. 2000. *In vivo* metabolism of heterocyclic amines. V: Food Borne Carcinogens: Heterocyclic Amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.). John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, 90–111

- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitation. Trends in Molecular Medicine, 8, 6: 257-260
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana H. G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. Journal Molecular Biology, 14, 56, 2: 341-61
- Knasmüller S., Cavin C., Chakraborty A., Darroudi F., Majer B. J., Ehrlich V. 2004a. Structurally related mycotoxins, ochratoxin A, ochratoxin B, citrinin differ in their genotoxic activities, and in their mode of action in human derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. Nutrition and Cancer, 50, 2: 190-197
- Knasmüller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W. W., Hoelzl C., Bichler J., Majer B. J. 2004b. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. Toxicology, 198, 1-3: 315-328
- Knasmüller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A. T. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutatation Research, 402: 185–202
- Knasmüller S., Schwab C., Land S., Wang C., 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
- Knize M. G., Dolbeare F. A., Carroll K. L., Moore D. H., Felton J. S. 1994. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. Food and Chemical Toxicology, 32: 595–603.
- Kohn KW. 1991. Principles and practice of DNA filter elution. Pharmacology Therapeutics, 49:55–77
- Kushida H., Wakabayashi K., Sato H., Katami M., Kurosaka R., Nagao M. 1994. Dose-response study of MeIQx carcinogenicity in F344 male rats. Cancer Letters, 83, 1-2: 31-35
- Lan C. M., Kao T. H., Chen B. H. 2004. Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods. Journal of Chromatography B, 802: 27-37
- Langouët S., Paehler A., Welti D. H., Kerriguy N., Guillouzo A., Turesky R. J. 2002. Differential metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridine in rat and human hepatocytes. Carcinogenesis 23: 115–122
- Layton D. W., Bogen K. T., Knize M. G., Hatch F. T., Johnson V. G., Felton J. S. 1995. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: An analysis and implications for research. Carcinogenesis, 16: 39–52
- Lewis A. J., Walle U. K., King R. S., Kadlubar F. F., Falany C. N., Walle T. 1998. Bioactivation of the cooked food mutagen *N*-hydroxy-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridine by estrogen sulfotransferase in cultured human mammary epithelial cells. Carcinogenesis, 19: 2049–2053
- Lin J. H., Lu A. Y. H. 1998. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. Clinical Pharmacokinetic, 35: 361-390
- Lodovici M., Grassi M., Dolara P. 1989. *In vitro* DNA binding of 2-amino-3- methylimidazo(4,5-*f*)[5- 3H]quinoline (IQ) is modulated by sulfotransferase and sulfate levels. Mutation Research, 223: 321–324

- Luch A. 2005. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nature Reviews*, 5, 113-125
- Mackay I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiological laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190-212
- Mackay I. M., Arden E. K., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6: 1292-1305
- Majer B. J., Kassie F., Sasaki Y., Pfau W., Glatt H., Meirl W., Darroudi F., Knasmüller S. 2004. Investigation of the genotoxic effects of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole in different organs of rodents and in human derived cells. *Journal of Chromatography B*, 802: 167-173
- Manabe S., Izumikawa S., Asakuno K., Wada O., Kanai Y. 1991b. Detection of carcinogenic amino-alpha-carbolines and amino-gamma-carbolines in diesel-exhaust particles. *Environmental Pollution*, 70: 255-265
- Manabe S., Tohyama K., Wada O., Aramaki T. 1991a. Detection of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, in cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis*, 12: 1945-1947
- Margalhães P. J., Carvalho D. O., Cruz J. M., Guido L. F., Barros A. A. 2009. Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Natural Product Communications*, 4, 5: 591-610
- Maron D. M., Ames B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutatation Research*, 113: 173-215
- Maron D. M., Ames B. N. 1984. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test V: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Kilbey B. J., Legator M. S., Nochols W., Ramel C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 93-140
- Mauthe R. J., Dingley K. H., Leveson S. H., Freeman S. P., Turesky R. J., Garner R. C., Turteltaub K. W. 1999. Comparison of DNA-adduct and tissue-available dose levels of MeIQx in human and rodent colon following administration of a very low dose. *International Journal Cancer*, 80: 539-545
- McManus M. E., Felton J. S., Knize M. G., Burgers W. M., Roberts-Thomson S., Pond S. M., Stupans J., Veronese M. E. 1989. Activation of the food-derived mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by rabbit and human liver microsomes and purified forms of cytochrome P450. *Carcinogenesis*, 10: 357-363
- McManus M., Burgess W. M., Veronese M. E., Huggett A., Quattrochi L. C., Tukey R. H. 1990. Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450. *Cancer Research*, 50: 3367-3376
- Merken H. M., Beecher G. R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 577-599
- Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. 2000. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacology Review*, 52: 673-751
- Miller, A. J. 1985. Processing-Induced Mutagens in Muscle Foods. *Food Technology*, 39: 75-79
- Milic B. L., Djilas S. M., Candadanoic-Brunet J. M. 1993. Synthesis of some heterocyclic Aminoimidazoazarenes. *Food Chemistry*, 46: 273-276

