

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Andreja VANOVŠEK

**CITOTOKSIČNI IN GENOTOKSIČNI UČINKI
IZBRANIH CITOSTATIKOV NA ČLOVEŠKE
JETRNE CELICE *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Molekulske biologije

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Andreja VANOVŠEK

**CITOTOKSIČNI IN GENOTOKSIČNI UČINKI IZBRANIH
CITOSTATIKOV NA ČLOVEŠKE JETRNE CELICE *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Molekulske biologije

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF SELECTED
CYTOSTATICS ON HUMAN LIVER CELLS *IN VITRO***

M. SC. THESIS

Master Study Programme – Molecular Biology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija molekulske biologije na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, v laboratorijih Oddelka za gensko toksikologijo in biologijo raka.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Seršo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Dr. Jana NUNIC
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka

Član: Prof. dr. Gregor SERŠA
Onkološki Inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Vanovšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK 6: 615.277/57.083.36 (043.3) = 163.6
KG citostatiki / citotoksičnost / genotoksičnost / HepG2 celice / test MTT / test komet
AV VANOVSŠEK, Andreja, dipl.biotehn (UN)
SA SERŠA, Gregor (mentor), NUNIĆ, Jana (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske biologije
LI 2013
IN CITOTOKSIČNI IN GENOTOKSIČNI UČINKI IZBRANIH CITOSTATIKOV NA ČLOVEŠKE JETRNE CELICE *IN VITRO*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2.stopnja)
OP X, 55 str. , 10 pregl., 5 sl., 92 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Z daljšanjem življenjske dobe in onesnaženostjo okolja skozi življenje zbiramo napake v DNA, ki jih popravljalni mehanizmi niso vedno sposobni popraviti. Ena sama mutacija ne povzroči rakave celice, vendar pa se njihovo kopičenje povečuje verjetnost za razvoj raka. Zaradi vedno večjega števila rakavih bolezni se posledično v okolju veča vsebnost citostatikov, ki jih uporabljamo za zdravljenje te trdovratne bolezni. Ker citostatiki ne delujejo selektivno le na rakave celice, se pojavljajo vprašanja, ali lahko in v kolikšnem obsegu bodo citostatiki delovali na netarčne organizme: zdrave posameznike in okoljske organizme. Zaradi tega je bil cilj magistrske naloge ugotoviti citotoksično in genotoksično delovanje treh izbranih citostatikov z različnim načinom delovanja (etopozid, cisplatin in imatinib mezilat) na človeške jetrne celice HepG2. Citotoksičnost smo ugotavljali s testom MTT, genotoksičnost pa s testom komet. Vsi izbrani citostatiki so na celice HepG2 delovali citotoksično v odvisnosti od časa in odmerka, pri čemer smo pri celicah, izpostavljenih imatinibu, opazili specifičen prag delovanja pri koncentraciji ~18,75 µg/ml pri vseh časih izpostavljenosti. S testom komet pa smo dokazali, da so vsi uporabljeni citostatiki pri necitotoksičnih odmerkih delovali genotoksično v odvisnosti od časa in odmerka, pri čemer se je etopozid pokazal kot najbolj genotoksičen.

Za nadaljnje raziskovanje citotoksičnosti in genotoksičnosti citostatikov so potrebne še druge analize, prav tako bi bilo smotno opazovati tudi spremembe genetskega materiala pri več generacijah. Metodi, ki smo jih uporabili, sta cenovno in časovno zelo primerni, rezultati pa so pokazali, da sta tudi dovolj občutljivi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC 6: 615.277|57.083.36 (043.3) = 163.6
CX cytostatics / cytotoxic / genotoxic / HepG2 cells / MTT test / Comet test
AU VANOVSŠEK, Andreja
AA SERŠA, Gregor (mentor), NUNIC, Jana (somentorica)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study of Molecular Biology
PY 2013
TI CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF SELECTED CYTOSTATICS ON HUMAN LIVER CELLS *IN VITRO*
DT M.SC. THESIS (Master Study Programme: Molecular Biology)
NO X, 55 p., 10 tab., 5 fig., 92 ref.
LA sl
AL sl/en
AB With longer life expectancy and environmental pollution through life we collect errors in DNA, which DNA repair mechanisms are not always able to fix. A single mutation does not result in development of cancer cell, but accumulation of mutations can lead to cancer. Due to the increasing occurrence of cancer, consequently, content of cytostatics, which are used for the treatment of this persistent disease, is also increasing in the environment. Since cytostatics do not act selectively only on cancer cells, questions that arises is whether and to what extent the cytostatics influence non-target organisms: healthy individuals and environmental organisms. For this reason, the aim of our study was to determine cytotoxic and genotoxic effects of three selected cytostatics with different mode of action (etoposide, cisplatin and imatinib mesylate) on human liver cells HepG2. Cytotoxicity was determined by MTT assay, genotoxicity by comet assay. All used cytostatics were time- and dose-dependent cytotoxic for HepG2 cells, wherein the cells, exposed to imatinib mesylate, we observed a specific threshold dose response at a concentration 18.75 µg/ml at all exposure times. With the comet assay we have shown that all the cytostatics were time- and dose-dependent genotoxic, among which the etoposide was the most genotoxic.

In order to further explore the cytotoxicity and genotoxicity of cytostatic other analysis are needed. It would also be useful to observe the changes in the genetic material in several generations. The methods we used are the cost- and time-effective, while our results also shown they are also sufficiently sensitive.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD S DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNE HIPOTEZE.....	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 RAK.....	4
2.2 CITOSTATIKI	4
2.2.1 Razdelitev citostatikov	6
2.2.2 Etopozid.....	9
2.2.3 Cisplatin.....	10
2.2.4 Imatinib mezilat.....	11
2.3 VSEBNOST CITOSTATIKOV V OKOLJU	13
2.3.1 Vzroki za prisotnost citostatikov v okolju.....	14
2.3.2 Biorazgradljivost	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Celična linija HepG2	16
3.1.2 Kemikalije	17
3.2 METODE	20
3.2.1 Gojenje celic HepG2	20
3.2.2 Določanje citotoksičnosti – test MTT	21
3.2.3 Določanje genotoksičnosti – test komet.....	23
3.2.3.1 Test komet	23
3.2.3.2 Tretiranje celic.....	25
3.2.3.3 Priprava suspenzije posameznih celic in nanos na objektna stekelca	25
3.2.3.4 Alkalna liza celic	26
3.2.3.5 Odvijanje DNA in elektroforeza.....	26
3.2.3.6 Nevtralizacija.....	27
3.2.3.7 Slikanje jeder celic in merjenje poškodb DNA	27
3.2.3.8 Analiza rezultatov	28
4 REZULTATI	29
4.1 CITOTOKSIČNOST IZBRANIH CITOSTATIKOV – MTT TEST	29
4.1.1 Etopozid.....	30

4.1.2	Cisplatin.....	32
4.1.3	Imatinib mezilat.....	34
4.2	GENOTOKSIČNOST IZBRANIH CITOSTATIKOV - TEST KOMET.....	36
4.2.1	Etopozid.....	36
4.2.2	Cisplatin.....	37
4.2.3	Imatinib mezilat.....	38
5	RAZPRAVA.....	39
6	SKLEPI.....	44
7	POVZETEK	45
8	VIRI.....	47

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Sl. 1: Mehanizem delovanja cisplatina.	11
Sl. 2: Mehanizem delovanja imatinib mezilata.	12
Sl. 3: Celična linija HepG2.....	17
Sl- 4: Test komet..	24
Sl. 5: Vpliv etopozida na preživetje celic HepG2.	30
Sl. 6: Vpliv cisplatina na preživetje celic HepG2.....	32
Sl. 7: Vpliv imatinib mezilata na preživetje celic HepG2.	34
Sl. 8: Vpliv etopozida na nastanek prelomov DNA celic HepG2.....	36
Sl. 9A in 9B: Vpliv cisplatina mezilata na nastanek prelomov DNA celic HepG2.....	37
Sl. 10A in 10B: Vpliv imatinib mezilata na nastanek prelomov DNA celic HepG2.....	38

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Razdelitev citostatikov po skupinah in njihovi predstavniki.	6
Pregl. 2: Kemikalije uporabljene v magistrski nalogi.	17
Pregl. 3: Podatki o citostatikih, uporabljenih v magistrski nalogi.	19
Pregl. 4: Sestava gojišča.	20
Pregl. 5: Uporabljene koncentracije izbranih citostatikov in kontrol topila pri testu MTT.	22
Pregl. 6: Uporabljene koncentracije izbranih citostatikov in kontrol topila pri testu komet.	25
Pregl. 7: Priprava 1 % agaroze NMP in LMP.	26
Pregl. 8: Priprava raztopine za alkalno lizo celic.	26
Pregl. 9: Priprava elektroforetskega pufra.	27
Pregl. 10: Priprava raztopine za nevtralizacijo.	27

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

5-FU	5-fluorouracil
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ALS	alkalno labilna mesta (alkali-labile sites)
As	arzen (arsenic)
ATP	adenozin trifosfat (adenosine-5'-triphosphate)
BaP	benzo(a)piren (benzo(a)pyrene)
BER	popravljanje DNA z izrezovanjem baze (base excision repair)
Bcr	B-celični receptor (B cell receptor)
CARES	Cancer Alliance for Research, Education in Survivorship
Cd	kadmij (cadmium)
CDDP	cisplatin (cisplatin)
CDK	od ciklina odvisna kinaza (cyclin-dependent kinase)
CO ₂	ogljikov dioksid
CYP	citokrom P450 (cytochrome P450)
CP	ciklofosamid (cyclophosphamide)
DMSO	dimetil sulfoksid (dimethylsulphoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
DSB	dvoverižni prelomi DNA (double-strand breaks)
DSBR	popravljanje dvoverižnega preloma DNA (double strand break repair)
EMA	evropska agencija za zdravila (European Medicines agency)
FADU	fluorescenčna analiza neodvite DNA (fluorometric analysis of DNA unwinding)
FBS	fetalni goveji serum (fetale bovine serum)
HepG2	celična linija človeških jetrnih celic (human hepatoma cell line)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid (hydrogen peroxide)
IF	ifosfomid
Kit	receptor za dejavnike matičnih celic (stem cell factor receptor)
LMP	nizka temperatura tališča (low melting point)
MET	metotreksan
MTT	1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev brom
NMP	normalna temperatura tališča (normal melting point)
NER	popravljanje DNA z izrezovanjem nukleotidov (nucleotide excision repair)
PBS	raztopina fosfatnega pufra (phosphate buffer saline)
PDGFR	receptor trombocitnega rastnega dejavnika (α and β -platelet-derived growth factor receptor)
REACH	uredba o Registraciji, Evalvaciji, Avtorizaciji in omejevanju Kemikalij
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (reactive oxygen species)
SCGE	elektroforeza posamezne celice (single cell gel electrophoresis)
SSB	enoverižni prelom DNA (single strand break)

SSBR	popravljanje enoverižnega preloma DNA (single strand break repair)
STI571	imatinib mezilat (imatinyb mesilate)
UV	ultravijolična svetloba
XRCC1	(X-ray repair cross-complementing gene 1)
WWTP	odpadne vode čistilnih naprav (wastewater-treatment plants)

1 UVOD

V okolje se sprošča vedno več toksičnih snovi, kar ogroža številne ekosisteme. Med nevarnimi snovmi so tudi farmacevtiki - spojine, ki se uporabljajo v medicinske namene (Oxford Dictionaries). V vodnem okolju so jih prvič zasledili v 70. letih 20. stoletja (Hignite in Aznaroff, 1977). V okolje farmacevtiki pridejo v različnih količinah preko bolnišničnih in komunalnih odpadnih vod, kjer lahko vplivajo tudi na netarčne organizme (npr. zdravi posamezniki in vodni organizmi). Zaradi tega jih obravnavamo kot okoljska onesnažila in predstavljajo tveganje v ekotoksikologiji (Fent in sod., 2006, Halling-Sørensen in sod., 1998, Kolpin in sod., 2002 in Ternes, 1998). Skupina farmacevtikov, ki je bila do nedavnega spregledana, so antineoplastična zdravila. Uporabljajo se predvsem za zdravljenje raka in imajo lahko citotoksične, genotoksične, mutagene in teratogene učinke. Mednje spadajo citostatiki, biološka zdravila in tarčna zdravila (Ocvirk, 2009). V naši magistrski nalogi se bomo osredotočili le na citostatike. Do sedaj ni bilo veliko toksikoloških raziskav te skupine farmacevtikov na netarčnih organizmih. Razlog je najverjetneje v njihovi relativno nizki količini v okolju (ng/L ali še manj), ki je do nedavnega sploh ni bilo možno zaznati z obstoječimi analitskimi metodami. V zadnjem času pa z razvojem novih testov in metod monitoringa okolja dobivamo vpogled v pojavljanje in vsebnost omenjenih farmacevtikov v okolju (Kosjek in Heath, 2011), ki kljub nizki količini predstavljajo specifično tveganje za netarčne organizme v vodnih okoljih (Kümmerer, 2001). Pri tem pa ne smemo zanemariti tudi vpliva na ljudi, zato potrebujemo dober testni organizem, ki ga lahko zaradi njegove občutljivosti primerjamo z ostalimi modeli, npr. ribjimi celicami ZFL (ang. »zebrafish liver cells« predstavljajo dober model za opazovanje v vodnem okolju). Je dober model v genetski toksikologiji, zaradi česar ga lahko primerjamo z ostalimi raziskavami. Poleg tega se tudi pojavljajo težave zaradi poklicne izpostavljenosti osebja v bolnišnicah (Sessink in sod., 1992; McDevitt in sod., 1993; Sorsa in Anderson, 1996).

Pri ocenjevanju tveganja za zdravje ljudi in okolja zaradi izpostavljenosti različnim kemijskim snovem ima pomembno vlogo poznavanje njihove genotoksičnosti. Genotoksičnost je lastnost, zaradi katere snovi škodujejo genetskemu materialu. Delujejo lahko neposredno (povežejo se z DNA in jo spremenijo, npr. z alkilacijo, prelomi, prečnim povezovanjem) ali posredno (vplivajo na celične funkcije ali okolje celic, kar vodi v poškodbe DNA – npr. oksidativni stres, topoizomerazni inhibitorji, mitotični inhibitorji). Genotoksične snovi na prvem mestu povzročajo poškodbe DNA somatskih celic, kar vodi v staranje in poveča verjetnost za nastanek raka. Po drugi strani spremembe DNA v spolnih celicah vodijo v nastanek genetskih bolezni in doprinašajo k genetski obremenjenosti. Iz tega razloga je zelo pomembno genotoksične dejavnike prepoznati in oceniti, kakšno tveganje predstavljajo za človekovo zdravje. V namen ugotavljanja genotoksičnosti uporabljamo različne teste. Ti temeljijo na dejstvu, da je struktura DNA v

vseh organizmih enaka. Genotoksične analize so zelo pomembne pri pregledovanju snovi, kot so npr. kandidati za zdravila, prehranska dopolnila ali kozmetika. Glede na to, da se večina teh snovi sprošča v okolje, bi bilo smiselno, poleg testov genotoksičnosti na tarčnih organizmih, testirati genotoksičnost tudi na netarčnih organizmih (alge, ribe, vodne rastline). Le na ta način lahko dobimo celostno sliko o potencialnih učinkih onesnažil in s tem zmanjšamo ogroženost ekosistemov.

1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen magistrske naloge je preučiti citotoksične in genotoksične učinke izbranih citostatikov z različnimi mehanizmi delovanja v *in vitro* modelu s človeškimi jetrnimi celicami HepG2.

V magistrski nalogi bomo:

- s testom MTT določili citotoksičnost izbranih citostatikov v odvisnosti od odmerka in časa izpostavitve,
- s testom komet proučili genotoksične učinke pri koncentracijah, ki niso povzročile značilne citotoksičnosti, in pri koncentracijah, ki so značilne za okoljsko izpostavljenost.

Z omenjenim eksperimentalnim pristopom bomo preverili hipotezo, da izbrani citostatiki v sistemu s celicami HepG2 delujejo citotoksično in genotoksično ter da, v odvisnosti od mehanizma genotoksičnega delovanja, nekateri citostatiki povzročijo genotoksične učinke pri nizkih koncentracijah, kakršne lahko pričakujemo v okolju.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK

Genotoksičnost v povezavi z nastankom raka so prepoznali že pred mnogimi leti. Eden izmed prvih, ki je opazil to povezavo, je bil Boveri (1929), ki je trdil, da do raka prihaja zaradi mutacij v somatskih celicah. Danes zagotovo vemo, da genotoksičnost lahko vodi v nastanek raka. Rak je definiran kot bolezen, pri kateri s klonalnim namnoževanjem mutiranih celic nastane gruča celic, ki dobi lastnosti invazivnosti in metastaziranja (Barlow in Malkin, 2001). Značilnosti rakave celice so nesmrtnost, nenadzorovana proliferacija in angiogeneza (Barlow in Malkin, 2001). Med vzroke za nastanek raka spadajo staranje, okoljski dejavniki (sevanje, kemične snovi), endogene poškodbe, oksidativni stres in imunska sposobnost organizma prepoznavati nenormalne celice. Vendar vsi dejavniki vplivajo na gene, ki uravnavajo smrt, rast ali diferenciacijo celic (Serša, 2009). Mehanizmov za nastanek raka je tako več. Vse celice imajo v sebi t.i. protoonkogene, ki uravnavajo normalno obnašanje celic. V primeru mutacij teh genov govorimo o onkogenih, ki lahko vplivajo na delovanje celice na različne načine (razraščanje, celica ignorira signale za apoptozo, hitrejša proliferacija) (Barlow in Malkin, 2001). Obstajajo tudi tumor zavirajoči geni (Fearson, 1998). V primeru, da so le-ti spremenjeni, so v celicah porušeni mehanizmi za uravnavo celičnega cikla, kar posledično vodi v pospešena celična delitev in nastanek raka. Tumor nastane najprej z maligno celico, ki pa se z nenadzorovanimi delitvami razvije v svoje tkivo. Te celice se spreminjajo zaradi genetske nestabilnosti in postajajo agresivnejše. Zaradi tega najdemo v tumorjih genotipsko in fenotipsko različne celice. V avaskularni fazi se celice prehranjujejo z difuzijo kisika in drugih hranil, saj so velike le nekaj milimetrov. Ko celice začnejo izločati še angiogene dejavnike, se sprožijo mehanizmi za nastanek žilja za prehranjevanje tumorja (Pecorino, 2009; Tannock in Hill, 2007; Folkman, 2007).

