

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

David DOBNIK

**ANTIOKSIDATIVNO IN ANTIGENOTOKSIČNO DELOVANJE
IZBRANIH SNOVI NARAVNEGA IZVORA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE ANTIOXIDATIVE AND ANTIGENOTOXIC ACTIVITY OF
SELECTED SUBSTANCES OF NATURAL ORIGIN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v laboratorijih Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Damjana Drobne
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Datum zagovora: 17.9.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

David Dobnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.2:633.88:582.949 (043.2) = 863
KG rožmarinska kislina/karnozol/karnozajska kislina/antimutagenost/
antioksidativnost/antigenotoksičnost/test MTT/Amesov test/test komet/test DPPH
AV DOBNIK, David
SA FILIPIČ, Metka (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2007
IN ANTIOKSIDATIVNO IN ANTIGENOTOKSIČNO DELOVANJE IZBRANIH SNOVI
NARAVNEGA IZVORA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 67 str., 1 pregl., 20 sl., 62 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Številne snovi naravnega izvora delujejo antioksidativno ter zavirajo mutagenezo in karcinogenezo tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* pogojih. Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je olesenela zimzelena večletna rastlina iz družine usnatic (*Lamiaceae*) in vsebuje flavonoide, fenole, terpenoide in hlapna olja. Pri teh snoveh so že ugotovili antioksidativen, antibakterijski, antimutagen, protivirusen in protivneten učinek. V diplomski nalogi smo se osredotočili na dva ekstrakta iz rožmarina, kjer je prvi (RA) vseboval rožmarinsko kislino, drugi (CONH) pa karnozol in karnozajsko kislino. Zanimalo nas je antimutageno, antioksidativno in antigenotoksično delovanje izbranih izvlečkov. Z Amesovim testom smo preverili antimutageno delovanje na bakteriji *Salmonella typhimurium*, sev TA98. Izvleček CONH deluje antimutageno, saj je koncentracijsko odvisno znižal število z mutagenom induciranih revertant, medtem ko je RA pokazal zelo šibko antimutageno delovanje. S testom MTT smo določili koncentracijo izvlečkov, ki še ni vplivala na preživelost celic humanega hepatoma (HepG2 celic) in je pri RA znašala 100 µg/mm, pri CONH pa 5 µg/ml. Antioksidativno in antigenotoksično delovanje smo preverili na HepG2 celicah z alkalnim testom komet, kjer smo poškodbe DNK povzročili z oksidativnim agensom *tert*-butil hidroperoksidom (t-BHP) in mutagenoma 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridinom (PhIP) ter benzo[a]pirenom (B[a]P). Izvlečka sta delovala antigenotoksično v primeru, ko so bile celice z njima predtretirane. Antioksidativno delovanje v brezceličnem mediju smo preverili s testom sposobnosti lovljenja prostih radikalov (test DPPH), kjer sta izvlečka delovala podobno kot askorbinska kislina, katera je znan antioksidant. Rezultati so pokazali, da izvlečka RA in CONH delujeta antimutageno, antioksidativno in antigenotoksično.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.2:633.88:582.949 (043.2) = 863
CX rosmarinic acid/carnosol/carnosoic acid/antimutagenicity/antioxidativity/
antigenotoxicity/test MTT/Ames test/comet assay/test DPPH
AU DOBNIK, David
AA FILIPIČ, Metka (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2007
TI THE ANTIOXIDATIVE AND ANTIGENOTOXIC ACTIVITY OF SELECTED SUBSTANCES
OF NATURAL ORIGIN
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 67 p., 1 tab., 20 fig., 62 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Lots of substances of natural origin show antioxidant activity, obstruct mutagenesis and carcinogenesis *in vitro* or *in vivo*. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a woody evergreen plant from *Lamiaceae* family, and contains flavonoids, phenols, terpenoids and volatile oils. These substances have already been reported to be antioxidant, antibacterial, antimutagenic, antiviral and antiinflammatory. In the present study, we investigated antimutagenic, antioxidant and antigenotoxic activity of two extracts from rosemary, RA (rosmarinic acid) and CONH (carnosol and carnosoic acid). With the use of Ames test, we checked the antimutagenic activity on *Salmonella typhimurium*, strain TA98. Extract CONH showed antimutagenic activity, with concentration-dependent decrease of mutagene-induced revertants, while extract RA showed weak antimutagenic activity. Using the MTT assay, we defined the concentration of extracts that still did not affect the viability of human hepatoma cells (HepG2 cells). These concentrations were 100 µg/ml for RA and 5 µg/ml for CONH. Antigenotoxic activity was investigated on HepG2 cells using the comet assay, where we caused DNA damage with oxidative agent *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) and with two mutagens; 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and benzo[a]pyrene (B[a]P). Extracts showed antigenotoxic activity when the cells were pretreated with these mutagens. Antioxidant activity in a medium without cells was investigated using the DPPH test of free radical scavenging activity, where the extracts showed activity similar to ascorbic acid. The results show that RA and CONH extracts have antimutagenic, antioxidant and antigenotoxic activity.