- Miranda C. L., Aponso G. L. M., Stevens J. F., Deinzerb M. L., Buhler D. R. 2000a. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letters*, 149: 21-29
- Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Buhler D. R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 5: 271-285
- Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R. 2000b. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3876-3884
- Miranda C. L., Yang Y. H., Henderson M. C., Stevens J. F., Santana-Rios G., Deinzer M. L., Buhler D. R. 2000c. Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metabolism and Disposition*, 28: 1297-1302
- Moon Y. J., Wang X., Morris M. E. 2006. Dietary flavonoids: effect on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, 20: 187-210
- Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63
- Mortelmans K., Zieger E. 2000. The Ames Salmonella microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60
- Mottram D. S. 1998. Flavor formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62, 4: 415-424
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 3-10
- Nadathur S. R., Carney J. R., Gould S. J., Bakalinsky A. T. 1996. Palmitic acid is the major fatty acid responsible for significant anti-N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) activity in yoghurt. *Mutation Research*, 359: 179-189
- Nagao M. 2000. Mutagenicity. V: Food borne carcinogens. Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.). New York, John Wiley, LTD: 163-196
- Narziß L. 2004. Abriß der Bierbrauerei. Weinheim, Wiley-VCH: 439 str
- Natarajan A. T., Darroudi F. 1991. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis*, 5: 399-403
- 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.
- Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time Rt-PCR. *Nature Protocols*, 1, 3: 1559-1582
- Nookandeh A., Frank N., Steiner F., Ellinger R., Schneider B., Gerhäuser C., Becker H. 2004. Xanthohumol metabolites in faces of rats. *Phytochemistry*, 65, 5: 561-70