Zaradi vedno večje izpostavljenosti živih bitij kemikalijam v okolju se pojavlja vedno več rakavih obolenj. Posledično pa se vedno več citostatikov, uporabljenih za zdravljenje rakavih obolenj, sprošča v okolje. Takšna prisotnost citostatikov v okolju bi lahko imela tudi obratni učinek – namesto zdravljenja bolnih bi citostatiki lahko tudi povzročali bolezen pri zdravih posameznikih oz. netarčnih organizmih.

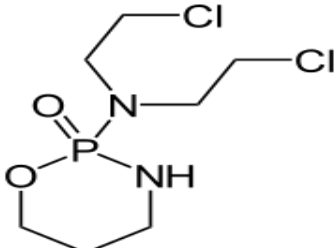
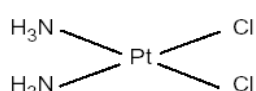
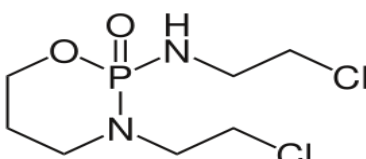
2.2 CITOSTATIKI

Citostatiki skupaj s citotoksiki spadajo v skupino citotoksičnih zdravil glede na Anatomsko-terapevtsko-kemično (ATC) klasifikacijo (Besse in sod., 2012). Citotoksiki so

snovi, ki povzročajo metabolne ter morfološke spremembe v celici, ki vodijo v celično smrt. Za razliko od citotoksikov, delovanje citostatikov ne temelji na povzročanju celične smrti, ampak le-ti inhibirajo rast in proliferacijo celic z različnimi mehanizmi, npr. z blokiranjem dejavnikov za celično rast, z vplivom na citotoksične celice (makrofagi, monociti). Zaradi teh sposobnosti se citostatiki uporabljajo za preprečitev rasti in tvorbe rakavih celic ter neoplazm, zaradi česar jih imenujejo tudi antineoplastična zdravila (Besse in sod., 2012). Glede na mehanizem delovanja citostatike delimo v več skupin (Preglednica 1). Etopozid se uvršča po mehanizmu delovanja med topoizomerazne inhibitorje, ki spadajo med rastlinske alkaloidne (L01C). Cisplatin uvrščamo v skupino alkilirajočih snovi (L01A), po mehanizmu delovanja pa v skupino snovi s platino (L01XA). Imatinib mezilat lahko po mehanizmu delovanja razvrstimo med proteinske kinazne inhibitorje (L01XD).

2.2.1 Razdelitev citostatikov

Preglednica 1: Razdelitev citostatikov po skupinah in njihovi predstavniki.

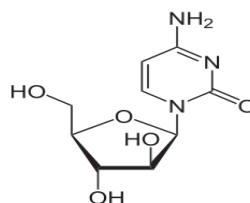
Razdelitev citostatikov	Predstavniki skupine
<p>Alkilirajoče snovi in njihovi reaktivni intermediati tvorijo kovalentne vezi z DNA, RNA in proteini. Pri tem je dodana metilna ali etilna skupina na dušikov atom dušikovih baz (gvanin N7, adenin N1 in N3, citozin N3). Na DNA nastane tak kompleks na številnih reaktivnih mestih nukleotidnih baz. Pogoste lokacije so na N-7 in O-6 gvaninu. Alkilirajoče snovi, ki niso ionske, se prednostno vežejo na dušikov ion, medtem ko se ionske prednostno vežejo na kisikov atom (Cytostatics: Substance identification). Pri tem pride do inhibicije transkripcije (Besse in sod., 2012). V to skupino spadajo še kompleksi s platino, ki inhibirajo podvojevanje, kot je npr. cisplatin.</p>	<p>Ciklofosfamid (n,n-bis(2-kloroetil)-1,3,2-oksazafosfinan-2-amin 2-oksid)</p>  <p>Cisplatin (<i>cis</i>-diamindikloridoplatina)</p>  <p>Ifosfamid (n-3-bis(2-kloroetil)-1,3,2-oksazafosfinan-2-amid-2-oksid)</p> 

Se nadaljuje

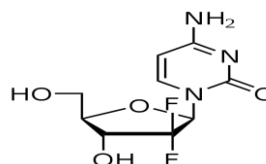
Nadaljevanje preglednice 1: Razdelitev citostatikov po skupinah in njihovi predstavniki

Antimetaboliti so strukturni analogi nukleotidov. V verigo DNA se vstavijo kot analogi pirimidinov ali purinov in s tem motijo sintezo nukleinskih kislin (Besse in sod., 2012). Nekateri antimetaboliki motijo tudi esencialne encimske procese metabolizma. Med antimetabolite spada 5-FU.

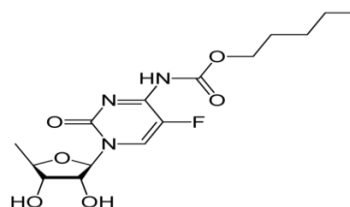
Citarabin (4-amino-1-(2r,3s,4r,5r)-3,4-dihidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il] pirimidin-2-on)



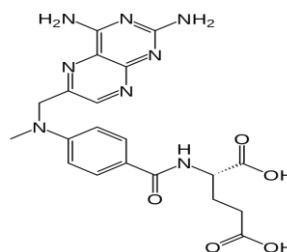
Gemcitabin (4-amino-1-(2-deoksi-2,2-difluoro-β-d-eritropentofuranosil)pirimidin-2(1h)-on 2', 2'-difluoro-2'-deoksicitidin)



Kapecitabin (pencil[1-(3,4-dihidroksi-5-metil-tetrahydrofuran-2-il)- 5-fluoro-2-okso-1H-pirimidin- 4-il]aminometanoat)

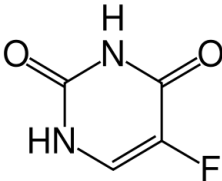
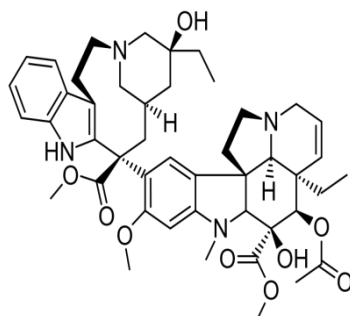
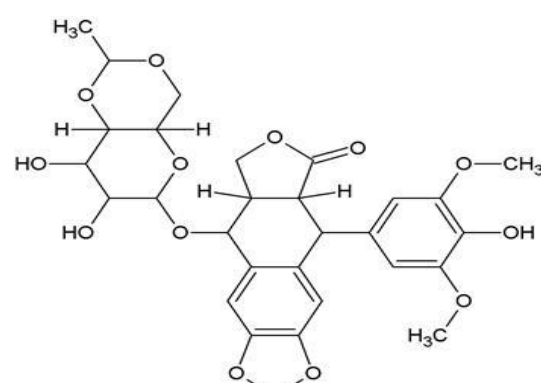


Metotreksat ((2s)-2-[(4-{[2,4-diaminopteridin-6-il)metil](metil)amino}fenil)formamid]pentadioična kislina)



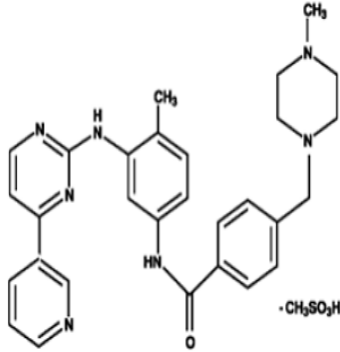
se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Razdelitev citostatikov po skupinah in njihovi predstavniki

	<p>5-FU (5-fluoro-1h-pirimidin-2,4-dion)</p> 
<p>Citotoksični antibiotiki se vrivajo med baze v verigi DNA in motijo sintezo in funkcijo nukleinskih kislin (Besse in sod., 2012).</p>	
<p>Mitotični inhibitorji ustavijo segregacijo kromosomov z inhibicijo nastanka mikrotubulov (Besse in sod., 2012).</p>	<p>Vinblastin (dimetil (2β,3β,4β,5α,12β,19α)-15-[5s,9s)-5-etil-5-hidroksi-9-(metoksikarbonil)-1,4,5,6,7,8,9,10-oktahidro-2h-3,7-metanoazacikloundecino[5,4-b]indol-9-il]-3-hidroksi-16-metoksi-1-metil-6,7-didehidroksiaspidospermidin-3,4-dikarboksilat)</p> 
<p>Topoizomerazni inhibitorji inducirajo ali stabilizirajo poškodbo DNA tako, da onemogočijo ponovno ligacijo preloma na obeh verigah DNA (Besse in sod., 2012).</p>	<p>Etopozid (4'-demetil-epipodofilotoksin 9-[4,6-O-(R)-etilidene-β-D-glukopiranozid], 4' - (dihidrogen fosfat)))</p> 

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Razdelitev citostatikov po skupinah in njihovi predstavniki

<p>Inhibitorji proteinskih kinaz vplivajo na mnoge biološke procese, kot so celična rast, migracija celic (Besse in sod., 2012). Običajno so inhibitorji tirozinskih kinaz.</p>	<p>Imatinib mezilat (4-[(4-Metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamid metansulfonat)</p> 
<p>Monoklonska protitelesa (citostatik – ATC L01XC) blokirajo zunajcelične receptorje tumorskih celic (Besse in sod., 2012).</p>	

V naši magistrski nalogi smo preverjali delovanje naslednjih citostatikov: etopozid, cisplatin in imatinib mezilat- zato bomo v nadaljevanju opisali le te izbrane citostatike.

2.2.2 Etopozid

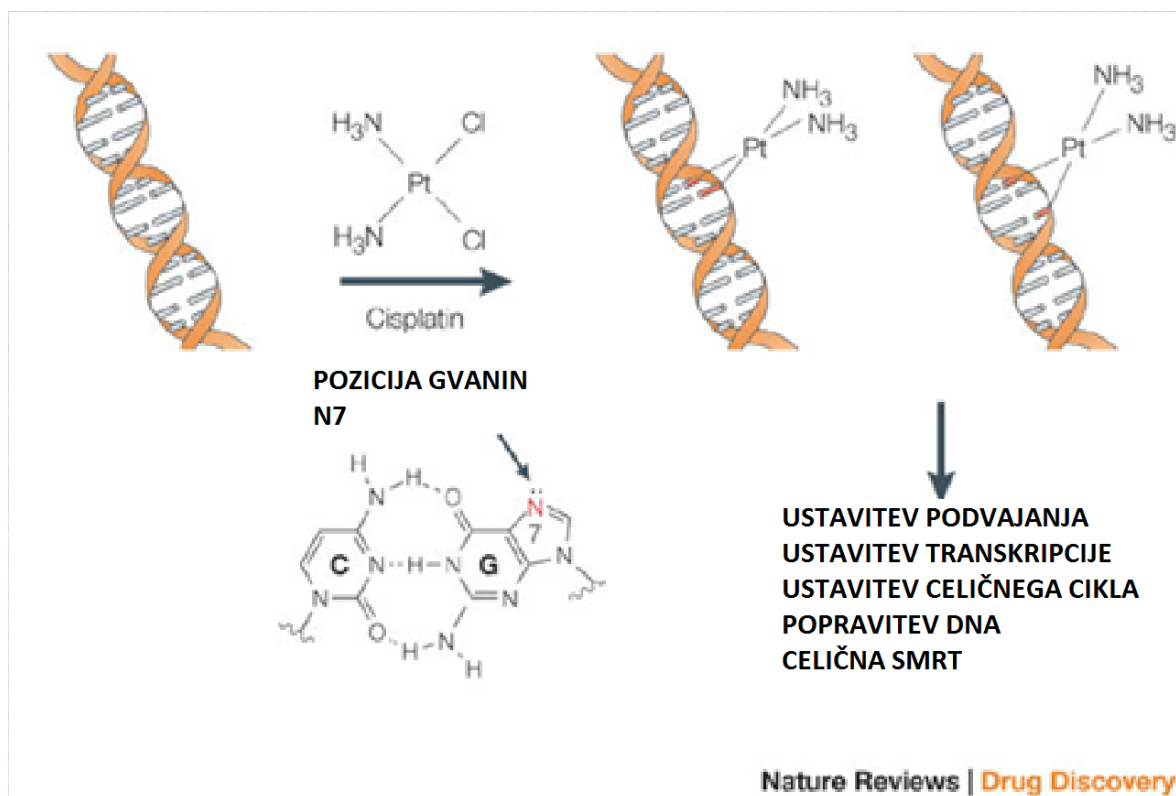
Etopozid je semi-sintetični derivat epipodofilotoksina, ki ga pridobivajo iz rastline *Podophyllum peltatum* (van Maanen, Retel, de Vries in Pinedo, 1998; Hainsworth in Greco, 1995; Hande, 1998). Le-ta inhibira delovanje človeških topoizomeraz II α in ga uvrščamo v skupino inhibitorjev topoizomeraz II, saj stabilizira kompleks DNA-topoizomeraz (DNA - rezalni kompleks) (Montecucco in Biamonti, 2007). Če tega encima ni, celica ni zmožna ločiti hčerinskih kromosomov, zaradi česar pride do apoptoze (Bromber, Burgin in Osheroff, 2002). Ko pride do nastanka DNA - rezalnega kompleksa etopozid povzroči genotoksične poškodbe (dvojne prelome) (Cierniak, Papiez in Kapiszewska, 2004; Boos in Stopper, 2000). Zaradi tega prihaja do več napak med rekombinacijo DNA, kar poveča verjetnost nastanka nepravilne kromosomske reorganizacije (Choudhury, Palo in Sahu, 2004; Bueno in sod., 2009). Etopozid tako povzroči ustavitev celice v fazi G2/M celičnega cikla (Schonn, Hennesen in Dartsch, 2010; Zhu in sod., 2009; Nam, Doi in Nakayama, 2010) ter nastanek nenormalno velike celice in celičnega jedra v različnih tumorskih celicah. Celica namreč ne more vstopiti v mitozo kljub veliki količini sintetizirane DNA in proteinov za celično delitev (Kang, Lee, Yoo in Nho, 2010; Rello-Varona in sod., 2006).

Etopozid se uporablja za zdravljenje: raka prostate, mehurja, testisov, pljuč, želodca in maternice, Hodgkinov in neHodgkinov limfom, rabdomiosarkome, nevroblastome in možganske tumorje (The Scott Hamilton CARES Initiative, Cancer Alliance for Research, Education and Survivorship).

2.2.3 Cisplatin

Cisplatin spada v skupino alkilirajočih snovi in deluje citotoksično na celico med procesom delitve. Ko se DNA podvaja, se cisplatin poveže z DNA in/ali s proteini. Pri tem pride do prečnih povezav. Ti aktivirajo različne mehanizme v transdukcijski signalni poti, zaradi česar se podvajanje v celici ustavi in sprožijo se mehanizmi za apoptozo (Siddik, 2003). Cisplatin deluje na DNA preko dušikovih atomov (predvsem na N7 v purinih), ki se radi povežejo s cisplatinom, ker ne tvorijo nobenih vodikovih vezi z drugimi bazami v DNA. Pri tem se lahko tvori več različnih kompleksov cisplatin – DNA, med katerimi pa so najbolj pomembne povezave znotraj verige in prečne povezave med verigami, ki nastanejo s kovalentno vezavo platine z N7. Pri tem se veže cisplatin brez kloridnih ionov, molekula vode pa odstrani en ali oba kloridna liganda, da nastane kationa $[Pt(H_2O)Cl(NH_3)_2]^+$ in $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$ (Pabla in sod., 2008). S tem se spremeni struktura DNA-vijačnice, pri čemer se v velikem žlebu izpostavi manjša površina, na katero se v procesu popravljanja vežejo različni proteini (proteini HMG box, popravljalni proteini, transkripcijski faktorji in drugi, npr. histon H1) (Jamieson in Lippard, 1995; Zdraveski in sod., 2002; Kartalou in Essigmann, 2001; Wozniak in Blasiak, 2002).

Cisplatin deluje tudi na različne transdukcijske poti (AKT, p53, c-ABL in MAPK poti), ki celici sporočajo, da je poškodovana in gre v apoptozo (Wang in Lippard, 2005).