KAZALO VSEBINE:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE:.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 Izvlečki rožmarina	3
2.1.1 Rožmarinska kislina	3
2.1.2 Karnozol in karnozojska kislina	5
2.2 ROS – reaktivne kisikove zvrsti.....	5
2.3 Mutageni.....	6
2.4 Delovanje izvlečkov rožmarina.....	7
2.4.1 Delovanje rožmarinske kisline	8
2.4.2 Delovanje karnozola in karnozojske kisline.....	9
2.5 Namen naloge in delovne hipoteze	11
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 Izvlečka iz rožmarina (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	12
3.2 Kemikalije	12
3.3 Sevi bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>	13
3.3.1 Gojenje kultur bakterij <i>Salmonella typhimurium</i>	13
3.4 Celična linija HepG2	13
3.4.1 Gojenje celic HepG2	14
3.5 Določanje mutagenega/antimutagenega delovanja z Amesovim testom	14
3.5.1 Amesov test.....	14
3.5.2 Metabolna aktivacija S9	15
3.5.3 Priprava medijev in reagentov.....	16
3.5.4 Vzorci	19
3.5.5 Izvedba Amesovega testa	19

3.6	Določanje citotoksičnega delovanja izvlečkov rožmarina na celice HepG2 s testom MTT	20
3.6.1	Test MTT.....	20
3.6.2	Priprava celic HepG2	21
3.6.3	Določanje citotoksičnega delovanja RA in CONH.....	21
3.7	DPPH – test ugotavljanja sposobnosti lovljenja prostih radikalov	21
3.8	Določanje genotoksičnega in antigenotoksičnega delovanja izvlečkov rožmarina s testom komet	22
3.8.1	Priprava reagentov in raztopin za test komet	24
3.8.2	Alkalni test komet	25
3.8.3	Določanje genotoksičnega delovanja RA in CONH s testom komet.....	27
3.8.4	Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH po izpostavitvi celic HepG2 tert-butil hidroperoksidu (t-BHP)	28
3.8.5	Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH ob izpostavitvi celic HepG2 mutagenu B[a]P (kotretma)	29
3.8.6	Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH ob izpostavitvi celic HepG2 mutagenu PhIP (kotretma).....	29
4	REZULTATI.....	31
4.1	Amesov test	31
4.2	Test MTT.....	35
4.3	Genotoksičnost RA in CONH	37
4.4	Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenimi s t-BHP (predtretma)	38
4.5	Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenimi s t-BHP (kotretma)	41
4.6	Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenim s t-BHP (pred- in kotretma).....	42
4.7	Ugotavljanje delovanja izvlečkov RA in CONH kot lovilcev prostih radikalov (test DPPH).....	45
4.8	Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenim z BaP in PhIP.....	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51

5.1	Razprava.....	51
5.2	Sklepi.....	57
6	POVZETEK (SUMMARY).....	59
7	VIRI	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna zgradba rožmarinske kisline.....	3
Slika 2: Biosinteza rožmarinske kisline v suspenzijski kulturi rastlinskih celic <i>Coleus blumei</i>	4
Slika 3: Strukturna zgradba karnozolske kisline in karnozola	5
Slika 4: Amesov test – plošči s kolonijami bakterij <i>Salmonella typhimurium</i> sev TA 98 ..	15
Slika 5: Pretvorba tetrazolijeve soli MTT v formazanske kristale	20
Slika 6: Jedra celic HepG2 po testu komet.....	24
Slika 7: Relativno razmerje števila kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA98 (odnos med kontrolno skupino in skupinami tretiranimi z različnimi koncentracijami A) RA in B) CONH brez metabolne aktivacije)	31
Slika 8: Relativno razmerje števila kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA98 (odnos med kontrolno skupino in skupinami tretiranimi z različnimi koncentracijami A) RA in B) CONH z metabolno aktivacijo).....	32
Slika 9: Relativno razmerje števila kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA98 zraslih na ploččah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam vzorcev A) RA in B) CONH skupaj z mutagenom NQNO.....	33
Slika 10: Relativno razmerje števila kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA98 zraslih na ploččah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam vzorcev A) RA in B) CONH skupaj z IQ	34
Slika 11: Določanje citotoksičnega delovanja vzorcev RA na celicah HepG2 s testom MTT	35
Slika 12: Določanje citotoksičnega delovanja vzorcev CONH na celicah HepG2 s testom MTT	36
Slika 13: Določanje genotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH na celicah HepG2 s testom komet.....	37
Slika 14: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH ob izpostavitvi celic HepG2 oksidativnem agensu <i>tert</i> -butil hidroperoksidu (t-BHP) po predhodnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH (predtretma).....	39
Slika 15: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH po hkratnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in t-BHP (kotretma).....	41

Slika 16: Ugotavljanje antioksidativnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH po predhodnjem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in po hkratnjem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in t-BHP (pred in kotretma).....	43
Slika 17: Ugotavljanje delovanja izvlečkov RA in CONH kot lovilcev prostih radikalov po 90 minutah	45
Slika 18: Sposobnost RA, CONH in AK (koncentracija 5 µg/ml) pri lovljenju DPPH prostih radikalov	46
Slika 19: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH ob hkratnjem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in B[a]P.....	48
Slika 20: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH ob hkratnjem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in PhIP	49

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Seznam uporabljenih kemikalij 12

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

•OH	hidroksilni radikal
ALS	alkalno labilna mesta (alkali labile sites)
B[a]P	benzo[a]piren
BHT	butiliran hidroksitoluen
CCl ₄	tetraklorometan
CFU	enota, ki tvori kolonijo (colony forming unit)
CYP1A1	citokrom 1A1
CONH	izvleček karnozola in karnozojske kisline
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSB	prelomi obeh verig (double strand breaks)
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina (ethylenediamine tetraacetic acid)
EtBr	etidijev bromid
FBS	serum govejega zarodka (foetal bovine serum)
GSH	reduciran glutation
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HA	heterociklični amini
HUVEC	človeške umbilikalne venske endotelne celice (human umbilical vein endothelial cells)
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin
LD ₅₀	koncentracija snovi pri kateri 50 % testnih osebkov ne preživi
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NQNO	4-nitrokvinolin-N-oksid
O ₂ •	superoksidni radikal
PBS	raztopina slanega fosfatnega pufra (phosphate buffered saline)
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
RA	izvleček rožmarinske kisline
ROO•	peroksilni radikal
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (reactive oxygen species)
SCGE	gelska elektroforeza posameznih celic (single cell gel electrophoresis)
SSB	prelomi ene verige (single strand breaks)
t-BHP	<i>tert</i> -butil hidroperoksid
UVA	ultravijolično sevanje A
VEGF	vaskularni endotelialni rastni faktor (vascular endothelial growth factor)

1 UVOD

Splošno je znano, da lahko številne snovi naravnega izvora delujejo antioksidativno ter zavirajo mutagenezo in karcinogenezo tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* pogojih. Veliko takoj imenovanih kemopreventivnih snovi se pogosto pojavlja tudi v naši prehrani, zato je pomembno poznati njihov učinek ter mehanizem delovanja na organizem oziroma celice.