- Nozawa H., Nakao W., Takata J., Arimoto-Kobayashi S., Kondo K. 2006. Inhibition of PhIP-induced mammary carcinogenesis in female rats by ingestion of freeze-dried beer. *Cancer Letters*, 235: 121-129
- Nozawa H., Tazumi K., Sato K., Yoshida A., Takata J., Arimoto-Kobayashi S., Kondo K. 2004. Inhibitory effects of beer on heterocyclic amine-induced mutagenesis and PhIP-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Mutation research* 559: 177-187
- Ochiai M., Nagaoka H., Wakabayashi K., Tanaka Y., Kim S. B., Tada A., Nukaya H., Sugimura T., Nagao M. 1993. Identification of N²-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline 3',5'-diphosphate, a major DNA adduct, detected by nuclease P1 modification of the ³²P-postlabeling method, in the liver of rats fed MeIQx. *Carcinogenesis*, 10: 2165–2167
- Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 567: 109-149
- Ohgaki H., Hasegawa H., Suenaga H., Sato S., Takayama S., Sugimura T. 1987. Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline. *Carcinogenesis*, 8: 665–668
- Ohgaki H., Takayama S., Sugimura T. 1991. Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. *Mutation Research*, 259: 399–410
- Olive P. L., Banáth J. P., Durand R. E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122, 86–94
- Otsuka C., Mura K. F., IShidate M. Jr. 1996. The possible role of acetyltransferase in the induction of cytogenetic effects by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 371, 1-2: 23-28
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2006. Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chemistry*, 104: 67-72
- Ozawa S., Chou H.-C., Kadlubar F. F., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R. 1994. Activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by cDNA-expressed human and rat arylsulfotransferases. *Japanese Journal Cancer Research*, 85: 1220–1228
- Pais P., Knize M. G. 2000. Chromatographic and related techniques for the determination af aromatic amines in foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 747, 1-2: 139-169
- Palamand S. R., Aldenhoff J. M. 1973. Bitter tasting compounds of beer. Chemistry and taste properties of some hop resin compounds. *Journal af Agricultural and Food Chemistry*, 21: 535- 543
- Palka K. 2004. Heat effects on meat. Physics and chemistry. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 2. Jensen W.K., D evine C., Dikeman M. (eds.). 1st ed. oxford, Elsevier Ltd.; 567-570
- Pang Y., Nikolic D., Zhu D., Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R., Van Breemen R. B. 2007. Binding of the hop (*Humulus lupulus* L.) chalcone xanthohumol to cytosolic ptoteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 872-879
- Parry E. M., Henderson L., Mackay J. M. 1995. Guidelines for testing of chemicals. Procedures for the detection of chemically induced aneuploidy: Recommendations of a UK Enviromental Mutagen Society working group. *Mutagenesis* 10, 1: 1-14
- Pearson A. M., Chen C., Gray J. I., Aust S. D. 1992. Mechanism(s) involved in meat mutagen formation and inhibition. *Free Radical Biolgy and Medicine*, 13: 161–167

- Pegg R.B., Shahidi F. 2004. Heat effects on meat. Flavour development. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 2. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1st ed. Oxford, Elsevier Ltd.; 570-578
- Pfau W., Martin F. L., Cole K. J., Venitt S., Philips D. H., Grover P. L., Marquardt H. 1999. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20, 4: 545-551
- Plazar J., Filipič M., Groothuis M. M. 2008. Antigenotoxic effects of Xanthohumol in rat liver slices. *Toxicology in Vitro*: 22, 2: 318-327
- Plazar J., Žegura B., Lah Turenšek T., Filipič M. 2007. Protective effect of xanthohumol against genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3methylimidazol(4,4-f)quonoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutation Research*, 632: 1-8
- Plochman K., Korte G., Koutsilieri E., Richling E., Riederer P., Rethwilm A., Schreier P., Scheller C. 2007. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460, 1: 1-9
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400
- Prediger E., Smith T., Brown C. 2008. Molecular guide for stem cell researchers. Applied Biosystems: 104 str.
- Reid S. E., Murthy M. S., Kaufman M. 1996. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *British Journal Surgery*, 83: 1037–1046
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medical Research review*, 23: 519-534
- Rice-Evans C 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 797-807
- Rich K., Murray B. P., Gooderham N. J., Lewis I., Davies D. S., Boobis A. R. 1992a. CYP1A2 is responsible for the hepatic microsomal metabolism of MelQx to N-hydroxy-MelQx in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 33: 213
- Rich K., Murray B. P., Lewis I., Rendell N., Davies D. S., Gooderham N. J., Boobis A. R. 1992b. N-hydroxy-MelQx is the major microsomal oxidation product of the dietary carcinogen MelQx with human liver. *Carcinogenesis (Lond.)*, 13: 2221-2226
- Richards G. P., Watson M. A., Kingsley D. H. 2004. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. *Journal of Virological Methods*, 116: 63-70
- 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
- Rodriguez R. J., Miranda C. L., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R. 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 5: 437-445
- Rosenvold K., Baltzer M., Aaslyng M. D., Støier S. 2004. Water loss from pork during cooking – does pH during cooking have an impact? V: 50th International Congress of Meat Science and Technology, august 8th – 13th, 2004, Helsinki, Finland: Proceedings. Helsinki, University of Helsinki, department of Food Technology: CD-ROM: 7str