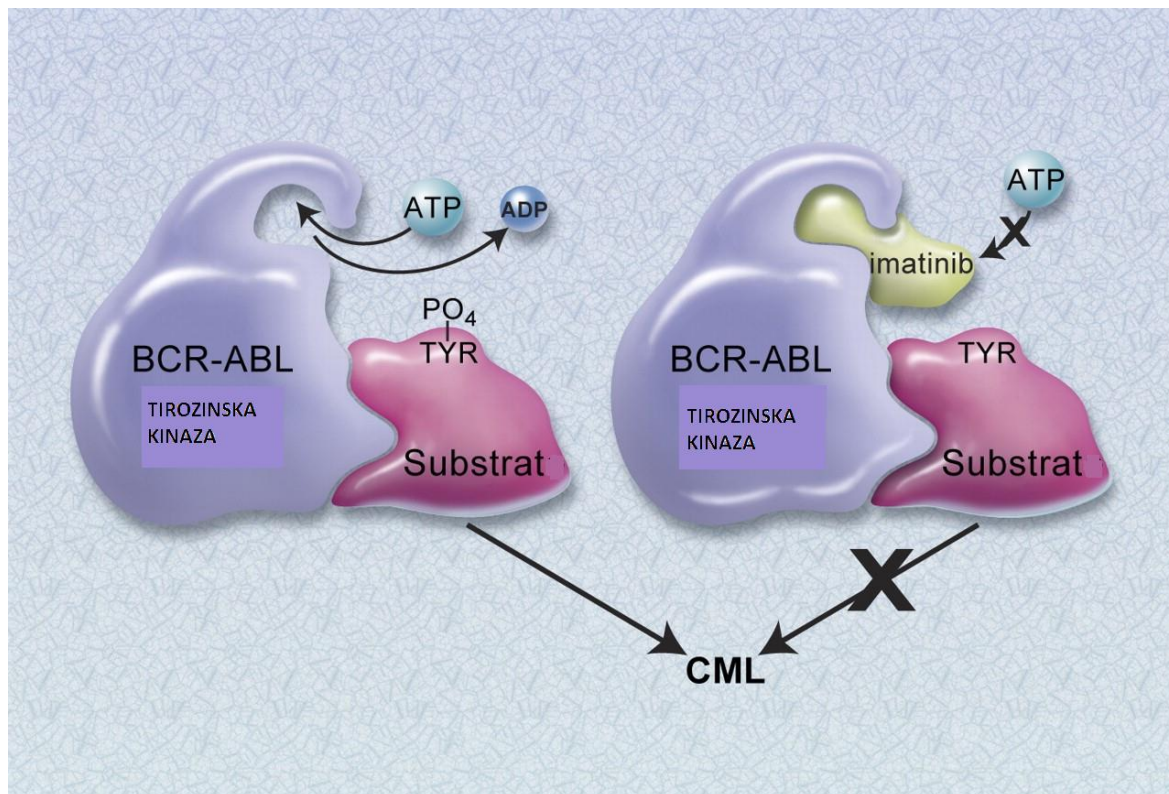
Slika 1: Mehanizem delovanja cisplatina, ki se veže na gvanin ali adenin na poziciji N7, s čemer je onemogočena nadaljno podvajanje, transkripcija, napredovanje v celičnem ciklusu in so lahko aktivirani procesi za popravljanje DNA ali apoptozo. Nat Rev Drug Discov. 2005 Apr;4(4):307-20. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Wang D. in Lippard S.J., 2005

Cisplatin se uporablja za zdravljenje različnih oblik raka, kot so rak testisov, jajčnikov, prostate, mehurja, glave, vratu, dojke, želodca, požiralnika, materničnega vratu, drobnocelični in nedrobnocelični rak pljuč, kot tudi za zdravljenje Hodgkinovega in neHodgkinovega limfoma, nevroblastoma, sarkoma, melanoma, mezotelioma in multiplega mieloma (The Scott Hamilton CARES Initiative, Cancer Alliance for Research, Education and Survivorship).

2.2.4 Imatinib mezilat

Imatinib mezilat je po strukturi 2-fenilaminopirimidinska komponenta (Ranza in sod., 2009) in je inhibitor tirozinskih kinaz Abl in Bcr-Abl, inhibitor kinaznega receptorja PDGFR (ang. » α and β -platelet-derived growth factor receptor«) ter inhibitor receptorjev rastnih dejavnikov Kit (ang. »stem cell factor receptor«). Deluje tako, da se specifično poveže z ATP vezavnim mestom kinaz, zaradi česar pride do zmanjšanja encimske aktivnosti (Heinicke in sod., 2005). Uporablja se za zdravljenje kronične mieloidne levkemije in gastrointestinalnega stromalnega tumorja. Preučuje se tudi njegova

potencialna uporaba za zdravljenje drugih malignih tumorjev, saj so kinaze pogosto mutirane ali kako drugače deregulirane v melanomih. S pomočjo kinaz lahko tudi ločujemo med normalnim in tumorskih tkivom (Ranza E. in sod., 2009).



Slika 2: Mehanizem delovanja imatinib mezilata. Imatinib se veže na vezavno mesto za ATP, posledično ne more priti do fosforilacije tirozina na substratu. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Druker, B.J. (2008). Blood, 112: 4808-4817 doi:10.1182/blood-2008-07-077958

2.3 VSEBNOST CITOSTATIKOV V OKOLJU

Citostatiki delujejo neselektivno na vse rastoče celice in imajo rakotvorni potencial (Kosjek T. in Heath, 2011). Zaradi narave delovanja so evkariontski organizmi občutljivi na poškodbe, največ skrbi povzroča potencialna mutagenost, karcinogenost in reproduktivna toksičnost pri nizkih količinah (ng/l) (Johnson in sod., 2008). Tako ni nujno, da se različne bolezni razvijejo v izpostavljeno generaciji, ampak se posledice pokažejo šele pri potomcih. Besse in sod. (2012) opozarjajo na povečanje uporabe antineoplastičnih zdravil med leti 2004 in 2008, zaradi česar se njihova količina v okolju povečuje. Posledično je potrebno opazovati njihovo prisotnost v površinskih vodah in odpadnih vodah čistilnih naprav (WWTP - ang. »wastewater-treatment plants«). V omenjeni raziskavi so pridobili približne podatke o vstopu citostatikov v vodno okolje ob predpostavki, da citostatik ni bil razgrajen v čistilni napravi. Pri tem so upoštevali količino porabljenih citostatikov v populaciji v enem letu na določenem območju (običajno država). Izračunani PEC je moral biti večji od 10 ng/l. Takšni so bili hidroksikarbamid, kapecitabin, fluorouracil in imatinib (Besse in sod., 2012). Rowney in sod. (2009) so naredili podobno študijo, v kateri so dobili podobne rezultate. Odstopal je le fluorouracil, ki ga je bilo v njihovi raziskavi manj. Razlog je najverjetneje ta, da so upoštevali odstranitev v WWTP. Po drugi strani pa so po raziskavi Kovalova (2009) v okolju najbolj prisotni 5-FU (5-fluorouracil), gemcitabin, IF (ifosfomid), CP (ciklofosfamid) in MET (metotreksan). Besse in sod. (2012) so ugotovili, da se vsebnost citostatikov v okolju spreminja. Vrednosti v Franciji so pokazale, da je bilo etopozida v vodnem okolju po izračunu PEC (»Predicted environmental concentrations«) leta 2004 7,60, leta 2008 pa 0,94. PEC je izračunan na podlagi podatkov o količini molekule, ki jo v 1 letu prebivalstvo porabi na opredeljenem področju (običajno država):

$$PEC = \frac{\text{kolicina}_{\text{citostatika}} \times F_{\text{excreta}} \times F_{\text{stp}}}{WW_{\text{inhab}} \times \text{števil}_0_{\text{prebivalcev}} \times \text{redcenje}} \times 1$$

Zaskrbljujoči pa so podatki, da se koncentracija cisplatina v okolju povečuje (v letu 2004 je bil v francoskem okolju PEC 0,40 ng/l, leta 2008 pa 0,52 ng/l). Enako je z imatinib mezilatom, katerega poraba se je v štirih letih povečala iz 13,33 ng/l na 19,95 ng/l (Besse in sod., 2012).

¹ 100 = korekcijski faktor za odstotek, 365 = število dni na leto ; WW_{inhab} = količina odpadne vode na osebo na dan; redcenje = faktor redčenja iz čistilne naprave (WWTP) odplak v površinske vode (privzeta vrednost določena na 10); F_{excreta} = izločanje dela aktivne molekule; F_{stp} = delež emisij zdravila iz čistilnih naprav v površinske vode, definiran kot $1 - WWTP$ (v večini primerov podatki od WWTP niso znani, zato se upošteva, da je vrednost F_{stp} enaka 1 – ni odstranitve v čistilni napravi).

2.3.1 Vzroki za prisotnost citostatikov v okolju

Primarni vzrok za pojav citostatikov v okolju je verjetno njihova uporaba v bolnišnicah, predvsem prisotnost v bolnišničnih odplakah (Kiffmeyer in sod., 1998). Zaradi vedno večje oskrbe rakavih bolnikov doma se količina citostatikov v okolju povečuje tudi zaradi gospodinjstvih komunalnih odplak (Besse in sod., 2012). Potrebno je upoštevati tudi nastanek metabolitov citostatikov, ki imajo tudi škodljive učinke (Kiffmeyer in sod., 1998).

Citostatike je zaradi posebnega mehanizma aktivacije potrebno spremljati in oceniti njihovo okoljsko tveganje glede na priporočila EMA (ang. »European Medicines agency«) (EMA, 2006). Slabost priporočil je, da zahtevajo pridobitev teh podatkov le za nove farmacevte, za večino že obstoječih antineoplastičnih zdravil pa teh podatkov ni. Velik analitični izziv predstavlja tudi nizka koncentracija citostatikov v okolju. Primarno se je zato potrebno usmeriti v preverjanje najbolj uporabljenih citostatikov, saj lahko pričakujemo, da jih bomo v okolju lažje zasledili. Poleg citostatikov je potrebno preverjati še njihove metabolite, ki lahko biološko vplivajo na vodne organizme. Takšen je npr. metabolit imatiniba N-desmetilmetabolit (Besse in sod., 2012). Tudi v tem primeru je težava v njihovih majhnih količinah v okolju.

2.3.2 Biorazgradljivost

Glede na to, da večina citostatikov ni biorazgradljivih, se v okolju pojavljajo v vedno večjih količinah. Razlog za njihovo slabo razgradljivost je predvsem v kemijski strukturi in stereokemiji. S spremembo njihove strukture bi morda lahko vplivali na razgradljivost in posledično nižjo koncentracijo v okolju. Kummerer in sod. (2000) so ugotovili, da lahko bakterije pospešijo delovanje specifičnih encimov s svojimi komponentami. Ena takšnih je β -D-glukosilisofosfamid. Le-ta se nahaja v gorčici in ima antineoplastično aktivnost, ki bi jo lahko uporabili za pospeševanje razgradnje citostatikov (Kummerer in sod., 2000). Na biorazgradnjo bi lahko vplivala tudi fotoliza. MET, vinblastin in etopozid lahko potencialno absorbirajo sončno svetlobo, kar tudi lahko omogoča spremembo molekul (Kosjek in Heath, 2011). Zgoraj omenjeni citostatiki imajo v svoji strukturi veliko atmosferskega hidroksilnega radikala (\cdot HO). Le-ta je zelo reaktiven, v atmosferski kemiji reagira z vodo, nastaja pa tudi z disociacijo H_2O_2 ob prisotnosti UV svetlobe. S tem je omogočena nadaljnja oksidacija snovi (Kosjek in Heath, 2011).

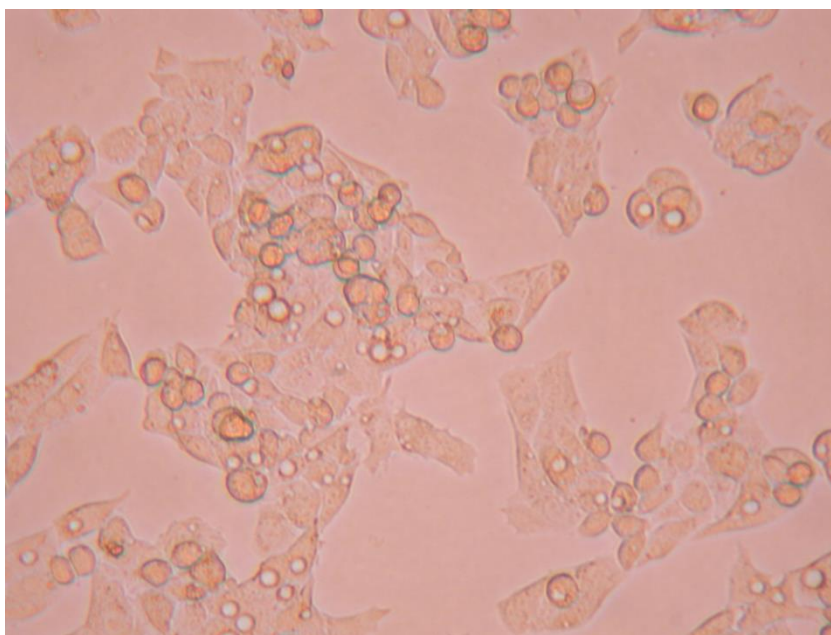
Med redkimi biorazgradljivimi citostatiki je citarabin. Raziskave kažejo, da je biorazgradnja manj uspešna, ko je citarabin v mešanici z drugimi citostatiki (Kiffmeyer in sod., 1998). Podobni rezultati veljajo za 5-FU in MET. 5-FU je bil popolnoma odstranjen iz odpadnih vod, vendar pa količina niha glede na začetno koncentracijo (večja kot je koncentracija 5-FU, slabša je biorazgradljivost) (Kiffmeyer in sod., 1998). Ko so primerjali razlike med razgradljivostjo 5-FU in citarabinom ter gemcitabinom so ugotovili, da sta slednja bolj razgradljiva zaradi kemijske strukture - 5-FU ne vsebuje sladkorja (Kummerer in Al-Ahmad, 1997). Raziskave o biorazgradljivosti etopozida še ni, vendar je verjetno slabo biorazgradljiv v okolju (TOXNET).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Celična linija HepG2

V naši nalogi smo uporabili človeške jetrne celice HepG2, ki so bile izolirane leta 1979 iz hepatoblastoma 11-letnega dečka iz Argentine (Aden in sod., 1979). Za njih je značilno, da sintetizirajo in sproščajo v gojišče številne beljakovine, ki jih izločajo tudi normalne jetrne celice (Natarajan in Darroudi, 1991). Uporabljali smo jih največ do 12. pasaže, ker po daljšem času v kulturi celice spremenijo morfologijo in tudi izražanje metabolnih encimov upade. Celična linija HepG2 je posebej uveljavljena na področju genetske toksikologije. Zaradi ohranjene aktivnosti številnih encimov metabolne transformacije faze I (citokrom P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B in CYP2E1) in II (glutation-S-transferaza, sulfotransferaza, N-acetiltransferaza in glukuranoziltransferaza), ki igrajo pomembno vlogo v aktivaciji in detoksifikaciji promutagenov, omogoča preučevanje neposrednih in posrednih mutagenov (Knasmüller in sod. 1998). Čeprav so celice HepG2 eden izmed redkih *in vitro* sistemov, ki imajo ohranjeno aktivnost metabolnih encimov, je le-ta vseeno veliko nižja kot je v jetrnem tkivu *in vivo*. Kljub temu je celična linija HepG2 zaradi dobre opredelitve zelo uveljavljena, z uporabo uveljavljene kulture pa se izognemo tudi variabilnosti/spremenljivosti v izražanju metabolnih encimov, ki so prisotni pri uporabi primarnih hepatocit. Poleg tega z uporabo *in vitro* celične kulture prispevamo tudi k zmanjšanju uporabe živali v poskusih (Uhl, Helma in Knasmüller, 2000), kar je eden izmed glavnih ciljev Evropske zakonodaje za kemijsko varnost (REACH, okrajšava za uredbo o Registraciji, Evalvaciji, Avtorizaciji in omejevanju Kemikalij).



Slika 3: Celična linija HepG2. Slika prikazuje celice linije HepG2 pri 100x povečavi (fotografirala J. Nunić)

Celično linijo HepG2, ki smo jo uporabili pri našem delu, je poklonil dr. Firouz Darroudi (Oddelek za kemijsko mutagenozo; Univerza v Leidnu, Nizozemska) in jo hrani Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka, Večna pot 111, Ljubljana.

3.1.2 Kemikalije

V magistrski nalogi smo uporabili kemikalije, ki so navedene v Preglednici 2, medtem ko so v Preglednici 3 izpostavljeni nekateri podatki o citostatikih, ki so bili uporabljeni v nalogi.

Preglednica 2: Kemikalije uporabljene v magistrski nalogi.