Prosti radikali lahko povzročijo poškodbe celic in njihovih sestavin, kar lahko vodi v nastanek in razvoj kroničnih degenerativnih bolezni. Odkar se je v evoluciji organizmov pojavila aerobna presnova, se je pojavila potreba po antioksidantih, ker je prišlo do večje izpostavljenosti prostim radikalom, ki znotraj organizmov nastajajo iz kisika. Prosti radikali so v organizmu nujno potrebni, saj uravnavajo številne fiziološke procese, kot je na primer obramba pred bakterijskimi infekcijami. Pri nekaterih fizioloških procesih, ter zaradi zunanjih vplivov, lahko nastane preveč prostih radikalov, katere mora organizem odstraniti.

Ljudje in drugi organizmi smo izpostavljeni tudi številnim mutagenim karcinogenom. V okolju je veliko onesnažil, med katerimi so tudi policiklični aromatski ogljikovodiki (na primer zelo razširjen benzo[a]piren (B[a]P)) in zanje je znano, da delujejo karcinogeno. Pomemben dejavnik izpostavljenosti je tudi prehrana in najpomembnejši mutageni prehranskega izvora so heterociklični amini (na primer 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-qkvolin (IQ) in 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridin (PhIP)), ki nastanejo pri toplotni obdelavi živil. Omenjeni primeri mutagenov oziroma prokarcinogenov (za njihovo pretvorbo v aktivno obliko je potrebna metabolna aktivacija) povzročajo DNK adukte, te poškodbe pa lahko vodijo v mutagenezo.

Ob izpostavljenosti mutagenom, se v celicah organizmov sproži detoksifikacijska pot, katalizirana s pomočjo encimov faze II. Ker pa v celicah obstajajo tudi encimi, ki prokarcinogene pretvorijo v aktivno obliko (encimi faze I), je pomembno, da lahko to pretvorbo zavremo preko zmanjšanja produkcije teh encimov, ali preko inhibicije njihovega delovanja.

Za vzdrževanje ustreznega ravnovesja med prostimi radikali in obrambo pred njihovimi škodljivimi učinki ter za vzpodbujanje metabolnih encimov faze II in inhibicijo delovanja encimov faze I za zaščito pred mutageni, se v organizmih nahajajo endogeni antioksidanti (glutation, peroksidaze, vitamin A, vitamin D,...), ki pa se lahko hitro porabijo, zato imajo pomembno vlogo tudi tisti, ki jih v organizem vnašamo s hrano. Ti so v njej naravno prisotni, ali dodani v obliki farmacevtskih pripravkov.

Zaradi potencialne uporabnosti antioksidantov naravnega izvora v boju proti rakavim obolenjem, je potrebno poznati njihovo delovanje.

2 **PREGLED OBJAV**

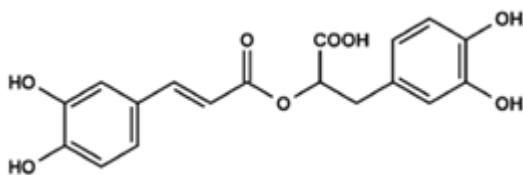
2.1 Izvlečki rožmarina

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je olesenela zimzelena večletna rastlina, ki izvira iz južne Evrope in pripada družini usnatic (*Lamiaceae*). Ime izvira iz latinske besede *rosmarinus*, ki pomeni rosa z morja. Rastlina je precej odporna proti suši, zato brez težav uspeva v mediteranskem podnebju. Rožmarin vsebuje flavonoide, fenole, terpenoide in do 2.5 % hlapnih olj (povzeto v Petersen in Simmonds, 2003).