- Ruefer C. E., Gerhäuser C., Frank N., Becker H. Kulling S. E. 2005. *In vitro* phase II metabolism of xanthohumol by human UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Molecular Nutrition Food Research*, 49: 851-856
- Santana-Rios G., Orner G. A., Xu M., Izquierdo-Pulido M., Dashwood R. H. 2002. Inhibition by white tea of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Nutrition and Cancer*, 41, 1-2: 98-103
- Sanyal R., Darroudi F., Parzefall W., Nagao M., Knasmüller S. 1997. Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis* 12, 4: 297-303
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31: 9-15
- Schut H. A., Dashwood R. H. 1995. Inhibition of DNA adduct formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by dietary indole-3-carbinol (I3C) in the mammary gland, colon, and liver of the female F344 rat. *Ann. New York Academic Science*, 768: 210-214
- Schut H. A., Snyderwine E. G. 1999. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: Implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20: 353-368
- Shahidi F., Samaranayaka A. G. P., Pegg R. B. 2004. Heat effects on meat. Maillard reaction and browning. Vol. 2. V: Encyclopedia of meat sciences. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1st ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 578-592
- Sharma R. A., Harris A. L., Dalgleish A. G. 2001. Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. *Lancet Oncology*, 2: 726-732
- Shih H., Pickwell G. V., Quattrochi L. C. 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Archives Biochemistry Biophysics*, 373: 287-294
- Shimadu T., Iwasaki M., Martin M. V., Guengerich F. P. 1989. Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002. *Cancer Research*, 49: 3218-3228
- Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G. M. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal Cell Biology*, 140: 1307-1320
- Shimizu N., Shimura T., Tanaka T. 2000. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutatation Research*, 448: 81-90
- Siddiqui A. H., Ahmad M. 2003. The *Salmonella* mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India. *Mutation Research*, 541: 21-29
- 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., Chow W. H., Kulldorff M., Denobile J., Butler J., Garcia-Closas M., Weil R., Hoover R. N., Rothman N. 1999. Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer research*, 59: 4320-4324
- Sinha R., Knize M. G., Salmon C. P., Brown E. D., Rhodes D., Felton J. S., Levander O. A., Rothman N. 1998a. Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 289-297

- Sinha R., Kulldorff M., Chow W. H., Denobile J., Rothman N. 2001. Dietary Intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 10: 559-562
- Sinha R., Kulldorff M., Swanson C. A., Curtin J., Brownson R. C., Alavanja M. C. R. 2000. Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among missouri women. *Cancer Research*, 60: 3753-3756
- Sinha R., Rothman N., Brown E. D., Salmon C. P., Knize M. G., Swanson C. S., Rossi S. C., Mark S. D., Levander O. A., Felton J. S. 1995. High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6 phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Research*, 55: 4516-4519
- Sinha R., Rothman N., Salmon C. P., Knize M. G., Brown E. D., Swanson C. A., Rhodes D., Rossi S., Felton J. S., Levander O. A. 1998b. Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 279-287
- Sjodin P., Wallin H., Alexander J., Jägerstad M. 1989. Disposition and metabolism of the food mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in rats. *Carcinogenesis*, 10:1269 1275
- Skog K., Eneroth A., Svanberg M. 2003. Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 3: 313-323
- Skog K., Solyakov A., Arvidsson A., Jägerstad M. 1998. Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 803: 227-233
- Skog, K., Solyakov, A., Jägerstad, 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
- Smaka-Kincl V. 1993. Ocenitev kvalitete odpadnih, površinskih in podtalnih voda z Allium testom. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, 154 strani
- Snyderwine, E. G., Davis C. D., Nouso K., Roller P. P., Schut H. A. 1993. ^{32}P -postlabeling analysis of IQ, MeIQx and PhIP adducts formed *in vitro* in DNA and polynucleotides and found *in vivo* in hepatic DNA from IQ-, MeIQx- and PhIP-treated monkeys. *Carcinogenesis*, 14: 1389-1395
- Snyderwine E. G., Wirth P. J., Roller P. P., Adamson R. H., Sato S., Thorgeirsson S. S. 1988. Mutagenicity and *in vitro* covalent DNA binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis*, 9: 411-418
- Stahl R. G. Jr. 1991. The gentic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22: 94-125
- Stevens J. F., Cristobal L., Miranda C. L., Frei B. 2003. Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: The α,β -unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chemical Research in Toxicology*, 16, 10: 1277-1286
- Stevens J. F., Page J. E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good helath. *Phytochemistry*, 65: 1317-1330
- Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L. 1999. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832, 1-2: 97-107