Spojina	Proizvajalec	Kataloška številka
Benzo(a)piren (Benzo(a)pyrene)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	B-1760
Cisplatin (Cisplatine)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	479306
Destilirana voda (dH ₂ O)		
Dimetil sulfoksid DMSO (Dimethyl sulphoxyde)	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	1.02952.1000

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3: Kemikalije uporabljene v magistrski nalogi

EDTA (Ethilenediaminetetraacetic acid disodium salt dyhydrate 99 + %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	E5134-250G
Etidijev bromid EtBR (Ethidium Bromide)	Gibco BRL, Paisley, Škotska	15585-011
Etopozid (Etoposide)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Nemčija	Sc-3512
Fetalni goveji serum FBS (Fetale bovine serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija	A15-104
Fosfatna fiziološka raztopina PBS (Dulbecco's PBS (10×) without Ca and Mg)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija	H15-104
Imatinib mezilat (Imatinib mesylate)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Nemčija	Sc-202180
LMP-agaroz (Low melting point agarose)	Invitrogen, Carlsbad, Združeno kraljestvo	15517-022
medij Williams	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	W1878
MTT (1-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	M-5655
Natrijev hidroksid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	1.06498.1000
Natrijev klorid NaCl (Sodium chloride)	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	1.06404.1000
NMP-agaroz (Ultra Pure™ Agarose)	Invitrogen, Carlsbad, Združeno kraljestvo	16500-100
L-glutamin (L-glutamine)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija	M11-006
Raztopina penicilina in streptomocina (Penicillin-streptomycin solution 100×)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Avstrija	P11-010
Raztopina pufru pH 7 (Buffer solution)	Sigma-Aldrich, Seelze, Nemčija	33646
Raztopina pufru pH 10 (Buffer solution (0,4 %))	Sigma-Aldrich, Seelze, Nemčija	33549

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Kemikalije uporabljene v magistrski nalogi

Tripansko modrilo (Trypane blue)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	T8154
Tris (hydroxymethyl)-aminoethan GR for analysis buffer substance	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija	1.08382.1000
Trypsin (Trypsin-EDTA (1x))	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	T-4174
Triton- X100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	93420-250ml

Preglednica 5: Podatki o citostatikih, uporabljenih v magistrski nalogi.

Citostatik	Topilo	Založna koncentracija	CAS številka	Molekulska masa
Etopozid	DMSO	25 mg/ml	33419-42-0	588,557 g/mol
Cisplatin	dH ₂ O	1mg/ml	15663-27-1	300,05 g/mol
Imatinib	dH ₂ O	50 mg/ml	220127-57-1	589,7 g/mol

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje celic HepG2

Celice HepG2 smo gojili na ploščah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) s površino 25 cm² (T-25) in 75 cm² (T-75) v celičnem inkubatorju pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % CO₂.

Preglednica 6: Sestava gojišča.

<u>SESTAVINE</u>	<u>KOLIČINA (50 ml)</u>
penicilin/streptomycin	0,5 ml
200 mM L-glutamin	1 ml
fetalni goveji serum FBS	7,5 ml
medij Williams	41 ml

Celicam smo medij menjali vsake 2-3 dni in jih presajali najmanj dvakrat na teden.

Presajanje celic

Celice smo presajali ko je bila preraščenost plošče oziroma konfluenta 80% . Delo s celicami je potekalo v brezprašni komori. Iz platenke smo odstranili gojišče in površino previdno sprali s fosfatnim pufrom (1×PBS). PBS smo nato odstranili in dodali 0,1 % tripsin za celice HepG2. Po 5 minutah inkubacije na 37 °C smo celice rahlo pretresli, da so se odlepili od podlage. Nato smo dodali sveže gojišče. Serum v gojišču zavre delovanje tripsina in tako prepreči odmiranje celic zaradi tripsina. Celice smo nato pri 800 obratih/minuto centrifugirali 5 minut. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v gojišču. Celično suspenzijo smo 8x previdno povlekli s pomočjo brizge skozi injekcijsko iglo (0.9x40 mm, Becton Dickenson, Fraga, Španija) in na ta način dobili suspenzijo posameznih celic, ki smo jih nasadili v novo platenko z ustrežno količino gojišča.

Za hitro preverjanje živosti in številčnosti celic smo celice šteli v Bürker-Türkovi ploščici za štetje celic. Predhodno smo celice barvali z raztopino tripan modrega, v razmerju 1:5 (10 µl celične suspenzije in 40 µl barvila). Tripian modro je barvalo, ki prosto prehaja membrane celic. Žive celice ga aktivno izločijo, mrtve pa ne; posledično ostanejo mrtve celice obarvane modro in jih lahko ločimo od živih celic.

3.2.2 Določanje citotoksičnosti – test MTT

Za testiranje citotoksičnosti citostatikov in za določitev koncentracij ter časov izpostavitve za nadaljnje poskuse smo uporabili test MTT, po Mosmannu (1983) z manjšimi spremembami. MTT (1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid) je rumena vodoodporna substanca, ki jo mitohondrijski encim sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste kristale formazana. Le-ti niso topni v vodi, medtem ko se topijo v organskih topilih, kot sta izopropanol in DMSO. Količino nastalega formazana določimo kolorimetrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 570 nm z referenčnim filtrom valovne dolžine 690 nm (A579/690). Absorbanca je linearno odvisna od števila živih celic in je specifična za vsako celično linijo, saj prihaja do razlik v metabolni aktivnosti. Metoda je primerna za celične linije, kjer celice rastejo v enem sloju ali pa v suspenziji. Slabost testa MTT je, da ne ločuje med citotoksičnostjo (toksičnost za celice) in citostatičnostjo (inhibicija rasti celic).

Postopek

Celice smo nasadili na mikrotitrne plošče (NUNC A/S, Roskilde, Danska, 163320) s 96 vdolbinami (40.000 celic/ml oziroma 8.000 celic/vdolbino) in jih pustili čez noč, da so se pritrdile. Nato smo celice za 4, 24, 48 in 72 ur izpostavili izbranim citostatikom – celicam smo odstranili medij in ga zamenjali s svežim gojiščem z različnimi koncentracijami vzorcev (0-150 µg/ml). Pri vsakem poskusu smo naredili negativno kontrolo, kateri smo dodali le sveže gojišče, in kontrolo topila. Le-ta se je pri posameznih citostatikih razlikovala v odvisnosti od uporabljenega topila (Preglednica 5). Po izteku tretmaja smo celicam dodali MTT-reagent (končna koncentracija 0,5 mg/mL) ter inkubirali dodatne 3 ure. Nato smo odstranili medij in nastale formazanske kristale raztopili v DMSO ter merili absorbanco pri 570 nm (z referenčno valovno dolžino pri 690 nm) s pomočjo spektrofleurimetra (Synergy MX, Biotek, ZDA). Relativno preživelost smo določali s primerjavo absorbance pri tretiranih celicah in kontroli topila. Poskus smo izvedli vsaj v treh neodvisnih ponovitvah v petih paralelah za vsak citostatik.

Za analizo razlik med celicami tretiranimi s citostatiki in celicami kontrole topila smo uporabili Studentov t-test ($p < 0.05$).

Tretiranje celic:

Preglednica 7: Uporabljene koncentracije izbranih citostatikov in kontrol topila pri testu MTT.

Citostatik	Kontrola topila	Koncentracije citostatika [$\mu\text{g/ml}$]:
<i>Etopozid</i>	0,6 % DMSO	0, 0,29; 0,59; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150
<i>Cisplatin</i>	^a	0, 0,29; 0,59; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150
<i>Imatinib</i>	0,3 % dH ₂ O	0, 0,29; 0,59; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150

^a Pri tretiranju celic s cisplatinom kontrole topila nismo testirali, saj je bil volumen dH₂O zanemarljiv.

3.2.3 Določanje genotoksičnosti – test komet

3.2.3.1 Test komet

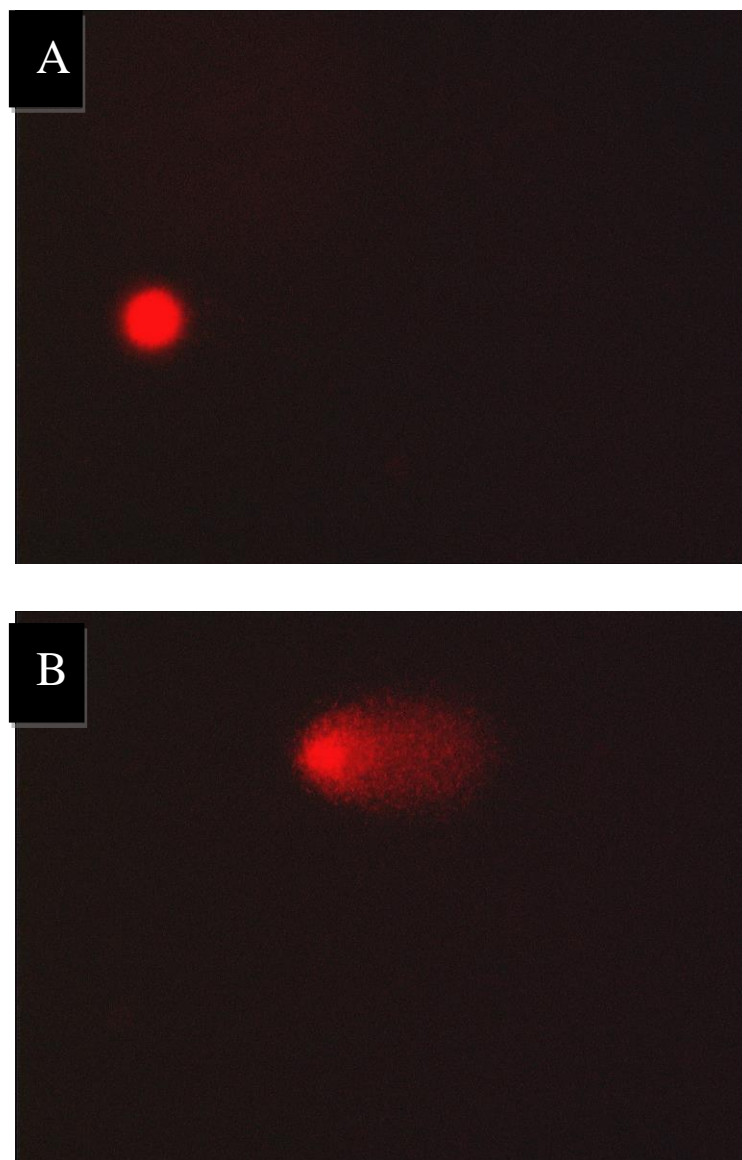
Test komet oz. gelska elektroforeza posamezne celice (SCGE – ang. »single cell gel electrophoresis«) se uporablja za določanje genotoksičnosti. Gre za enostavno in hitro metodo, s katero zaznavamo različne tipe poškodb DNA, kot so dvoverižni prelomi (DSB, ang. »double-strand breaks«), enoverižni prelomi (SSB, ang. »single-strand break«) in alkalno labilna mesta (ALS, ang. »alkali-labile sites«) (Collins, 2004).

Metodo sta razvila Östling in Johanson leta 1984 (Östling in Johanson, 1984), ki sta celice lizirala v agaroznem gelu in jih za kratek čas izpostavila elektroforezi pri nevtralnem pH, kar je omogočilo zaznavanje DSB. Leta 1988 je Singh s sodelavci uporabil zgoraj opisani test komet, ki je vključeval elektroforezo v alkalnih pogojih ($\text{pH} > 13$), kar je omogočilo zaznavanje DSB, ki nastanejo kot vmesna stopnja v procesu popravljanja poškodb DNA in ALS, ki pri visokem pH hidrolizirajo in se tako pretvorijo v prekinitve DNA (Singh in sod., 1988). S testom komet lahko tako določimo prelome DNA, ki jih povzročajo mutageni neposredno (npr. gama žarki, X- žarki, UV žarki, H_2O_2), ALS (so posledica delovanja npr. alkilirajočih kemikalij) ter prelome DNA, ki nastanejo kot vmesna stopnja v procesu BER ali NER. Večina genotoksičnih snovi povzroča nastanek SSB ali ALS (Tice in sod., 2000).

Alkalna različica testa komet je zaradi pretvorbe ALS v prelome ena izmed bolj občutljivih in se zato danes najpogosteje uporablja (Tice in sod., 2000). Pri tej različici celice pomešamo z agarozo in suspenzijo naneseemo na objektiva stekelca. Temu sledi liza z detergentom pri visokem pH, ki razgradi vse celične komponente razen gosto zvite DNA s histoni v jedru; alkalno odvijanje, pri katerem DNA denaturira in na alkalno labilnih mestih v DNA nastanejo enoverižni prelomi; sledi elektroforeza pri visokem pH. Pri DNA z veliko prelomi se zvita struktura »razrahlja«- takšni deli negativno nabite DNA hitreje potujejo v električnem polju ter ustvarijo značilen rep kometa, po čemer je dobila metoda tudi svoje ime. Po drugi strani je nepoškodovana DNA zvita okrog histonov in ne potuje v električnem polju, zato pri kontrolnih celicah ne opazimo značilnega repa kometa.

Po končani elektroforezi preparate nevtraliziramo in jedra celic barvamo s fluorescentnim barvilom, ki se vrine med bazne pare DNA (npr. etidijev bromid) ter slikamo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa. Poškodbe DNA lahko ovrednotimo ročno ali z računalniško analizo slik posameznih jeder tako imenovanih kometov. Pri tem lahko uporabimo več parametrov. Med najbolj uporabljenimi so: dolžina repa, izražena v mikrometrih, ki predstavlja razdaljo od DNA v glavi kometa do zadnjega fragmenta DNA v repu, odstotek

DNA, ki je prepotovala iz glave v rep komete in repni moment, ki se izračuna kot produkt dolžine repa in odstotka DNA v repu (Collins in sod., 2004). V magistrski nalogi smo za ovrednotenje poškodb DNA uporabili odstotek DNA, ki je prepotovala iz glave v rep komete. Čim bolj je jedro poškodovano, tem več DNA je v repu (Žegura in Filipič, 2004).



Slika 4: Test komet. Primer celic z nepoškodovanim (A) in poškodovanim (B) dednim materialom (fotografirala dr. B. Žegura).

Test komet se uporablja za ugotavljanje genotoksičnosti, študije popravljanja DNA, v ekotoksikologiji, okoljskem monitoringu, kliničnih aplikacijah, analizah celičnega cikla itn. (Žegura in Filipič, 2004). V primerjavi z ostalimi tehnikami za določanje genotoksičnosti ima test komet več prednosti. Predvsem so to: velika občutljivost (pomembno pri ugotavljanju majhnega števila poškodb DNA), fleksibilnost, nizka cena,

enostavnost, potrebna je relativno majhna količina testirane snovi, čas potreben za izvedbo testa je relativno kratek (Tice in sod., 2000), prav tako uporabimo lahko skoraj vseh evkariontske celične kulture (Rojas in sod., 1999).

3.2.3.2 Tretiranje celic

Celice smo nasadili na plošče z 12 vdolbinami (Corning Costar Corporation, New York, ZDA). V vsako vdolbino smo nasadili ~80.000 cel/ml in jih pustili čez noč, da so se pritrdile. Naslednji dan smo celice izpostavili različnim koncentracijam citostatikov za 4 in 24 ur. Pri vsakem poskusu smo uporabili negativno kontrolo, pri čemer smo celice izpostavili le celičnemu gojišču, kontrolo topila (Preglednica 5) ter pozitivno kontrolo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili mutagen benzo(a)piren (B(a)P) s 30 μ M koncentracijo. B(a)P smo izbrali kot pozitivno kontrolo, ker spada med promutagene snovi, ki potrebujejo metabolično aktivacijo za svoje genotoksično delovanje.

Preglednica 8: Uporabljene koncentracije izbranih citostatikov in kontrol topila pri testu komet.

Citostatik	Kontrola topila	Koncentracije citostatika [μ g/ml]
<i>Etopozid</i>	0,04 % DMSO	0,01; 0,1; 1; 5; 10
<i>Cisplatin</i>	1 % dH ₂ O	0,01; 0,1; 1; 5; 10
<i>Imatinib</i>	1,6 % dH ₂ O	0,01; 0,1; 1; 5; 10

3.2.3.3 Priprava suspenzije posameznih celic in nanos na objektna stekelca

Po inkubaciji smo celicam odstranili gojišče z ustreznim citostatikom, jih sprali z 1xPBS in dodali 0,1 % tripsin. Po odlepljanju celic smo jim dodali sveže gojišče in suspenzijo centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Celicam smo potem odstranili supernatant in jih resuspendirali v 60 μ l svežega gojišča. Celično suspenzijo smo nato razdelili v dve sveži centrifugirki.

Na peskana objektna stekelca (Surgipath, ZDA), ki smo jih pred uporabo razmastili tako, da smo jih čez noč namočili v metanolu, potem pa metanol odstranili z ožiganjem stekelc, smo najprej smo nanесли 80 μ l 1 % agaroze z normalno točko tališča (NMP - ang. »Normal Melting Point«) (Preglednica 7) in agarozo pokrili s krovnim stekelcem. Objektna stekelca z agarozo smo za 5 minut položili v hladilnik na 4 °C, da se je agarozna strdila. Nato smo krovna stekelca odstranili in nanесли drugo plast 1 % agaroze z nizko točko tališča (LMP - ang. »Low Melting Point«) (Preglednica 7) tako, da smo 70 μ l LMP agaroze pomešali s 30 μ l celične suspenzije in spet pokrili s krovnim stekelcem. Objektna stekelca smo za 5 minut položili v hladilnik na 4 °C, da se je agarozna s celicami strdila. Na vsakem stekelcu

smo imeli dva gela. Zaradi občutljivosti testa komet smo vse naslednje korake izvajali v temi pri 4 °C. S tem smo preprečili, da bi prišlo do poškodb DNA zaradi zunanjih vplivov, kot je na primer dnevna svetloba.