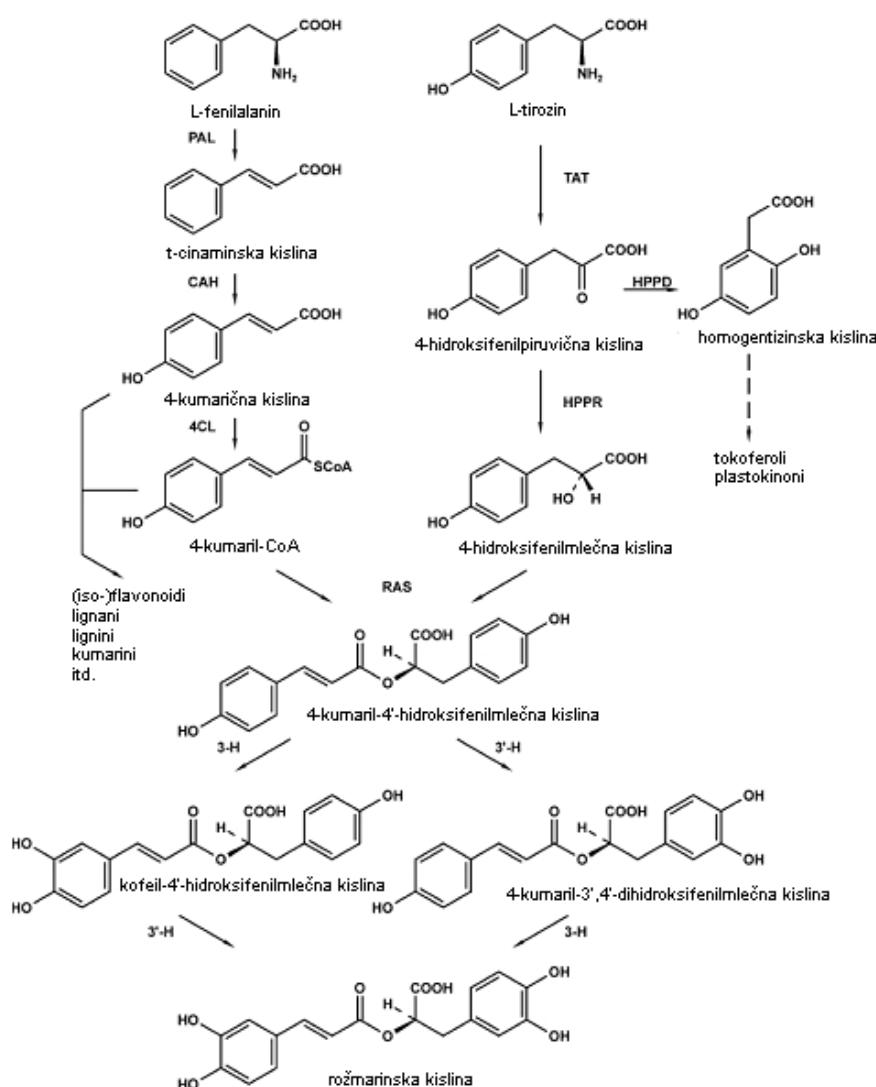
2.1.1 Rožmarinska kislina

Rožmarinska kislina (Slika 1) je ester kofeinske kisline in 3,4-dihidroksifenilmlečne kisline. Prekurzorja za sintezo rožmarinske kisline sta dve aromatski aminokislini, tirozin in fenilalanin. Shema biosinteze je prikazana na Sliki 2. Med rastlinami se rožmarinska kislina najpogosteje pojavlja pri dvokaličnicah v družinah Boraginaceae in Lamiaceae, najdemo pa jo tudi v številnih drugih družinah in celo pri praprotih in nižjih mahovih (Petersen in Simmonds, 2003).

Po intravenoznem vbrizgu se rožmarinska kislina hitro odstrani iz krvnega obtoka (razpolovni čas je 9 min) in kaže nizko toksičnost pri miših po intravenoznem vbrizgu (LD₅₀ je 561 mg/kg) (povzeto v Petersen in Simmonds, 2003).



Slika 1: Strukturna zgradba rožmarinske kisline

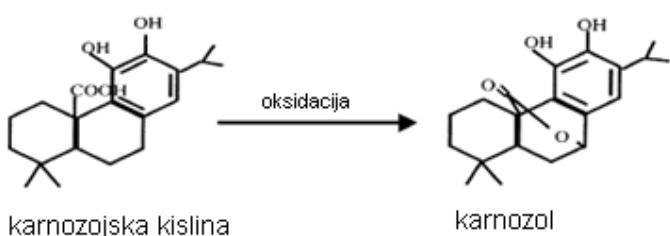


Slika 2: Biosinteza rožmarinske kisline v suspenzijski kulturi rastlinskih celic *Coleus blumei*

PAL – fenilalanin amonijeva liaz; CAH – 4-hidroksilaza cinaminske kisline; 4CL – ligaza hidroksicinamat:koencima A; TAT – tirozinska aminotransferaza; HPPR – hidroksifenilpiruvatna reduktaza; HPPD – hidroksifenilpiruvatna dioksigenaza; RAS - hidroksicinamil-CoA:hidroksifenillaktat hidroksicinamil transferaza; 3-H, 30-H - hidroksicinamil-hidroksifenillaktat 3- in 30-hidroksilazi.

2.1.2 Karnozol in karnozojska kislina

Karnozol je fenolni diterpen, ki nastane z oksidacijo karnozojske kisline (Slika 3). Obe spojini sta široko zastopani v družini usnatic (*Lamiaceae*). V *in vivo* študijah, kjer je karnozol predstavljal do 1% zaužite hrane, niso opazili toksičnih učinkov, prav tako ni deloval toksično do koncentracije 200 mg/kg telesne teže, če je bil vbrizgan v telo (Dörrie s sod., 2001).



Slika 3: Struktura zgradba karnozojske kisline in karnozola

2.2 ROS – reaktivne kisikove zvrsti

Pri aerobnem metabolizmu kot stranski produkti nastajajo tudi reaktivne kisikove zvrsti (ROS; iz ang. reactive oxygen species), in sicer v procesu oksidativne fosforilacije oziroma v mitohondrijskem elektronskem transportu, pri vnetjih in metabolizmu ksenobiotikov. Običajno se v mitohondriju 2 - 5 % sprejetega kisika pretvorí v ROS.

Med ROS uvrščamo superoksidne radikale ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilne radikale ($\cdot OH$), peroksilne radikale ($ROO^{\cdot-}$) in vodikov peroksid (H_2O_2) (Lopaczynski in Zeisel, 2001). Prosti radikali (atomi, ioni ali molekule z enim nesparjenim elektronom na zunanjih orbitalih) lahko nespecifično reagirajo s sosednjo molekuljo, torej tudi s celičnimi komponentami, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline, proteine, nukleinske kisline in ogljikove hidrate. Te reakcije nato vodijo do poškodb celic (Mba Gachou in sod., 1999).

Poškodbe celic lahko zaradi delovanja prostih radikalov vodijo do razvoja raznih kroničnih bolezni, kot so na primer rak, kardiovaskularne bolezni in staranje (Mba Gachou in sod.,

1999). Hkrati prosti radikali pomagajo pri odstranjevanju patogenov iz telesa (Fang in sod., 2002). Da bi se ljudje in ostali aerobni organizmi zaščitili pred škodljivimi vplivi ROS, so se tokom evolucije razvili številni zaščitni mehanizmi. Tako lahko njihove učinke zmanjšajo nekateri endogeni encimi (na primer katalaza, superoksid dismutaza, glutation reduktaza, glutation peroksidaza) in antioksidanti – tisti, ki so prisotni v celici (na primer glutation) in takšni, ki jih pridobimo s hrano ter se nato kopijo v celicah (na primer askorbinska kislina, β -karoten, α -tokoferol, izoflavoni) (Lopaczynski in Zeisel, 2001). Oksidativni stres nastopi, ko se ravnotežje med antioksidativnim obrambnim sistemom in prostimi radikali poruši, kar vodi v razvoj številnih degenerativnih bolezni (Gheldorf in Engeseth, 2002).