- Stillwell W. G., Turesky R. J., Gross G. A., Dkipper P. L., Tannenbaum S. R. 1994. Human urinary excretion of sulfamate and glucuronide conjugates of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *Cancer epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 3: 399-405
- Stoner G. D., Morse M. A., Kelloff G. J. 1997. Perspectives in cancer chemoprevention. *Environmental Health Perspectives*, 105: 945–954
- Sugimura, T. 1986. Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan. *Science*, 233, 312 –315
- 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. *Mutatation Research*, 205: 33–39
- Sugimura T. 1997. Overwiev of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research*, 376, 1-2: 211-219
- Sugimura T., Nagao M., Kawachi T., Honda M., Yahagi T., Seino Y., Sano S., Matsukura T., Matsushima T., Usui A., Sawamura M., Matsumoto H. 1977. Mutagen-carcinogens in foods, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. V: Origins of human cancer. Hiatt H. H., Watson J. D., Winsten J. A. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour New York, N.Y., pp. 1561 –1577.
- Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95: 290–299
- Tabata N, Ito M., Tomoda H. 1997. Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* 46: 683–687
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. 4. Editions. USA, Sunderland (Mass.), Sinauer Associates: 764 str
- Takahashi E., Fujita K., Kamataki T., Arimoto-Kobayashi S., Okamoto K., Negishi T. 2002. Inhibition of human cytochrome P450 1B1, 1A1 and 1A2 by antigenotoxic compounds, purpurin and alizarin. *Mutation Research*, 508- 147-156
- 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
- Thiébaud H. P., Knize M. G., Kuzmicky P. A., Hsieh D. P., Felton J. S. 1995. Airborne mutagens produced by frying beef, pork and soy-based food. *Food and Chemicalal Toxicology*, 33: 821–828
- Tice R. R. Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221
- Toribio F., Moyano, E., Puignou L., Galceran M. T. 2002. Ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography A*, 948: 267 –281.
- Turesky R. J. 2002. Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. *Drug Metabolism*, 34: 625–650
- Turesky R. J. 2005. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Molular Nutrition Food Research*, 49: 101-117
- Turesky R. J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168, 3: 219.227