Preglednica 9: Priprava 1 % agaroze NMP in LMP.

<u>SESTAVINE</u>	<u>KOLIČINA</u>	<u>KONCENTRACIJA</u>
Agarozna NMP ali LMP	0,05 g	1 %
1XPBS	5,00 ml	
Agarozo raztopimo v 1xPBS z mešanjem in segrevanjem do vrelišča		

3.2.3.4 Alkalna liza celic

Objektnim stekelcem s strjeno suspenzijo celic v agarozni so odstranili krovna stekelca in jih potopili v ohlajeno raztopino (4 °C) za liziranje celic s pH 10 (Preglednica 8) za najmanj 1 uro na 4 °C v temi.

Preglednica 10: Priprava raztopine za alkalno lizo celic.

<u>SESTAVINE</u>	<u>KOLIČINA</u>	<u>KONCENTRACIJA</u>
NaCl	43,92 g	2,5 M
EDTA	11,16 g	100 mM
Tris	0,36 g	10 mM
dH ₂ O	Dopolnimo do 300 ml	
Umerimo pH na 10 z 10 M NaOH oziroma 30 % HCl		
Postavimo v hladilnik na 4 °C		
Triton X-100 (dodamo tik pred uporabo v končni koncentraciji 1 %)	3,00 ml	

3.2.3.5 Odvijanje DNA in elektroforeza

Po končani alkalni lizi celic smo stekelca z geli položili v elektroforetsko kadičko. Pri tem smo pazili, da so se stekelca tesno prilegala druga drugemu in prazna mesta zapolnili s praznimi objektnimi stekelci (s tem smo zagotovili homogenost električnega polja). Potem smo stekelca prelili s sveže pripravljeno ohlajeno elektroforetskim pufrom (4 °C)

(Preglednica 9) z visokim pH (13). Alkalno odvijanje je potekalo 20 minut na 4 °C v temi. V primeru poškodb se v tem času DNA začne odvijati na mestih prelomov verig.

Po odvijanju je sledila elektroforeza, ki je prav tako potekala 20 minut na 4 °C v temi. DNA smo izpostavili električnemu polju pri napetosti 25 V, toku 300 mA in moči 400 W.

Preglednica 11: Priprava elektroforetskega pufra.

<u>SESTAVINE</u>	<u>KOLIČINA (1250 ml)</u>	<u>KONCENTRACIJA</u>
dH ₂ O	1206,25 ml	
EDTA	6,25 ml	0,2 M
NaOH	37,50 ml	10 M
Postavimo v hladilnik na 4 °C		

3.2.3.6 Nevtralizacija

Po končani elektroforezi, smo stekelca z geli preložili v kadičko, s predhodno na 4 °C ohlajeno raztopino za nevtralizacijo (Preglednica 10). Nevtralizacija je potekala 15 minut na 4 °C v temi.

Preglednica 12: Priprava raztopine za nevtralizacijo.

<u>SESTAVINE</u>	<u>KOLIČINA (300 ml)</u>	<u>KONCENTRACIJA</u>
Tris	14,532 g	0,4 M
dH ₂ O	Dopolnimo do 300 ml	
Umerimo pH vrednost na 7,5 z 10 M NaOH oziroma 30 % HCl		
Postavimo v hladilnik na 4 °C		

Do mikroskopiranja smo objektna stekelca z geli shranjevali v plastični kadički, pokriti z aluminijasto folijo, na 4 °C. Da se geli ne bi izsušili, smo kadičko obložili z vlažno staničevino.

3.2.3.7 Slikanje jeder celic in merjenje poškodb DNA

Pred slikanjem smo gele obarvali z 20 µl EtBr s koncentracijo 5 µg/ml. Jedra smo slikali, šteli in opazovali s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) z G2A žarnico (Nikon HB-10104AF, Japonska) pri 400-kratni povečavi. Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515-560 nm, zaporni pa 590 nm.

Na vsakem objektnejem stekelcu smo poslikali 50 jeder, pri čemer smo se izogibali robnim delom gela. Slike smo s črno-belo kamere prenesli na računalnik in jih analizirali z računalniškim programom Comet Assay IV (Perceptive Instruments, Združeno kraljestvo). Kot parameter za statistično analizo smo izbrali % DNA v repu kometa.

Za vsako koncentracijo vzorcev, negativno in obe pozitivni kontroli, smo pri vseh časih inkubacije naredili tri neodvisne poskuse.

3.2.3.8 Analiza rezultatov

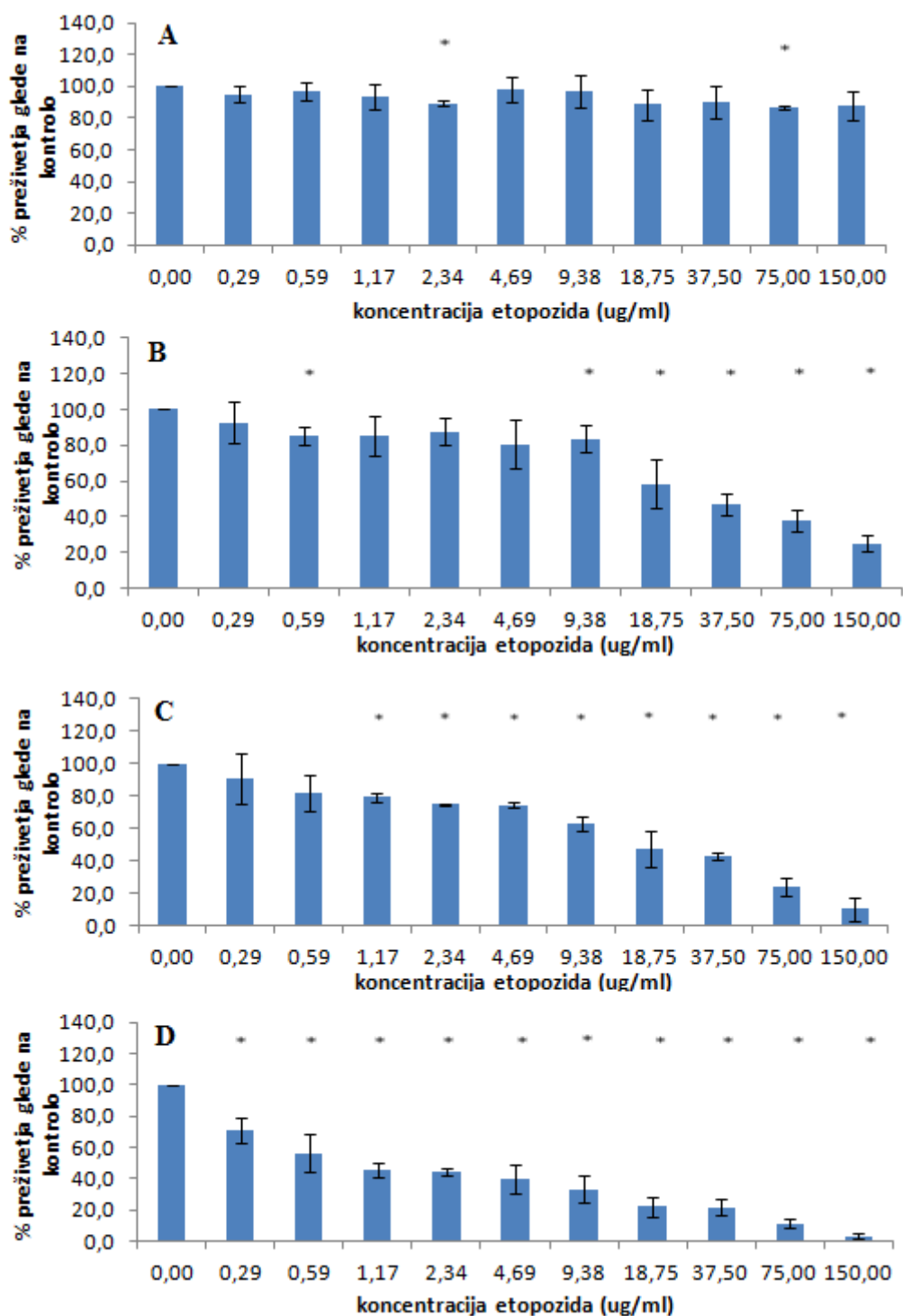
Rezultate smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism. Za analizo razlik med celicami, ki so bile tretirane z vzorci in kontrolnimi celicami, smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo vrednosti median odstotka DNA v repu znotraj poskusov, smo uporabili test Dunnett, pri čemer smo $p < 0,05$, $p < 0,01$ ali $p < 0,001$ določili kot statistično značilne razlike.

4 REZULTATI

4.1 CITOTOKSIČNOST IZBRANIH CITOSTATIKOV – TEST MTT

Za preverjanje citotoksičnosti izbranih citostatikov (etopozid, cisplatin in imatinib mezilat) na celicah HepG2 smo uporabili test MTT. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam citostatikov (0,29; 0,59; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,50; 75,00 in 150,00 µg/ml) za 4, 24, 48 in 72 ur. Rezultati so prikazani na Slikah 5, 6 in 7.

4.1.1 Etopozid



Slika 5: Vpliv etopozida na preživetje celic HepG2. Celice so bile izpostavljene različnim koncentracijam etopozida (0,29; 0,59; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,50; 75,00 in 150,00 µg/ml) za 4 (A), 24 (B), 48 (C) in 72 ur (D), nato smo izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživelosti celic HepG2 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD).

(*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Studentov t-test, $p < 0,05$).

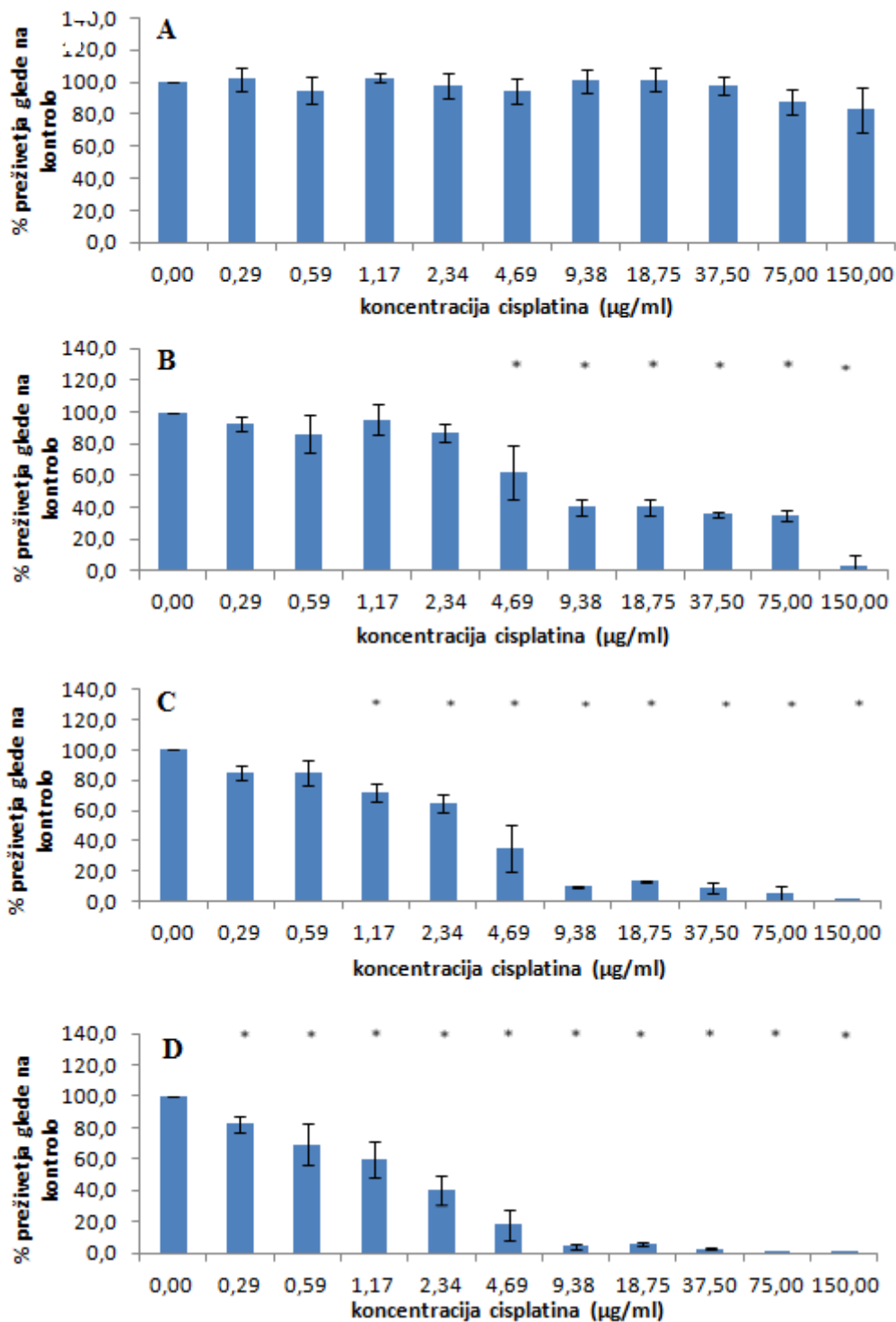
Ugotovili smo, da je po 4 urni izpostavljenosti celic HepG2 etopozid statistično značilno zmanjšal odstotek preživetja celic pri dveh koncentracijah. Pri koncentraciji 2,34 $\mu\text{g/ml}$ se je preživetje zmanjšalo na 89,20 % glede na kontrolo, pri koncentraciji 75,00 $\mu\text{g/ml}$ pa na 86,96 % glede na kontrolno skupino (Slika 5A).

Po 24 urah izpostavitve so rezultati pokazali, da je etopozid statistično značilno znižal preživetje celic HepG2 pri koncentracijah 0,59 (85,51 %); 9,38 (83,44 %); 18,75 (58,39 %); 37,50 (46,52 %); 75,00 (37,74 %) in 150,00 $\mu\text{g/ml}$ (25,00 %) (Slika 5B).

Po 48 urah izpostavitve je etopozid statistično značilno znižal preživetje celic HepG2 pri koncentraciji 1,17 $\mu\text{g/ml}$ (79,42 %) in pri vseh ostalih višjih koncentracijah [2,34 (74,72 %); 4,69 (74,27 %); 9,38 (63,21 %); 18,75 (47,43 %); 37,50 (42,99 %)] 75,00 (24,28 %) celic v primerjavi s kontrolno skupino in pri koncentraciji 150,00 $\mu\text{g/ml}$, kjer je preživelo 10,21 % celic v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 5C).

Pri celicah, izpostavljenih etopozidu 72 ur, smo opazili statistično značilno znižanje preživelosti že pri koncentraciji 0,29 $\mu\text{g/ml}$. Preživelost celic bila znižana na 70,80 % v primerjavi s kontrolno skupino, Prav tako je bila preživelost nižja pri ostalih koncentracijah [0,59 (56,35 %); 1,17 (45,34 %); 2,34 (44,74 %); 4,69 (40,13 %); 9,38 (33,58 %); 18,75 (22,51 %); 37,50 (21,72 %); 75,00 (11,52 %)]. Pri najvišji koncentraciji 150,00 $\mu\text{g/ml}$ je bila preživelost celic znižana na 3,54 % v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 5D).

4.1.2 Cisplatin



Slika 6: Vpliv cisplatina na preživetje celic HepG2. Celice so bile izpostavljene različnim koncentracijam cisplatina (0,29; 0,59; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,50; 75,00 in 150,00 µg/ml) za 4 (A), 24 (B), 48 (C) in

72 ur (D), nato smo izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživelosti celic HepG2 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov \pm SD).

(*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Studentov t-test, $p < 0,05$).