Ena izmed tarčnih molekul reaktivnih kisikovih zvrsti v celici je tudi DNK in poškodbe letne lahko vodijo v karcinogenezo. Prosti radikali povzročajo na DNK prelome ene verige (SSB; iz ang. single strand breaks), prelome obeh verig (DSB; iz ang. double strand breaks), nastanek alkalno labilnih mest (ALS; iz ang. alkali labile sites) in oksidacijo purinov ter pirimidinov (Mba Gachou in sod., 1999). Oksidativne reakcije v organizmih vsak dan povzročajo poškodbe DNK, zato je učinkovit popravljalni mehanizem ključen za preživetje in normalno funkcijo celic. V kolikor se oksidativne poškodbe ne popravijo lahko pride do mutacij, te pa lahko vodijo v maligno transformacijo (Møller in Wallin, 1998). Poleg popravljalnih mehanizmov, ki popravljajo poškodbe DNK, pa njihov nastanek preprečujejo antioksidativni encimi in ostale komponente z antioksidativno aktivnostjo, ki odstranjujejo ROS.

2.3 Mutageni

Na razvoj rakavih obolenj poleg genetskih predispozicij, vplivajo tudi okoljski dejavniki. Pomemben okoljski dejavnik, ki pripomore k povečanju tveganja razvoja rakavih obolenj, je prehrana. Najpomembnejši mutageni prehrambenega izvora so heterociklični amini (HA). Pojavijo se kot stranski produkti pri topotni obdelavi živil predvsem mišičnega izvora (meso), saj so v njej prisotni vsi potrebni prekurzorji za njihovo sintezo (povzeto v Cheng s sod., 2006). V okolju je tudi veliko onesnažil, med katerimi je zelo razširjen

benzo[a]piren (B[a]P), ki spada v skupino policikličnih aromatskih ogljikovodikov, ki nastajajo ob nepopolnem izgorevanju organskih snovi. Znano je, da policiklični aromatski ogljikovodiki delujejo karcinogeno (Chen s sod., 2002; Nebert s sod., 2004; Tsuji in Walle, 2007; Wen s sod., 2005).

HA lahko po metabolni aktivaciji tvorijo DNK adukte, te poškodbe lahko vodijo v mutagenezo. Za 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin (IQ) in 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridin (PhIP) je znano, da v večini tvorita transverzije enega baznega para (največ GC v AT). Pokazali so tudi karcinogeno delovanje obeh omenjenih mutagenov v različnih tkivih in organih ter pri različnih vrstah poskusnih živali, vključno z opicami. Prav zaradi delovanja na različna tkiva, je tveganje za razvoj rakavih obolenj zaradi izpostavljenosti HA pri ljudeh toliko večje (povzeto v Cheng s sod., 2006, Felton s sod., 2004). DNK adukte povzroča tudi B[a]P, saj se v celicah po metabolni pretvorbi v diolne epokside kovalentno veže na DNK (Chen s sod., 2002; Nebert s sod., 2004). IQ, PhIP in B[a]P so primeri posrednih mutagenov, ki za delovanje znotraj celic potrebujejo metabolno aktivacijo z encimi citokroma P450. Obstajajo pa tudi neposredni mutageni, ki za delovanje ne potreujejo metabolne aktivacije. Tak je 4-nitrokvino-N-oksid (NQNO), ki se veže na DNK, in sicer na adenin in gvanin. Reduciran metabolit NQNO pa lahko v celici sproži nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki povzročijo oksidativne poškodbe DNK (povzeto v Nunoshiba in Demple, 1993).

2.4 Delovanje izvlečkov rožmarina

Rožmarin ljudje uporabljajo kot začimbo ali zelišče, saj naj bi imel analgetičen, pomirjevalen, diuretičen in proti bakterijski učinek. Že v sredini dvajsetega stoletja so ugotovili, da izvlečki iz rožmarinovih listov delujejo antioksidativno. Največji del antioksidativnega delovanja so pripisali karnozolu in karnozojski kislini, učinkovita pa je tudi rožmarinska kislina. Zato izvlečke rožmarina dodajajo k raznim prehrambenim izdelkom (kot antioksidant) in jim tako podaljšajo rok uporabe (povzeto v Petersen in Simmonds, 2003).

Poleg splošno znanih učinkov obstajajo tudi specifični, kateri so se pokazali kot rezultat različnih poskusov. Diterpeni iz rožmarina (karnozol, karnozojska kislina, rožmarinska kislina, rosmadial in genkvanin) utrdijo lipidno membrano, kar lahko prispeva k njihovi antioksidativni aktivnosti, saj pride do oviranja difuzije prostih radikalov (Perez-Fons s sod., 2006). Nogala-Kalucka in sodelavci (2004) so pokazali, da je izvleček rožmarina učinkovitejši antioksidant, kot tokoferoli. V primerjavi s sintetičnim antioksidantom butiliranim hidroksitoluenom (BHT) je eterično olje bolje varovalo nenasicičene dolgoverižne maščobne kisline pred oksidacijo in v splošnem je rožmarinovo eterično olje v primerjavi z BHT bolje varovalo jetrno pašteto pred oksidativnim kvarjenjem (Estevez s sod., 2007). V *in vivo* poskusih na podganah so ugotovili, da je zaužitje rožmarina preprečilo poškodbe jeter povzročene s CCl₄ (Sotelo-Felix s sod., 2001). Izboljšanje antioksidativnega stanja jeter so opazili tudi v drugi študiji, kjer so sicer uporabljali žajbelj, ki pa vsebuje podobne snovi kot rožmarin (na primer rožmarinsko kislino, karnozol in karnozojsko kislino) (Lima s sod., 2005). Izvleček rožmarina zmanjša genotoksično aktivnost vodikovega peroksida že ob dveurni predinkubaciji celične linije CaCo-2 z izvlečkom (Slamenova s sod., 2002).