- Turesky R. J. 2010. Heterocyclic aromatic amines. V: Advances in molecular toxicology. Fishbein J. C (ed.). Baltimore, USA, Bia: 37-83
- Turesky R. J., Bracco Hammer I., Markovic J., Richli U., Kappeler A. M., Welti D. H. 1990. The contribution of N-oxidation to the metabolism of the food-borne carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in rat hepatocytes. Chemical Research in Toxicology, 3: 524-535
- Turesky R. J., Constable A., Richoz J., Varga N., Markovic J., Martin M. V., Guengerich F. P.. 1998. Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. Chemical Research in Toxicology, 11: 925–936
- Turesky R. J., Aeschbacher H. U., Wurzner H. P., Skipper P. L., Tannenbaum S. R. 1988. Major routes of metabolism of the food-borne carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in the rat. Carcinogenesis 9: 1043–1048
- Turesky R. J., Lang N. P., Butler M. A., Teitel C. H., Kadlubar E F.1991. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. Carcinogenesis (Lond.), 12: 1839-1845
- Turesky R. J., Rossi S. C., Welti D. H., Lay J. O. Jr., Kadlubar, F. F. 1992. Characterization of DNA adducts formed *in vitro* by reaction of N-hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and N-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline at the C-8 and N2 atoms of guanine. Chemical Research Toxicology, 5, 4: 479–490
- Turesky R. J., Taylor J., Schnackenberg L., Freeman J. P., Holland R. D. 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., Vouros P. 2004. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine- DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. Journal of Chromatography B Analytical Technology in the Biomedical and Life Science, 802: 155–166
- Turesky R. J., Gross G. A., Stillwell W. G., Skipper P. L., Tannenbaum S.R. 1994. Species differences in metabolism of heterocyclic aromatic amines, human exposure, and biomonitoring. Environmental Helth Perspective, 102, 6: 47–51
- Turteltaub K. W., Knize M. G., Healy S. K., Tucker J. D., Felton J.S. 1989. The metabolic disposition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the induced mouse. Food Chemical Toxicology, 27: 667–673
- Turteltaub K. W., Mauthe R. J., Dingley K. H., Vogel J. S., Frantz C. E., Garner R. C., Shen N. 1997. MeIQx-DNA-adduct formation in rodent and human tissues at low doses. Mutation Research, 376: 243–252
- Umbuzeiro G. A., Roubicek D. A., Rech C. M. 2004. Investigation the sources of the mutagenic activity found in a river using *Salmonella* assay and the different water extraction procedures. Chemosphere, 54: 1589-1597
- Valasek M. A., Repa J. J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29: 151-159
- Vargas V. M. F., Motta V. E. P., Henriques J. A. P. 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. Mutation Research, 319: 31-45
- Vereskuns G., Wesén C., Skog K., Jägerstad M. 1998. Inhibitory effect of *threo*-9,10-dichlorostearic acid on the mutagenic activity of MeIQx, 2-AF and B[a]P in the Ames/*Salmonella* test. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 416, 3, 14: 149-157