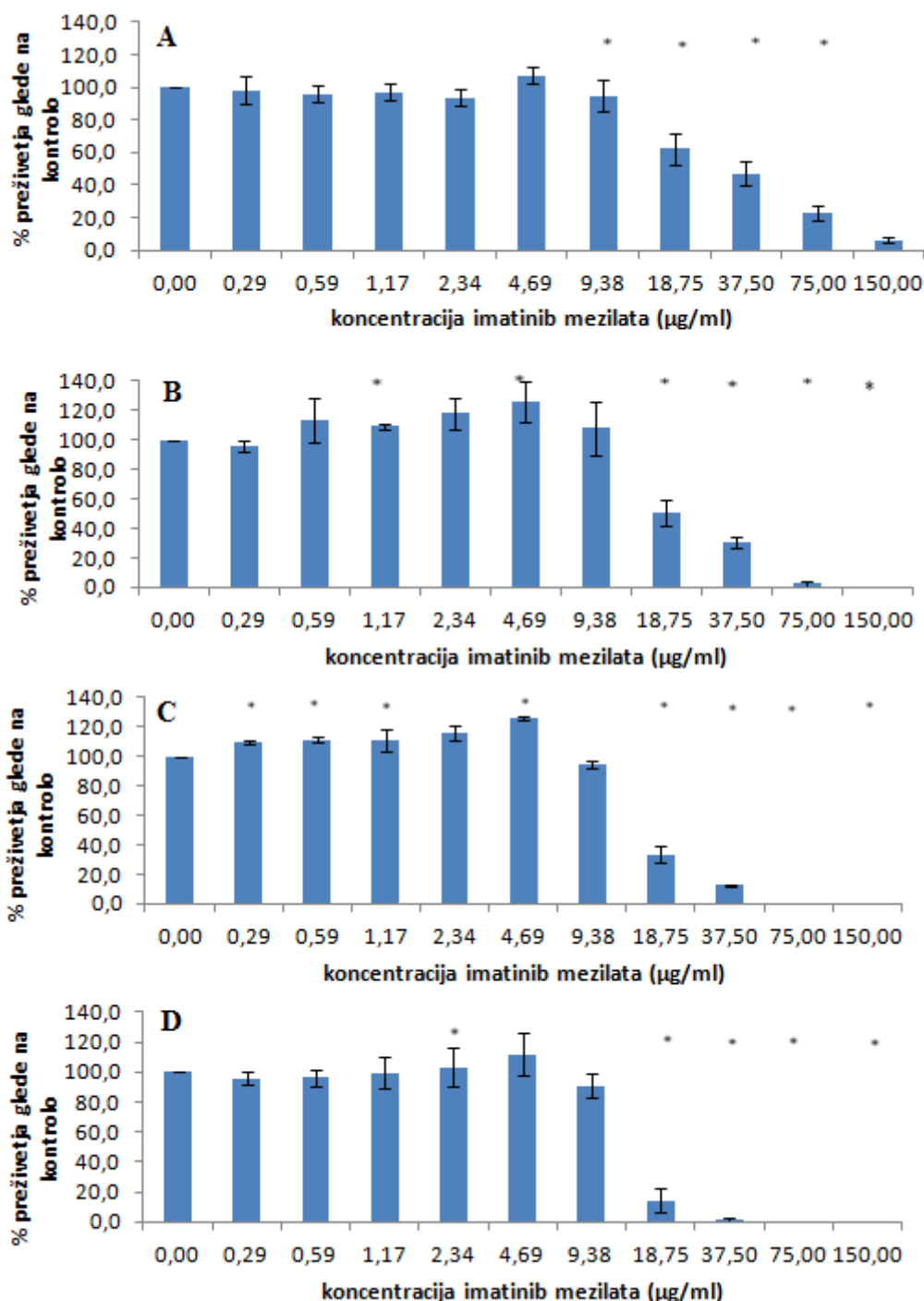
Statistično značilnega vpliva cisplatina na preživetje celic HepG2 po 4 urni izpostavljenosti nismo opazili (Slika 6A).

Po 24 urni izpostavitvi celic HepG2 cisplatinu smo opazili statistično značilen vpliv na znižanje preživetja pri koncentracijah 2,34 (87,29 %); 4,69 (61,88 %); 9,38 (40,26 %); 18,75 (40,16 %); 37,50 (35,73 %); 75,00 (35,31 %) in pri koncentraciji 150,00 $\mu\text{g/ml}$ (3,73 %) (Slika 6B).

Po izpostavitvi celic HepG2 cisplatinu za 48 ur smo opazili statistično značilno znižanje preživetja pri koncentraciji 1,17 $\mu\text{g/ml}$. Preživetje pri tej koncentraciji je bilo 72,16 % v primerjavi s kontrolno skupino. Prav tako je bilo preživetje nižje pri vseh ostalih višjih koncentracijah [2,34 (64,99 %); 4,69 (34,86 %); 9,38 (9,58 %); 18,75 (12,98 %); 37,50 (8,89 %), 5,00 (4,72 %)] in pri najvišji koncentraciji 150,00 $\mu\text{g/ml}$, kjer je bilo 0,31 % v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 6C).

Pri celicah HepG2, izpostavljenih cisplatinu za 72 ur, smo opazili statistično značilno znižanje preživetja pri naslednjih koncentracijah: 0,59 (69,02 %); 1,17 (59,85 %); 2,34 (39,87 %); 4,69 (17,99 %); 9,38 (4,15 %); 18,75 (5,66 %); 37,50 (2,82 %); 75,00 (0,53 %) in pri najvišji koncentraciji 150,00 $\mu\text{g/ml}$, pri kateri je preživel 0,04% celic v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 6D).

4.1.3 Imatinib mezilat



Slika 7: Vpliv imatinib mezilata na preživetje celic HepG2.

Celice so bile izpostavljene različnim koncentracijam imatinib mezilata (0,29; 0,59; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,50; 75,00 in 150,00 µg/ml) za 4 (A), 24 (B), 48 (C) in 72 ur (D), nato smo izvedli test MTT.

Rezultati so podani kot % preživelosti celic HepG2 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov \pm SD).

(*) statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Studentov t-test, $p < 0,05$).

Iz rezultatov je razvidno, da bilo je preživetje celic HepG2 po 4 urni izpostavitvi imatinib mezilatu statistično značilno znižano pri koncentracijah 18,75 (61,98 %); 37,50 (46,75 %); 75,00 (22,72 %) in 150,00 $\mu\text{g/ml}$, kjer je 6,17 % v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 7A).

Imatinib mezilat je po 24 urni izpostavljenosti pri koncentracijah 1,17 in 4,69 $\mu\text{g/ml}$ celo povečal preživetje na 109,35 % in 125,83 % glede na kontrolo. Po izpostavitvi višjim koncentracijam smo opazili znižanje preživetja pri koncentraciji 18,75 $\mu\text{g/ml}$ na 50,50 %, pri koncentraciji 37,50 $\mu\text{g/ml}$ na 30,73 %, pri koncentraciji 75,00 $\mu\text{g/ml}$ na 2,36 %. Pri koncentraciji 150,00 $\mu\text{g/ml}$ je bil odstotek preživetja glede na kontrolo 0 % (Slika 7B).

Statistično značilen vpliv imatinib mezilata na celice HepG2 po 48 urni izpostavitvi smo opazili pri koncentracijah 0,29 $\mu\text{g/ml}$, kjer je preživetje celic povečano v primerjavi s kontrolno skupino na 109,78 %, in prav tako pri koncentracijah 0,59 $\mu\text{g/ml}$, (111,31 %), 1,17 $\mu\text{g/ml}$ (110,84 %) ter 4,69 $\mu\text{g/ml}$ (125,90 %). Po izpostavitvi višjim koncentracijam smo spet opazili znižanje preživetja v primerjavi s kontrolno skupino, in sicer pri 18,75 $\mu\text{g/ml}$ na 33,20 %, pri koncentraciji 37,50 $\mu\text{g/ml}$ na 12,40 %. Pri koncentracijah 75,00 ter 150,00 $\mu\text{g/ml}$ je bilo preživetje celic v primerjavi s kontrolno skupino 0 % (Slika 7C).

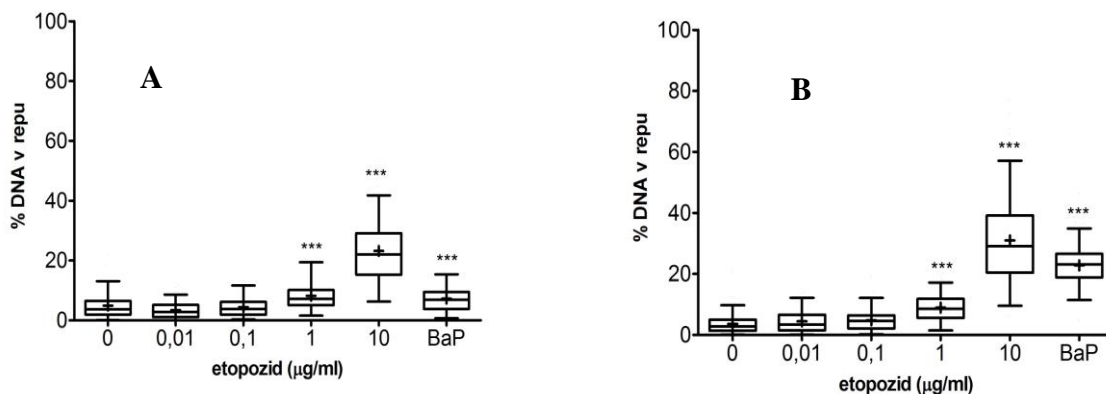
Pri celicah HepG2, izpostavljenih imatinib mezilatu 72 ur, smo pri koncentraciji 2,34 $\mu\text{g/ml}$ opazili statistično značilno povečanje preživetje glede na kontrolo (102,94 %), medtem ko smo pri koncentraciji 18,75 in višjih opazili znižanje preživetja. Po izpostavitvi koncentraciji 18,75 $\mu\text{g/ml}$ je preživel 14,24 % celic v primerjavi s kontrolno skupino, pri koncentraciji 37,50 $\mu\text{g/ml}$ pa 1,86 % celic. Pri koncentracijah 75,00 in 150,00 $\mu\text{g/ml}$ je bilo preživetje celic v primerjavi s kontrolno skupino 0 % (Slika 7D).

Glede na to, da s testom MTT merimo metabolno aktivnost, opaženo navidezno povečanje celičnega preživetja verjetno odraža pospešen metabolizem kot posledico stresa, povzročenega z izpostavitvijo imatinib mezilatu.

4.2 GENOTOKSIČNOST IZBRANIH CITOSTATIKOV - TEST KOMET

Genotoksično delovanje izbranih citostatikov (etopozid, cisplatin in imatinib mezilat) na celice HepG2 smo preverili s testom komet. Rezultati so prikazani na Slikah 8, 9 in 10.

4.2.1 Etopozid

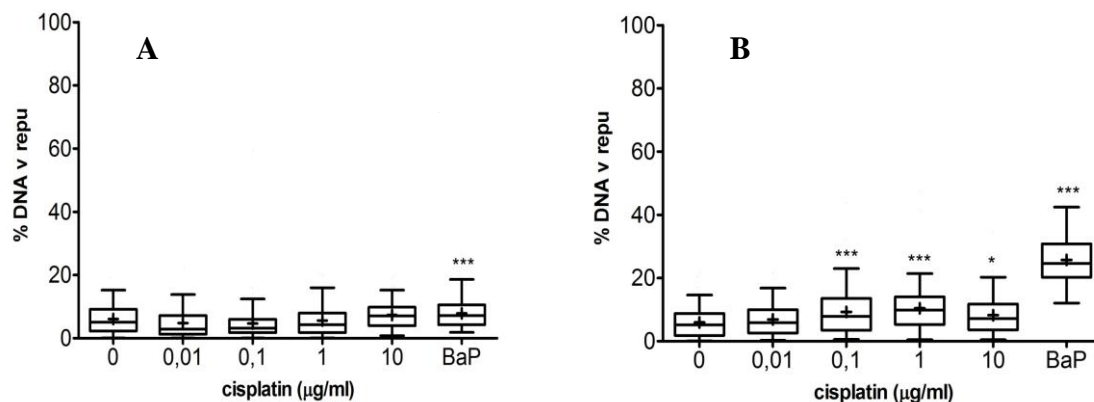


Slika 8. Vpliv etopozida na nastanek prelomov DNA. Celice HepG2 smo izpostavili različnim koncentracijam etopozida (0,01; 0,1, 1 in 10 µg/ml) za 4 ure (A) in 24 ur (B). 30 µM B(a)P smo uporabili kot pozitivno kontrolo (BaP). Rezultati so podani kot povprečje % DNA v repu iz treh neodvisnih poskusov in so prikazani v obliki okvirjev z ročajji, ki zelo nazorno prikažejo obliko porazdelitve spremenljivke. Prečka v okvirju prikazuje mediano, srednje vrednosti so prikazane kot plus (+), spodnji del okvirja določa prvi kvartil, zgornji del pa tretji kvartil. Spodnji ročaj in zgornji ročaj določata 95 % mejo zaupanja. Razlike med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnet, pri čemer (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ in (***) $p < 0.001$ prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo.

Etopozid je povzročil od doze odvisno povečanje poškodb DNA, ki je bilo statistično značilno pri koncentracijah 1 in 10 µg/ml. Povečanje števila prelomov je bilo predvsem izrazito pri koncentraciji 10 µg/ml, ki je bilo celo večje od prelomov, povzročenih s pozitivno kontrolo (Slika 8A).

Po 24 urnem tretmaju celic z etopozidom smo prav tako opazili statistično značilno razliko glede na kontrolo pri koncentracijah 1 in 10 µg/ml (Slika 8B).

4.2.2 Cisplatin

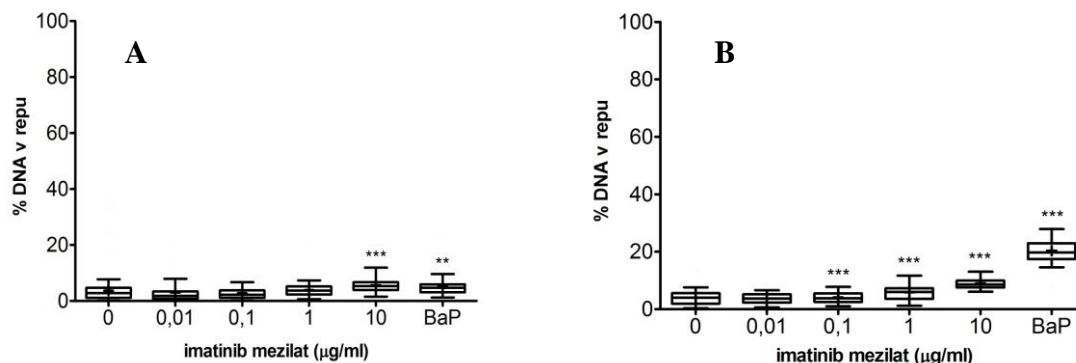


Slika 9A in 9B. Vpliv cisplatina na nastanek prelomov DNA celic HepG2 Celice HepG2 smo izpostavili različnim koncentracijam cisplatina (0,01; 0,1, 1 in 10 µg/ml) za 4 ure (A) in 24 ur (B). 30 µM B(a)P smo uporabili kot pozitivno kontrolo (BaP). Rezultati so podani kot povprečje % DNA v repu iz treh neodvisnih poskusov in so prikazani v obliki okvirjev z ročaji, ki zelo nazorno prikazujejo obliko porazdelitve spremenljivke. Prečka v okvirju prikazuje mediano, srednje vrednosti so prikazane kot plus (+), spodnji del okvirja določa prvi kvartil, zgornji del pa tretji kvartil. Spodnji ročaj in zgornji ročaj določata 95 % mejo zaupanja. Razlike med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnett, pri čemer (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ in (***) $p < 0.001$ prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo.

Rezultati so pokazali, da po 4 urah izpostavljenosti cisplatin ni povzročil statistično značilnega povečanja prelomov DNA pri nobeni izmed uporabljenih koncentracij (Slika 9A).

Po 24 urnem tretmaju celic s cisplatinom smo opazili, da je do statistično značilnega povečanja odstotka DNA v repu v primerjavi s kontrolno skupino prišlo po izpostavitvi koncentracijam 0,1; 1 in 10 µg/ml (Slika 9B). Opazili smo tudi, da so bile poškodbe DNA pri koncentraciji 10 µg/ml manjše kot pri nižjih koncentracijah. Razlog za to je verjetno v načinu delovanja cisplatina – le-ta povzroča prečno povezovanje verig DNA, kar lahko prepreči elektroforetsko mobilnost DNA.

4.2.3 Imatinib mezilat



Slika 10A in 10B. Vpliv imatinib mezilata na nastanek prelomov DNA celic HepG2. Celice HepG2 smo izpostavili različnim koncentracijam imatinib mezilata (0,01; 0,1, 1 in 10 µg/ml) za 4 ure (A) in 24 ur (B). 30 µM B(a)P smo uporabili kot pozitivno kontrolo (BaP). Rezultati so podani kot povprečje % DNA v repu iz treh neodvisnih poskusov in so prikazani v obliki okvirjev z ročaji, ki zelo nazorno prikažejo obliko porazdelitve spremenljivke. Prečka v okvirju prikazuje mediano, srednje vrednosti so prikazane kot plus (+), spodnji del okvirja določa prvi kvartil, zgornji del pa tretji kvartil. Spodnji ročaj in zgornji ročaj določata 95 % mejo zaupanja. Razlike med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnet, pri čemer (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ in (***) $p < 0.001$ prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo.

Pri celicah, izpostavljenih imatinib mezilatu, smo po 4 urni izpostavitvi opazili statistično značilno povečanje števila prelomov DNA pri koncentraciji 10 µg/ml (Slika 10A).

Po 24 urah smo opazili, da je imatinib mezilat povzročil statistično značilno povečanje poškodb DNA pri koncentracijah 0,1; 1 in 10 µg/ml (Slika 10B).

5 RAZPRAVA

Rak postaja najbolj pogosta bolezen, za katero obolevamo ljudje. Še vedno odkrivamo nove dejavnike, ki so odgovorni za nastanek rakavih celic. Med njimi ima velik vpliv okolje, v katerem zaradi vedno večjega onesnaževanja najdemo kemikalije, ki so genotoksične. Tako se v zadnjih letih povečuje tudi količina citostatikov, ki se uporabljajo za zdravljenje različnih vrst raka. Zaradi tega smo v naši nalogi ugotavljali ali izbrani citostatiki (etopozid, cisplatin in imatinib mezilat) delujejo citotoksično in genotoksično na človeške jetrne celice. Citostatike smo izbrali glede na pogostost uporabe, glede na predvidene okoljske koncentracije in na podlagi različnih mehanizmov delovanja. Kot modelni celični sistem smo izbrali celice HepG2, ki se uporabljajo v mnogih genotoksikoloških študijah zaradi ohranjenega delovanja encimov, ki sodelujejo v fazi I in fazi II metabolizma. V teh fazah, predvsem fazi I, so genotoksini metabolizirani in so zato te celice odlični model za opazovanje genotoksičnih učinkov citostatikov.