2.4.1 Delovanje rožmarinske kisline

Za rožmarinsko kislino je bilo opisanih več bioloških aktivnosti, med katerimi so glavne antioksidativno, protivnetno, antitumurreno, antibakterijski in antitivirusno delovanje. Osnova protivnetnega delovanja naj bi bila inhibicija lipoksiogenaz in ciklooksigenaz ter vmešavanje v kaskado komplementa (povzeto v Petersen in Simmonds, 2003).

Rožmarinska kislina kaže zaščitni potencial pred oksidativnimi poškodbami HepG2 celic povzročenimi s t-BHP (Lima s sod., 2006). Skupaj s kemoterapevtskim agensom cisplatinom pomaga zmanjševati poškodbe ledvičnih celic, ki jih povzroči cisplatin, hkrati pa ne zmanjšuje njegovega učinka (Tian in Jiang, 2006). Prav tako zmanjšuje kardiotoksičnost kemoterapevtskega agensa adriamicina, saj je zmanjšala raven apoptoze v H9c2 srčnih mišičnih celicah (med drugim tudi z znižanjem znotrajcelične produkcije ROS) (Kim s sod., 2005). Predtretiranje človeških keratinocitov z rožmarinsko kislino,

povzroči zmanjšanje z UVA sevanjem sprožene produkcije ROS. Zmanjša tudi učinek UVA sevanja, ki povzroči zmanjšano viabilnost keratinocitov (Psotova s sod., 2006). Rožmarinska kislina inhibira angiogenezo pri človeških umbilikalnih venskih endotelnih celicah (HUVEC), in sicer v koncentracijski odvisnosti. Ker je rožmarinska kislina pri endotelnih celicah tudi zmanjšala intracelularni nivo ROS, od H_2O_2 odvisno izražanje VEGF in izpust IL-8, so predpostavili, da bi lahko bil protiangiogenetski potencial povezan z antioksidativno aktivnostjo (Huang in Zheng, 2006). Prav tako inhibira s citokini inducirano proliferacijo mišijih mesangialnih celic (Makino s sod., 2000). Deluje tudi protivnetno in antimiotoksično v primeru delovanja kačjega strupa (fosfolipaze A₂) (Ticli s sod., 2005). Inhibira nastanek poškodb pljuč povzročenih z delci dizelskih izpušnih plinov, tako da zmanjša izražanje provnetnih molekul (Sanbongi s sod., 2003). V testu prisiljenega plavanja pri miših je rožmarinska kislina delovala antidepresivno (Takeda s sod., 2002).

2.4.2 Delovanje karnozola in karnozojske kisline

Tudi karnozol in karnozojska kislina imata več bioloških aktivnosti. V izvlečku iz listov rožmarina lahko kar 90% antioksidativnega delovanja pripisemo karnozolu in karnozojski kislini (Huang s sod., 2005). Oba inhibirata aktivnost pankreasnih lipaz (Ninomiya s sod., 2004). Vplivata tudi na celični cikel, saj lahko ustavita celice v posameznih fazah celičnega cikla, najverjetneje preko vpliva na ciklinske proteine (Visanji s sod., 2006).

Karnozol ima antioksidativno, protivnetno in kemopreventivno delovanje (Lo s sod., 2002), kot tudi protibakterijsko delovanje na sevih *Staphylococcus aureus* (Oluwatuyi s sod., 2004). Prepreči lahko poškodbe DNK povzročene s 7,12-dimetilbenz[a]antracenom in nastanek tumorjev v podganji mlečni žlezi (Singletary s sod., 1996). Prav tako deluje protikarcinogeno, saj inhibira invazijo visoko metastatskih mišijih celic B16/F10 in vitro (Huang s sod., 2005). Protikarcinogeno aktivnost so pokazali tudi na primeru B-povezanih levkemij (Dörrie s sod., 2001). Intraperitonealno injiciran karnozol je pri podghanah povečal in vivo aktivnost jetrne glutation-S-transferaze in NAD(P)H-kinon reduktaze (Singletary, 1996).

Karnozojska kislina je pri miših, ki so bile hranjene s hrano z visoko vsebnostjo maščob, zmanjšala pridobivanje teže in akumulacije epididimijskega maščobnega tkiva (Ninomiya s sod., 2004).

2.5 Namen naloge in delovne hipoteze

V nalogi smo želeli ugotoviti ali izbrana izvlečka iz rožmarina delujeta:

- a) antimutageno
- b) antioksidativno in
- c) antigenotoksično.

Zanimalo nas je, ali izvlečka iz rožmarina ščitita celice pred oksidativnimi poškodbami DNK povzročenimi z dejavniki, ki povzročajo oksidativni stres, ter ali delujeta antigenotoksično in antimutageno proti posredno delujočim mutagenom.

Namen naloge je bil ugotoviti, ali:

- izvlečka iz rožmarina delujeta kot lovilca prostih radikalov, kar pomeni, da imata antioksidativne lastnosti
- imata izvlečka iz rožmarina antimutagen učinek na bakterije
- imata izvlečka iz rožmarina antigenotoksičen učinek na HepG2 celice

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Izvlečka iz rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

V diplomski nalogi smo raziskovali delovanje dveh izvlečkov iz rožmarina, ki sta bila proizvedena v podjetju VITIVA (Slovenija). Prvi izvleček – RA – je vseboval 17 % rožmarinske kisline, drugi izvleček – CONH – pa je vseboval 5.65 % karnozola in 50.27 % karnozojske kisline. Pripravili smo založne raztopine obeh izvlečkov v koncentraciji 10 mg/ml (kot topilo za CONH smo uporabili 99.8 % etanol, za RA pa destilirano vodo).