- Wakabayashi K., Totsuka Y., Fukutome K., Oguri A., Ushiyama H., Sugimura T. 1997. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β -carbolinec Mutatation Research, 376: 253–259
- Wakabayashi K., Sugimura T. 1998. Heterocyclic amines formed in the diet: carcinogenicity and its modulation by dietary factors. Journal of Nutritional Biochemistry, 9, 11: 604-612
- Wallin H., Holmes J. A., Alexander J. 1992. Covalent binding of food carcinogens MeIQx, MeIQ and IQ to DNA and protein in microsomal incubations and isolated hepatocytes. Pharmacology and Toxicology, 70: 220–225
- Walters D. G., Young P. J., Agus C., Knize M. G., Boobis A. R., Gooderham N. J., Lake B. G. 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 Q., Ding Z. H. Liu J. K. 2004. Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from hops *Humulus lupulus*. Antiviral Research, 64: 189–194
- Watkins B. E., Esumi H., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T. 1991a. Fate and distribution of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in rats. Carcinogenesis, 12: 1073–1078
- Watkins B. E., Susuki M., Wallin H., Wakabayashi K., Alexander J., Vanderlaan M., Sugimura T., Esumi H. 1991b. The effect of dose and enzyme inducers on the metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in rats. Carcinogenesis, 12: 2291–2295
- Weisburger J. H., Nagao M., Wakabayashi K., Oguri A. 1994. Prevention of heterocyclic amine formation by tea and tea polyphenols. Cancer Letters, 83, 1-2: 143-147
- 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. Mutatation Research, 390: 93–103
- Wunderlich S., Zurcher A., Back W. 2005. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. Molecular Nutrition and Food Research, 49: 874-881
- Xu M., Bailey A. C., Hernaez J. F., Taoka C. R., Schut H. A., Dashwood R. H. 1996. Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. Carcinogenesis, 17: 1429–1434
- Xu M., Schut H. A., Bjeldanes L. F., Williams D. E., Bailey G. S., Dashwood R. H. 1997. Inhibition of 2-amino 3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA adducts by indole-3-carbinol: dose-response studies in therat colon. Carcinogenesis, 18: 2149–2153
- Yamashita K., Adachi M., Kato S., Nakagama H., Ochiai M., Wakabayashi K., Sato S., Nagao M., Sugimura T. 1990. DNA adducts formed by 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in rat liver: dose-response on chronic administration. Jpn. J. Cancer Res., 81: 470–476
- Yamazaki H., Mimura M., Oda Y., Inui Y., Shiraga T., Iwaki K., Guengerich F. P., Shimada T. 1993. Roles of different forms of cytochrome P450 in the activation of the promutagen 6-amino chrysene to genotoxic metabolites in human liver microsomes. Carcinogenesis, 14: 1271–1278
- Yamazoe Y., Abu-Zeid M., Manabe S., Toyama S., Kato R. 1988. Metabolic activation of a protein pyrolysate promutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline by rat liver microsomes and purified cytochrome P-450. Carcinogenesis, 9: 105-109
- Yamazoe Y., Nagata K., Yoshinari K., Fujita K., Shiraga T., Iwasaki K. 1999. Sulfotransferase catalyzing sulfation of heterocyclic amines. Cancer Letters, 143: 103–107

- Yanagawa Y., Sawada M., Deguchi T., Gonzalez F. J., Kamataki T. 1994. Stable expression of human CYP1A2 and Nacetyltransferases in Chinese hamster CHL cells: mutagenic activation of 2-amino-3-methylimidazol[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazol[4,5-f]quinoxaline. *Cancer Research*, 54: 3422–3427
- Yilmazer M., Stevens J. F., Buhler D. R. 2001a. *In vitro* glucoronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS letters*, 491, 3: 252-256
- Yilmazer M., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R. 2001b. *In vitro* biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29: 223-231
- Yun C. H., Jeong H. G., Jhoun J. W., Guengerich F. P. 1995. Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 16: 1437–1440
- Zhao F., Nozawa H., Daikonna A., Kondo K., Kitanaka S. 2003. Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1: 61-65
- Zhao K., Gooderham N. J., Rich K., Boobis A. R., Davies D. S. 1992. Metabolic activation of the cooked food mutagen PhIP is via N-hydroxylation, catalysed by CYP1A2, in human liver microsomes. Abstracts of the VI International Congress of Toxicology, Rome Toxicology Letters (Amst.), 303
- Östling O., Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 123: 291–298
- 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. (eds). Totowa, Humana Press: 301-313

ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil dr. Bojani Žegura, ki me je potrpežljivo in prijazno vodila skozi raziskovalno delo ter bila vedno pripravljena odgovarjati na moja vprašanja. Hvala za koristne nasvete, pomoč in pripombe pri pisanju diplomske naloge.

Hvala mentorici prof. dr. Kristini Sepčić za omogočeno opravljanje diplomske naloge.

Hvala recenzentki prof. dr. Metki Filipič za pregled diplomske naloge in predsedniku strokovne komisije prof. dr. Tom Turku.

Alja, hvala za pomoč pri nanodropu.

Marko, hvala za pomoč pri PCR in vsem ostalim, ki ste mi pomagali pri delu v laboratoriju.

Zahvala gre tudi moji družini, ki mi je ves čas stala ob strani in mi omogočila brezskrben študij.

Hvala vsem prijateljem za nepozabna študentska leta.

In zahvala gre tudi tebi Tadeja za vso pomoč v času študija in ob njem.