Za ugotavljanje citotoksičnosti izbranih citostatikov na celicah HepG2 smo uporabili test MTT. Rezultati so bili med citostatiki zelo različni. Pri etopozidu in cisplatinu smo opazili, da je bilo njuno toksično delovanje za celice HepG2 odvisno od odmerka in časa izpostavitve. Statistično značilnega znižanja preživetja nismo opazili po 4 urah, ampak šele po 24 urah izpostavitve, kar je pri daljših časih izpostavitve (48 in 72 ur) postalo še bolj izrazito - po 72 urah so bile vse uporabljene koncentracije etopozida in cisplatina toksične za celice, pri čemer se je cisplatin pokazal kot bolj toksičen v primerjavi z etopozidom. Po drugi strani pa smo pri celicah izpostavljenih imatinibu opazili specifičen prag delovanja pri koncentraciji 18,75 µg/ml pri vseh časih izpostavljenosti. Z večanjem koncentracije (>18,75 µg/ml) so bili toksični učinki še bolj izraziti in podobno kot pri etopozidu in cisplatinu, odvisni od časa izpostavitve. Pri celicah, izpostavljenih imatinib mezilatu smo v nekaterih primerih opazili tudi statistično značilno povečanje preživetja celic. Glede na to, da s testom MTT merimo metabolno aktivnost mitohondrijskih encimov, je opaženo povečanje najverjetneje le navidezno. Po izpostavitvi imatinib mezilatu celice aktivirajo obrambne mehanizme in zato opaženi učinek verjetno odraža pospešen metabolizem kot posledico stresa, povzročenega z izpostavitvijo imatinib mezilatu.

Podatki iz literature o vplivu citostatikov na preživetje celic *in vitro* se razlikujejo v odvisnosti od testnega sistema in pogojev testiranja. Lee in sod. (2002) so ugotovili, da po 48 urni izpostavitvi človeških hematopoetičnih celic Jurkat in človeških histiocitičnih limfomičnih celic U937 etopozidu se pri koncentraciji 1 µg/ml zniža preživetje na 20,0 %, medtem ko je v naši študiji podobna koncentracija (1,17 µg/ml) po 48 urah povzročila znižanje preživetja na ~80 % pri celicah HepG2. Po drugi strani pa so Alacam in sod. (2012) pri celicah HepG2 po 24 urah pokazali padec preživetja na ~85 % pri koncentraciji

etopozida 0,5 µg/ml, kar se ujema z našimi rezultati (85 % preživetje pri koncentraciji 0,59 µg/ml).

Citotoksično delovanje cisplatina na celice HepG2 so dokazali tudi Serpeloni in sod. (2012). Po 24 urah je bilo pri koncentraciji 1,5 µg/ml preživetje znižano na 71,2 %, medtem ko je bilo v naši nalogi pri podobni koncentraciji (1,17 µg/ml) preživetje znižano na 95,45% in pri koncentraciji 2,34 µg/ml na 87,29%. Rezultat odstotka preživetja je pri nas nekoliko višji. Germain in sod. (2010) pa so testirali toksičnost cisplatina po 48 urah s testom MTT na človeških celičnih linijah A549 (celice raka pljuč), PC3 (celice raka prostate), A2780-cp (celice raka jajčnikov), MCF-7 (adenokarcinom dojk) in SKOV-3 (celice raka jajčnikov) in ugotovili, da sta liniji MCF-7 in SKOV-3 bolj odporni na cisplatin (Germain in sod., 2010). Uporabljali so koncentracije 2, 4, 6, 8 in 10 µg/ml, pri čemer je celično preživetje pri linijah MCF-7 in SKOV-3 pri vseh koncentracijah znašala >60%, pri ostalih celičnih linijah pa je bila precej nižja (<10 %). V naši nalogi smo dobili primerljive rezultate, saj je cisplatin pri celicah HepG2 po 48 urah pri koncentracijah >4,69 µg/ml znižal preživetje na <30 %.

Podatki iz literature o s citotoksičnosti imatinib mezilata v literaturi med seboj različni. Jin in sod. (2006) so po 24-urni izpostavitvi stromalnih celic gastrointestinalnega tumorja GIST-T1 imatinib mezilatu opazili zmanjšano preživetje celic pri koncentracijah 0,1 (~38 %), 1 (36 %) in 2 µg/ml (36 %). V naši študiji pri teh pogojih imatinib mezilat ni deloval tako toksično, kar so pokazali tudi de Groot in sod. (2006) na celicah HepG2 in Hotfilder in sod. (2002) na osmih tumorskih celičnih linijah Ewing (RD-ES, RM-82, WE-68, VH-64, STA-ET-1, STA-ET-2.1, TC-71 in CADO-ES1). V slednji raziskavi je imatinib mezilat deloval citotoksično pri koncentracijah > 30 µg/ml, kar je tudi skladno z našimi rezultati.

Genotoksično delovanje izbranih citostatikov smo ugotavljali s testom komet. Genotoksičnost smo preverjali pri koncentracijah, ki za celice niso citotoksične, saj citotoksičnost lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov zaradi fragmentacije DNA kot posledica nekroze ali apoptoze (Henderson in sod., 1998). V naši nalogi se je etopozid pokazal kot najbolj genotoksičen med izbranimi citostatiki. Etopozid vpliva na aktivnost topoizomeraznega encima I α . Ta sodeluje pri vzdrževanju stabilnosti dvojne vijačnice med podvojevanjem molekule DNA (konformacijske spremembe, spremembe v replikaciji, transkripciji in segregaciji kromosomov) (Markovits in sod., 1987; McPherson in Goldenberg, 1998; Boos in Stopper, 2000). Posledično tako najbolj deluje na celice, ki se delijo (deleče celice imajo večjo koncentracijo topoizomeraznega encima (Rojas in sod., 2009)) in tako povzroči aktivacijo mehanizmov za apoptozo. V literaturi nismo našli veliko podatkov o preizkušanju genotoksičnosti citostatikov so pa Kang in sod. (2011) opazili, da koncentracija etopozida 5,886 µg/ml inducira nastanek prelomov DNA pri celicah HCT116 (rakave celice črevesja) po 6 urah, pri čemer je bilo v repu med 25 in 35 % DNA. V naši študiji je etopozid že po 4 urah povzročil od doze odvisno povečanje poškodb DNA,

ki je pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$ znašalo 23 %, kar se ujema z rezultati študije Kanga in sod. (2011).

Po izpostavitvi celic cisplatinu smo v naši študiji opazili rahlo povečanje prelomov DNA (~10 % DNA v repu) pri koncentracijah 0,1; 1 in 10 $\mu\text{g/ml}$ le po 24 urah. Genotoksičnost cisplatina so ugotavljali tudi Ferk in sod. (2009) na primarnih podganjih hepatocitah. Dokazali so, da do poškodb prihaja pri koncentracijah $\geq 5,0 \text{ mg/l}$ ($\mu\text{g/ml}$) po 24 urah. Jirsova in Mandys (1994) ter Ioannidou (1989) so tudi s testom mikrojeder potrdili, da pri dveh linijah človeških limfocitov in liniji človeških kožnih fibroblastov pride do poškodb DNA po izpostavljenosti koncentracijam cisplatina $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$, kar še dodatno potrjuje naše rezultate. Serpeloni in sod. (2012) so v svoji študiji s testom komet pokazali, da po 3-urni izpostavljenosti celic HepG2 cisplatinu pri koncentraciji 3,05 $\mu\text{g/ml}$ pride celo do zmanjšanja prelomov DNA v primerjavo s kontrolo. Podobne učinke so pokazali tudi Pang in sod. (2007) in Mendonça in sod. (2010). V naši študiji pri podobnih pogojih nismo opazili sprememb v poškodbah DNA. Čeprav je znano, da cisplatin povzroča poškodbe DNA, so bili negativni rezultati, dobljeni s testom komet, pričakovani. Razlog za to je v mehanizmu delovanja cisplatina. Cisplatin namreč povzroča kovalentno povezavo med dvema komplementarnima verigama DNA. Zaradi tega ni mogoča ločitev verig DNA in posledično onemogočeno podvojevanje DNA in transkripcije. Zaradi povezav med verigama DNA, je zmožnost DNA, da pri elektroforezi migrira v agarozni zmanjšana, zaradi česar s testom komet opazimo navidezno zmanjšanje poškodb DNA (Tice in Strauss, 1995; Blommaert in sod. 1995; Rajski in Williams, 1998).

Genotoksično delovanje imatinib mezilata so pokazali Czechowska in sod. (2005), ki so s testom komet ugotovili, da so koncentracije imatinib mezilata med 0,118 $\mu\text{g/ml}$ in 1,179 $\mu\text{g/ml}$ po 15 urah tretiranja povzročile poškodbe DNA v celicah K562 (levkemične celice, ki izražajo BCR/ABL onkogene), pri čemer so bili rezultati sledeči: pri koncentraciji 0,118 $\mu\text{g/ml}$ je bilo v repu $21,45 \pm 3,77 \%$, pri 0,295 $\mu\text{g/ml}$ je v repu $23,99 \pm 3,35\%$, pri 0,589 $\mu\text{g/ml}$ $31,02 \pm 3,75\%$ in pri 1,179 $\mu\text{g/ml}$ je $33,76 \pm 3,78 \%$ DNA pri $P < 0.001$. V naši študiji smo pokazali, da je pri celicah HepG2 imatinib mezilat po 24 urah povzročil povečanje % DNA v repu na ~9 % pri koncentracijah 0,1; 1 in 10 $\mu\text{g/ml}$, kar se ne ujema z rezultati Czechowske, so pa tako nizke stopnje pričakovane, saj naj bi imatinib mezilat specifično deloval le na celice, v katerih so izraženi onkogeni BCR/ABL. Ker celice HepG2 tega proteina nimajo, so zato bolj odporne na delovanje imatinib mezilata. Avtorji omenjene študije so predvidevali, da imatinib mezilat povzroča oksidacijo ter modifikacijo alkilnih baz in posledično nastanek ALS (Czechowska in sod., 2005).

Test komet, ki smo ga uporabili v naši nalogi, ima veliko prednosti, med katerimi je njegova izjemna občutljivost zagotovo med najbolj pomembnimi. Moramo se pa zavedati tudi njegove pomanjkljivosti testa komet. Z njim ne moremo natančno določiti narave poškodb, ki jih s testom zaznamo (Horvatova in sod., 1998). Prelomi DNA, ki jih zaznamo,

so pogosto prehodne poškodbe, ki se v odvisnosti od časa izpostavitve lahko popravijo (Žegura in sod., 2003). Zato je smiselna tudi nadaljna analiza genotoksičnosti z npr. testom mikrojedr (Knasmüller in sod., 1998). V naši nalogi smo celice izpostavili delovanju citostatikov za 4 in 24 ur. Krajši, 4-urni čas izpostavitve smo izbrali zato, da zaznamo morebitne prehodne poškodbe DNA, ki bi bile po 24 urah že popravljene. Po drugi strani pa je daljši, 24-urni čas izpostavitve, dovolj dolg, da lahko pride tudi do popravljanja nastalih poškodb. V tem času lahko nastanejo poškodbe genetskega materiala, ki se bodo ohranile in lahko privedejo do mutacije. V primeru, da takšna celica ne gre v programirano celično smrt, se poškodba deduje na hčerinski celici. Te poškodbe DNA, ki se tako prenašajo v naslednje generacije postanejo t.i. genetsko breme, zaradi česar se poveča število bolezni, tudi rakavih (Kamp, 2003). Prav zaradi tega je potrebno nenehno izboljševati metode za odkrivanje nastajanja napak na DNA, saj bomo le na takšen način ugotovili nove vzroke, ki vodijo v to bolezen.

Kljub izjemni uporabnosti *in vitro* testnih sistemov z rakavimi celicami imajo le-ti tudi svoje pomanjkljivosti. Rezultatov, ki jih dobimo v takšnih sistemih, ne moremo neposredno uporabiti pri ocenjevanju tveganja za razvoj rakavih in drugih bolezni pri ljudeh in jih zaradi tega ne moremo posplošiti na vse ljudi. Vendar pa nam rezultati pomagajo pri predvidevanju potencialnega učinka. Specifičnega učinka na ljudi pa z uporabo *in vitro* testnih sistemov ne moremo z gotovostjo dokazati. Kljub temu so *in vitro* testi, ki smo jih uporabili, in testni sistem z rakavimi celicami koristno orodje, s katerim pridobimo informacije o morebitni ogroženosti zdravja. Za boljše rezultate bi lahko uporabili več različnih testov, katerih občutljivost in specifičnost se dopolnjujeta, ter različne testne sisteme, s katerimi bi čim boljše predvideli učinek vzorcev na ljudi in druge organizme v vsakdanjem življenju izven kontroliranih laboratorijskih pogojev. Škodljive učinke citostatikov bi bilo tako smiselno preveriti tudi na netarčnih, vodnih organizmih, kot so npr. vodne bolhe, alge, ribe in bakterije, saj bi citostatiki pri le-teh lahko delovali drugače. Poleg tega je potrebno raziskave nadaljevati tudi *in vivo*. Na ta način bi pri testnih organizmih lahko opazovali v več generacijah kako citostatiki vplivajo na njih in na njihove zarodke ter tako sklepali o morebitnih teratogenih učinkih. Iz naših rezultatov tega ne moremo razbrati. Testa uporabljena v magistrski nalogi (test MTT in test komet) sta se izkazala kot dovolj občutljiva in specifična za tovrstno uporabo.

Vsa živa bitja za svoje normalno delovanje in življenje potrebujemo vodo, ki zavzema kar dve tretjini našega planeta. Kopičenje škodljivih snovi v vodi, med njimi tudi citostatikov, zato predstavlja velik problem. Trenutno ni natančnih podatkov o prisotnosti citostatikov v pitni vodi, vendar bi že minimalne količine lahko delovale škodljivo. Zato je potrebno razmisliti kako bi količino citostatikov, sproščenih v okolje, zmanjšali. Problematični niso le citostatiki, ki izhajajo iz bolnišnic, saj se le-ti zbirajo in jih je možno z različnimi kemijskimi metodami tudi razgraditi (npr. cisplatin in karboplatin popolnoma odstranimo z uporabo natrijevega dietilditiokarbamata (Benvenuto in sod., 1993)). Večjo težavo

predstavljajo citostatiki, uporabljeni v domači oskrbi, ki niso pod tako strogim nadzorom kot tisti, ki se uporabljajo v iz bolnišnicah. Problematični so tudi metaboliti citostatikov, ki so lahko bolj genotoksični od predhodnih oblik in se prav tako nahajajo v okolju. Zaskrbljujoče je tudi dejstvo, da je večina citostatikov v okolju slabo razgradljivih tako, da v večini primerov čistilne naprave zapustijo nespremenjeni (Nikolaou in sod., 2007), kar je značilno tudi za nekatere izmed citostatikov, testiranih v naši nalogi. Poleg tega ni podatkov o količini citostatikov v zemlji. Z ekološkega vidika so zaradi tega citostatiki še bolj problematični, njihova poraba pa se v splošnem povečuje. Glede na omenjena dejstva in glede na naše rezultate lahko pričakujemo, da bodo citostatiki, ki končajo v okolju, škodljivo vplivali na vse organizme, s katerimi pridejo v stik, kot posledico pa lahko pričakujemo povečano incidenco raka in reproduktivne okvare. Zato je potrebno usmeriti raziskave v razvoj učinkovitih načinov odstranjevanja citostatikov iz odpadnih voda, dobrodošla bo tudi večja previdnost pri sproščanju zdravil v okolje, saj posledic ne bomo nosili le mi, ampak tudi naslednje generacije.

6 SKLEPI

Z magistrsko nalogo smo prišli do naslednjih zaključkov:

- s testom MTT smo ugotovili, da izbrani citostatiki delujejo citotoksično na celice HepG2. Najbolj citotoksična sta etopozid in cisplatin;
- imatinib mezilat ima izrazit prag delovanja, ki ga lahko vidimo glede na koncentracijski in časovni odziv;
- s testom komet smo ugotovili, da izbrani citostatiki pri necitotoksičnih koncentracijah delujejo genotoksično. Med njimi je po obsegu najbolj toksičen etopozid, cisplatin in imatinib mezilat pa povzročata poškodbe pri nižji koncentraciji kot etopozid.

Na podlagi navedenih sklepov smo potrdili hipotezo, da izbrani citostatiki v sistemu s celicami HepG2 delujejo citotoksično in genotoksično.

7 POVZETEK

Rak je bolezen modernega človeka. Z daljšanjem življenjske dobe in zaradi večje onesnaženosti okolja skozi življenje nabirajo napake v DNA, ki jih popravljalni mehanizmi niso vedno sposobni popraviti. Ena sama mutacija ne povzroči nastanka rakave celice. Več mutacij v eni sami celici pa lahko vodi v nastanek raka. Zaradi vedno večjega pojava te bolezni se posledično v okolju večja vsebnost citostatikov, ki jih uporabljamo za zdravljenje te trdovratne bolezni. Ker citostatiki ne delujejo selektivno le na rakave celice, se pojavljajo vprašanja, ali lahko in v kolikšnem obsegu citostatiki delujejo tudi na netarčne organizme (zdrave posameznike in okoljske organizme).