3.2 Kemikalije

Tabela 1: Seznam uporabljenih kemikalij

kemikalija	proizvajalec	kataloška številka
benzo[a]piren (B[a]P)	Sigma, St. Louis, ZDA	B-1760
DMSO	Sigma, St. Louis, ZDA	154938-1L
EDTA	Sigma, St. Louis, ZDA	E 5134-5006
etanol	Merck, Nemčija	1.00971.1000
etidijev bromid	Gibco BRL, VB	15585-011
FBS	Euro clone	ECS 0180L
HCl	Merck, Nemčija	1.00318.1000
L-glutamin	Euro clone	EC B3000D
LMP agaroha	Invitrogen, VB	15517-022
MTT	Sigma, St. Louis, ZDA	M-5655
NaCl	Merck, Nemčija	1.06404.1000
NaOH	Merck, Nemčija	1.06482.1000
NMP agaroha	Invitrogen, VB	15510-027
PBS	Euro clone	ECM 4004XL
penicilin/streptomicin	Euro clone	EC B3001D
t-BHP; <i>tert</i> -butil-hidroperoksid	Sigma, St. Louis, ZDA	458139-100ML
tripansko modrilo	Sigma, St. Louis, ZDA	T-8154
tripsin	Sigma, St. Louis, ZDA	T-4174
Triton X-100	Sigma, St. Louis, ZDA	X100-500ML
Williamsov medij E	Sigma, St. Louis, ZDA	W-1878

3.3 Sevi bakterije *Salmonella typhimurium*

Sevi bakterije *Salmonella typhimurium*, ki smo jih uporabili v Amesovem testu, imajo mutacije v različnih genih na histidinskem operonu in so odvisni od histidina. Za povečanje občutljivosti bakterijskih sevov so vnešene dodatne mutacije/genetske spremembe (na primer delecija uvrB, mutacija rfa, plazmid pKM101).

Uporabili smo sev TA98, kateri ima za specifično tarčno sekvenco marker *hisD3052*. Ta se uporablja za ugotavljanje mutacij, pri katerih pride do -1 premika bralnega okvirja blizu ponavljajoče se sekvence CGCGCGCG. Ob mutaciji oziroma deleciji baznega para se tako ponovno vzpostavi pravilno bralno zaporedje za sintezo histidina (Maron in Ames 1984).

3.3.1 Gojenje kultur bakterij *Salmonella typhimurium*

Testni sev smo gojili v hranilnem gojišču (Oxoid nutrient broth N°2) z ampicilinom (25 µg/ml) čez noč pri 37°C. Dve uri pred začetkom testa smo bakterijsko kulturo stresali na stresalniku (približno 600 obratov/min) pri 37°C.

3.4 Celična linija HepG2

Potencialno citotoksično, genotoksično in antigenotoksično delovanje RA in CONH smo v naši študiji raziskali na modelu s celično linijo humanega hepatoma (celice HepG2).

Celice HepG2 so leta 1979 izolirali iz hepatoblastoma 11-letnega dečka (Aden s sod., 1979). Ta celična linija se uveljavlja predvsem v študijah genotoksičnosti. Celice HepG2 so ohranile metabolno aktivnost in imajo aktivne metabolne encime I in II faze, ki igrajo ključno vlogo pri aktivaciji in detoksifikaciji mutagenov, ki delujejo na DNK. Aktivnosti teh encimov so podobne kot aktivnosti v sveže izoliranih primarnih človeških hepatocitih (Knasmüller s sod., 1998). Delitveni čas celic je 20 do 28 ur (Natarajan in Darroudi, 1991).

3.4.1 Gojenje celic HepG2

Celično linijo HepG2 smo imeli shranjeno v tekočem dušiku. Celice smo uporabljali do največ enajste pasaže po odmrznitvi, saj se s časom gojenja in pri višjih pasažah spremenijo morfogenetske lastnosti celic, encimske aktivnosti pa se zmanjšajo.

Celice smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, USA) pri 37°C v 5 % CO_2 atmosferi v celičnem gojišču sestavljenem iz Williamsovega gojišča E, 15 % FBS, 1 % penicilin/streptomicina (100E/ml) in 1 % L-glutamina. Presajali smo jih ob 80 % preraščenosti plošče.

Pri presajanju smo iz platenke odstranili gojišče, celice sprali z 1x PBS, ga odstranili in dodali 0.1 % tripsin za celice HepG2 (1.5 ml za malo platenko, 3 ml za srednjo) ter inkubirali 5 minut pri 37°C . Po inkubaciji smo celice rahlo pretresli, da so se odlepile od podlage, nakar smo dodali sveže gojišče. Serum v gojišču zavre delovanje tripsina in tako prepreči morebitne dodatne poškodbe DNK, ki bi nastale zaradi predolge izpostavljenosti tripsinu. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 min pri 800 obratih/minuto. Supernatant smo po centrifugiranju zavrgli, celice pa smo resuspendirali v svežem gojišču in jih prenesli v novo platenko. S pomočjo brizge smo resuspendirane celice 3-5x potegnili skozi injekcijsko iglo (0.9x40 mm, Becton Dickenson, Fraga, Španija). Dobili smo suspenzijo posameznih celic, ki smo jih nasadili v novo platenko.

Za odlepljanje celic smo uporabili 0.1 % raztopino tripsina za celice HepG2. Raztopino smo pripravili tako, da smo za 1 l zatehtali 1 g tripsina, 0.1 g EDTA, 8 g NaCl, 0.4 g KCl, 1 g glukoze monohidrata in 0.84 g NaHCO_3 . Nato smo pripravljeno raztopino tripsina sterilizirali s filtriranjem skozi filter s porami velikosti $0.22 \mu\text{m}$.