V magistrski nalogi smo ugotavljali citotoksično in genotoksično delovanje 3 izbranih citostatikov na človeške rakave celice HepG2. Citotoksičnost smo ugotavljali s testom MTT, genotoksičnost pa s testom komet. Med izbranimi citostatiki sta na celice HepG2 etopozid in cisplatin delovala citotoksično v odvisnosti od časa in odmerka. Po 4-urni izpostavljenosti etopozid in cisplatin nista vplivala na preživetje celic, medtem ko sta po 24 urah zmanjšala celično preživetje v odvisnosti od odmerka, kar je po 48 in 72 urah bilo še bolj izrazito, pri čemer je cisplatin bil bolj toksičen od etopozida. Pri celicah izpostavljenih imatinibu smo opazili specifičen prag delovanja pri koncentraciji $\sim 18,75 \mu\text{g/ml}$ pri vseh časih izpostavljenosti. Toksični učinki pri koncentracijah višjih od $18,75 \mu\text{g/ml}$ so bili še bolj izraziti in odvisni od časa izpostavitve.

S testom komet smo pokazali, da je etopozid povzročil poškodbe DNA po 4 in 24-urni izpostavitvi pri dveh najvišjih koncentracijah (1 in $10 \mu\text{g/ml}$). Cisplatin je povzročil poškodbe DNA le po 24 urah pri koncentraciji večjih od $0,1 \mu\text{g/ml}$. Poškodbe DNA, odvisne od časa in odmerka, je povzročil tudi imatinib mezilat; po 4 urah le pri najvišji koncentraciji in po 24 urah pri koncentracijah 1, 5 in $10 \mu\text{g/ml}$.

Za nadaljnje raziskovanje citotoksičnosti in genotoksičnosti citostatikov so potrebne še druge analize in uporaba različnih testov genotoksičnosti *in vitro*, na drugih celičnih linijah, kot tudi testi *in vivo*. Smotrno bi bilo opazovati tudi spremembe genetskega materiala ne samo pri eni generaciji poskusnih živali, ampak pri več generacijah, saj se vedno bolj zavedamo problema genotoksičnosti in s tem povezanega prenosa mutacij v naslednje generacije. Metodi, ki smo ju uporabili, sta cenovno in časovno zelo učinkoviti, rezultati pa so pokazali, da sta tudi dovolj občutljivi. Dokazali smo, da so uporabljeni citostatiki v preizkušeni koncentracijah citotoksični za človeške jetrne celice in lahko povzročijo genotoksične učinke v koncentracijah, ki so blizu predvidenih okoljskih koncentracij ter koncentracij citostatikov, najdenih v bolnišničnih odpadnih voda. Zato je

potreben nadaljnji razvoj učinkovitih načinov odstranjevanja citostatikov iz odpadnih voda kot tudi večja previdnost pri sproščanju zdravil v okolje.

8 VIRI

- Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B.B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282: 615-616
- Aguilera D. G., Das C., Wolff J., Zage P., Gopalakrishnan V. 2007. Valproic acid enhances etoposide induced cytotoxicity in neuroblastoma cells. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). 25, 18S (June 20 Supplement), 2007: 20010
- Alacam H., Bedir A., Kilinc V., Salis O., Gulden S. 2012. The Role of Acetylsalicylic Acid as an Assistant Drug in the Management of Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Hematology and Oncology*, 22, 3
- Barlov J.W. in Malkin D. 2001. *Human Cancer Genetics. V: Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. Wai Nang Choi (ur.), New York, Marcel Dekker, 2001: 1-28
- Benvenuto J. A., Connor T. H., Monteith D. K., Laidlaw J. L., Adams S. C. in sod. 1993. Degradation and inactivation of antitumor drugs. *Journal Pharmaceutical Sciences*. 82: 988-991
- Besse J. P., Latour J.F., Garric J. 2012. Anticancer drugs in surface waters. What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International*, 39:71-86
- Blommaert F.A., van Dijk-Knijnenburg H.C., Dijt F.J., den Engelse L., Baan R.A., Berends F., Fichtinger-Schepman A.M. 1995. Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences *in vitro* and in cells. *Biochemistry* 34, 8474–8480
- Boveri T. 1929. *The Origin of Malignant Tumors*. Baltimore: Williams & Wilkins
- Boos G. in Stopper H. 2000. Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicology Letters*, 116: 7–16
- Bromber K.D., Burgin A.B., Osheroff N. 2002. A two drug model for etoposide action against human topoisomerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 277:31201-31206
- Bueno C., Catalina P., Melen G.J., Montes R., Sanchez L., Ligeró G., Garcia-Perez J.L., Menendez P. 2009. Etoposide induces MLL rearrangements and other chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Carcinogenesis*, 30, 1628–1637

Burton E.A., Plattner R., Pendergast A.M. 2003. Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*. *The EMBO journal*, 22:5471–5479

Choudhury R.C., Palo A.K. in Sahu P. 2004. Cytogenetic risk assessment of etoposide from mouse bone marrow. *Journal of Applied Toxicology*, 24: 115–122

Cierniak A., Papiez M. in Kapiszewska M. 2004. Modulatory effect of quercetin on DNA damage, induced by etoposide in bone marrow cells and on changes in the activity of antioxidant enzymes in rats. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, 49: 167–169

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

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

Czechowska A., Poplawski T., Drzewoski J, Blasiak J. 2005. Imatinib (STI571) induces DNA damage in BCR/ABL-expressing leukemic cells but not in normal lymphocytes. *Chemico - Biological Interactions*, 15; 152 (2-3): 139-50

Cytostatics: Substance identification

http://www.crios.be/cytostatics/identification_and_characteristics.htm (februar, 2013)

Druker B.J, Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M., Fanning S., Zimmermann J., Lydon N.B.1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine* 2: 561–566

Elespuru R.K., Agarwal R., Atrakchi A.H., Bigger C.A.H., Heflich R.H., Jagannath D.R. in sod. 2009. Current and Future Application of Genetic Toxicity Assays: The Role and Value of In Vitro Mammalian Assays. *The Journal of toxicological sciences*, 109: 172–9

Fearson, E.R. 1998. Tumor Suppressor Genes. In: B. Vogelstein, KW Kinzler eds. *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill, 229–236

Fent K., Weston A.A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 2: 122–159

Ferk F., Misik M., Grummt T., Majer B., Fuerhacker M. in sod. 2009. Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutation Research*, 672: 69-75

- Folkman J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. *Nature Reviews*, 6: 273-286
- Germain C., Niknejad N., Ma L., Garbuio K., Hai T., Dimitroulakos J. 2010. Cisplatin Induces Cytotoxicity through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Activating Transcription Factor 3. *Neoplasia*, 12, 7: 527–538 PMID: PMC2907579
- de Groot J. W. B, Plaza-Menacho I, Schepers H., Drenth-Diephuis L. J., Osinga J., Plukker J. Th. M., Links Th. P., Eggen B. J. L., Hofstra R.M.W. 2006. Cellular effects of Imatinib on Medullary Thyroid cancer cells harboring Multiple Endocrine Neoplasia type 2A and 2B associated RET-mutations. *Surgery*, (*in press*). 97-118
- Hainsworth J. D., Greco F. A. 1995. Etoposide: Twenty years later. *Annals of Oncology*, 6: 325-341
- Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten-Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment — a review *Chemosphere*, 36, 2: 357–393
- Hande K.R. 1998. Clinical Oncology Update, Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*, 34, 10: 1514-1521
- Heinicke T., Wardelmann E., Sauerbruch T., Tschampa H.J., Glasmacher A., Palmedo H. 2005. Very early detection of response to imatinib mesylate therapy of gastrointestinal stromal tumours using 18fluoro-deoxyglucose-positron emission tomography. *Anticancer Research*, 25: 4591-4594
- Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. 1998. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13: 89-94.
- Hignite C. in Aznaroff D.L. 1977. Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutirate and salicylic acid in sewage effluent. *Life Sciences*, 20: 337–341
- Horvátová E., Slameňová D., Hlinčíková L., Kumar Mandal T., Gábelová A., Collins A. R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with comet assay. *Mutation Research*, 409: 163-171

- Hotfilder M., Lanvers C., Jürgens H., Boos J., Vormoor J. 2002. c-KIT-expressing Ewing tumour cells are insensitive to imatinib mesylate (STI571). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 50: 167–169
DOI 10.1007/s00280-002-0477-8
- Ioannidou E., Lialiaris T., Mourelatos D., Dozi-Vassiliades J. 1989. Synergistic induction of cytogenetic damage by alkylating antineoplastics and 5-azacytidine in human lymphocytes, *Environmental and molecular Mutagenesis.*, 14: 6–12
- TOXNET: Hazardous Substances Data Bank (HSDB), (Online) U.S. National Library of Medicine
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> (avgust, 2013)
- Jamieson E. R. in Lippard, S. J. 1999. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chemical Reviews*, 99: 2467–2498
- Jirsova K. in Mandys V. 1994. Induction of micronuclei and granular chromatin condensation in human skin fibroblasts influenced by cisplatin (cis-DDP) *in vitro*. *Mutation Research*, 310: 37–44
- Johnson A.C., Jürgens M.D., Williams R.J., Kümmerer K., Kortenkamp A., Sumpter J.P. 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, 348, 1–2,: 167–175
- Kamb A. 2003. Consequences of nonadaptive alterations in cancer. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 6: 2201-2205
- Kang K., Lee S.B., Yoo J.H., Nho C.W. 2010. Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells. *Biotechnology Letters*, 32, 1045–1052
- Kang K., Oh S. H, Yun J.H., Jho E.H., Kang J.H., Batsuren D., Tunsag J., Park K.H., Kim M., Nho C.W. 2011. A Novel Topoisomerase Inhibitor, Daurinol, Suppresses Growth of HCT116 Cells with Low Hematological Toxicity Compared to Etoposide. *Neoplasia*, 13, 11: 1043–1057
- Kartalou M. in Essigmann, J. M. 2001. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research*, 478: 1–21

- Kiffmeyer T., Götze H.-J., Jursch M., Lüders U. 1998. Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 2: 185–191
- Knasmüller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A.T. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, Jun 18;402, 1-2: 185-202
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B. in sod. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36: 1202–1211
- Kosjek T., Heath E. 2011. Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment). *TrAC. Trends in analytical chemistry*. - ISSN 0165-9936. - 30, issue 7: 1065-1087. doi: 10.1016/j.trac.2011.04.007
- Kümmerer K. in Al-Ahmad A. 1997. Biodegradability of the anti-tumour agents 5-fluorouracil, cytarabine and gemcitabine: impact of the chemical structure and synergistic toxicity with hospital effluent. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 25: 166–172
- Kümmerer K., Al-Ahmad A., Bertram B., Wießler M. 2000. Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: influence of glucosidation and of stereochemistry. *Chemosphere*, 40, 7:767–773
- Kümmerer K. 2001. Pharmaceuticals in the environment. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer-Verlag, Berlin, 1–8
- Lee S. H., Chang K. T., Kwon O. Y., Kwon T. K. 2002. Etoposide activates caspase-3 via a caspase-1 independent mechanism in cancer cells. *Experimental Oncology*, 24: 105-107
- Markovits J., Pommier Y., Kerrigan D., Covey J.M., Tilchen E.J., Kohn K.W. 1987. Topoisomerase II-mediated DNA breaks and cytotoxicity in relation to cell proliferation and in the cell cycle in NIH-3T3 fibroblasts and L1210 leukemia cells. *Cancer Research*, 47: 2050-2055
- McDevitt J, Lees P, McDiarmid M. 1993. Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic drugs. *Journal of Occupational Medicine*, 36: 57–60

- McPherson J.P., Goldenberg G.J. 1998. Induction of apoptosis by deregulated expression of DNA topoisomerase III β . *Cancer Research*, 58: 4519-4524
- Mendonça L.M., dos Santos G.C., dos Santos R.A., Takahashi C.S., Bianchi Mde L., Antunes L.M. 2010. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. *Human & experimental toxicology*, 29, 635–643
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., & Kassie, F. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198, 1: 329-340
- Montecucco A. in Biamonti G. 2007. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Letters*, 252: 9–18
- Nam C., Doi K. in Nakayama H. 2010. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. *Histology and Histopathology*, 25: 485–493
- Natarajan A.T. in Darroudi F. 1991. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis*, 6: 399-403
- Nikolaou A., Meric S., Fatta D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1225–1234
- Ocvirk J. 2009. Nezaželjeni učinki zdravil za sistemsko zdravljenje raka na koži. *Onkologija / izobraževalni dnevi OI. Leto XIII / št. 1, str.37*
- Östling O. in Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 123: 291-298
- Oxford Dictionaries
<http://oxforddictionaries.com/definition/english/pharmaceutical> (marec, 2013)
- Pabla N., Huang S., Mi Q. S., Daniel R., Dong Z. 2008. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 6572-6583
- Pang S.K., Yu C.W., Au-Yeung S.C., Ho Y.P. 2007. DNA damage induced by novel

demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. *Biochemical and biophysical research communications*, 363, 235–240

Pecorino L. 2008. *Molecular biology of Cancer. Mechanisms, targets, and therapeutics*. New York, Oxford University Press

Ranza E., Bertolotti A., Facchetti A., Mariotti L., Pasi F., Ottolenghi A., Nano R. 2009. Influence of Imatinib Mesylate on Radiosensitivity of Astrocytoma Cells. *Anticancer Research*, 29: 4575-4578

Rajski S.R. in Williams, R.M. 1998. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chemical Reviews* 98, 2723–2796

Rello-Varona S., Gamez A., Moreno V., Stockert J.C., Cristobal J., Pacheco M., Canete M., Juarranz A., Villanueva A. 2006. Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 2183–2195

Rojas E., Mussali P., Tovar E., Valverde M. 2009. DNA-AP sites generation by Etoposide in whole blood cells. *BMC Cancer*, 9:398 doi:10.1186/1471-2407-9-398

Rowney N.C., Johnson A.C., Williams R.J. 2009. Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the Thames catchment in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 2733–2743

Schonn I., Hennesen J., Dartsch D.C. 2010. Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis*, 15: 162–172

Serpeloni J.M., Barcelos G.R., Friedmann Angeli J.P., Mercadante A.Z., Lourdes Pires Bianchi M., Antunes L.M. 2012. Dietary carotenoid lutein protects against DNA damage and alterations of the redox status induced by cisplatin in human derived HepG2 cells. *Toxicology In Vitro*. 26, 2: 288-94
doi: 10.1016/j.tiv.2011.11.011.

Serša G. 2009. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. *Farmakološki vestnik*; 60 (2): 43-47

Sessink P, Boer K, Scheefhals A, Anzion R, Bos R. 1992. Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 64: 105–12

- 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
- Sorsa M, Anderson D. 1996. Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutation Research*, 355: 253–61
- Srinivasan D. in Plattner R. 2006. Activation of abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells. *Cancer Research*, 66: 5648–5655
- Tannock I. F. in Hill R. P. 2007. *The basic science of oncology*. New York, McGraw Hill, 3rd edition
- Ternes T. A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32: 3245–3260
- The Cancer Chronicles: Notes for a forthcoming book by George Johnson
<http://santafereview.com/chronicle/2011/01/27/what-is-in-a-name/> (maj, 2013)
- Tice R .R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221
- Tice R. R., Strauss G. H. 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13, 1, 207–214
- Uhl M., Helma C. in Knasmüller, S. 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 468, 2: 213-225
- van Maanen J.M.S., Retel J., de Vries J., Pinedo H.M. 1998. Mechanisms of action of antitumor drug etoposide: a review. *Journal of the National Cancer Institute*, 80: 1526-1533
- Wang D. in Lippard S. J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Discovery*, 4: 307-320 doi:10.1038/nrd1691

- Wozniak K. in Blasiak J. 2002. Recognition and repair of DNA–cisplatin adducts. *Acta biochimica Polonica*, 49: 583–596
- Zdraveski Z. Z., Mello J. A., Farinelli C. K., Essigmann J. M., Marinus M. G. 2002. MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 1255–1260
- Zhu H., Miao Z.H., Huang M., Feng J.M., Zhang Z.X., Lu J.J., Cai Y.J., Tong L.J., Xu Y.F., Qian X.H. in sod. 2009. Naphthalimides induce G(2) arrest through the ATM-activated Chk2-executed pathway in HCT116 cells. *Neoplasia*, 11: 1226–1234
- Zounkova R., Odraska P., Dolezalova L., Hilscherova K., Marsalek B. in sod. 2007. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 2208-2214
- Žegura B., Lah T., Filipic M. 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology*, 200, 1: 59-68
- Žegura B., Sedmak B., Filipič M. 2003. Mycrocystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, 41: 41-48

ZAHVALA

Najbolj bi se rada zahvalila dr. Jani Nunić, ki me ves čas spodbujala ter s prijaznimi besedami in pogledi potrpežljivo spremljala moje delo, tako v laboratoriju kot pri pisanju same magistrske naloge. Hvala prof.dr. Metki Filipič, ki mi je omogočila, da sem delala magistrsko nalogo na njihovem oddelku. Poleg tega bi se še zahvalila vsem sodelavcem, ki ste zapolnili in nasmejali moj vsakdanjik na inštitutu.

Zahvalila bi se še prof.dr. Gregorju Serši za prevzem mentorstva.

Zahvale gredo tudi moji družini za finančno podporo skozi vsa študijska leta, brez vas mi tega ne bi uspelo, in Robertu za spodbude, potrpežljivost in podporo.