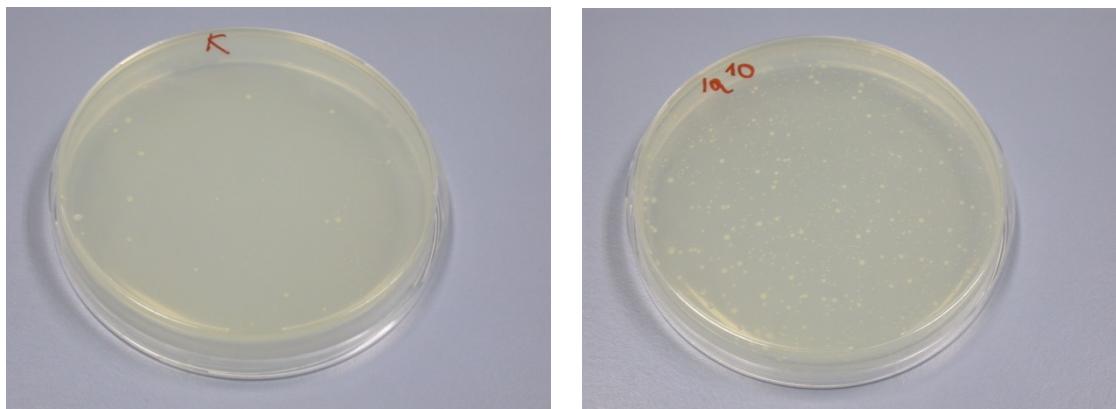
Za preverjanje številčnosti celic med gojenjem smo uporabljali 0.4 % tripansko modrilo.

3.5 Določanje mutagenega/antimutagenega delovanja z Amesovim testom

3.5.1 Amesov test

Amesov test oziroma *Salmonella* mikrosomalni test povratnih mutacij je metoda za določanje snovi, ki povzročajo mutacije.

Na minimalnih glukoznih gojiščih, katera vsebujejo histidin le v sledovih, bakterije testnih sevov tvorijo kolonije le, če je pri njih prišlo do povratnih mutacij in se je tako vzpostavilo normalno stanje (so neodvisne od histidina). Število spontanih revertantov na ploščo je relativno konstantno, prisotnost mutagenov pa število povratnih mutacij poveča, kar se odraža kot povečano število kolonij na ploščah.



Slika 4: Amesov test – plošči s kolonijami bakterij *Salmonella typhimurium* sev TA 98

Plošče minimalnega glukognega gojišča za Amesov test, na katerih so zrasle kolonije bakterij *Salmonella typhimurium* sev TA 98, in sicer na levi (K) spontane revertante (kontrola) ter na desni (IQ 10) z mutagenom 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin (IQ) inducirane in spontane revertante (pozitivna kontrola), obe po treh dneh inkubacije pri 37°C.

3.5.2 Metabolna aktivacija S9

Mnoge karcinogene snovi (na primer aromatski amini ali policiklični aromatski ogljikovodiki) niso biološko aktivne, dokler niso metabolizirane v aktivno obliko. Ker bakterije nimajo metabolnega oksidacijskega sistema s citokromom P450, kot ga imajo živali, moramo v testu dodajati tudi eksogen sesalski metabolni aktivacijski sistem S9. To je mikrosomalna frakcija pridobljena iz podganjih jeter, ki vsebuje encime metabolne aktivacije (Maron in Ames 1984).

3.5.3 Priprava medijev in reagentov

Plošče minimalnega glukoznega gojišča

Sestavine	Za 1000 ml
Agar	15 g
Destilirana voda	930 ml
50x VB sol	20 ml
40% glukoza	50 ml

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

Vogel-Bonner medij (50x VB sol)

Sestavine	Za 1000 ml
Destilirana H ₂ O	670 ml
Magnezijev sulfat (MgSO ₄)	10 g
Citronska kislina monohidrat	100 g
Kalijev fosfat anhidrid (K ₂ HPO ₄)	500 g
Natrijev amonijev fosfat (NaNH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O)	175 g

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

40% glukoza

Sestavime	Za 100 ml
Destilirana H ₂ O	100 ml
Glukoza	40 g

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

Top agar

Sestavine	Za 1000 ml
Agar	6 g
NaCl	5 g
Destilirana H ₂ O	1000 ml

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

Raztopina histidin/biotina (5 mM)

Sestavine	Za 50 ml
D-biotin (FW 247.3)	61,8 mg
L-histidin (FW 191.7)	48 mg
Destilirana H ₂ O	50 ml

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

Hranilno gojišče

Sestavine	Za 1000 ml
Nutrient Broth N°2 Oxoid	25 g
Destilirana H ₂ O	1000 ml

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

Fosfatni pufer, pH 7,4

Sestavine (NaHPO ₄)	Za 500 ml
0.2 M natrijev dihydrogen fosfat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O); 13.8 g/500 ml	60 ml*
0.2 M dinatrijev hidrogen fosfat (Na ₂ HPO ₄); 14.2 g/500 ml	500 ml*

*približni volumen raztopine

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

Metabolna aktivacija S9

sestavine	Za 1 ml	+ za 1 ml	4 % S9 mix	Za 1 ml
1 M KCl	33 µl		Sterilna H ₂ O	270 µl
0.2 M MgCl ₂ ·6H ₂ O	32 µl		S9	40 µl
0.2 M G-6-P	25 µl			
0.04 M NADP	100 µl			
0.2 M NaHPO ₄	500 µl			

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

3.5.4 Vzorci

Z Amesovim testom smo testirali tri različne koncentracije izvlečkov rožmarinske kisline (RA) in karnozjske kisline ter karnozola (CONH). Končne koncentracije izvlečkov so bile 0.5, 1 in 2 mg/ml, kar ustreza koncentracijam 0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo.

3.5.5 Izvedba Amesovega testa

Bakterije *S. typhimurium* TA98, ki smo jih čez noč gojili pri 37°C, smo dve uri pred začetkom testa stresali na stresalniku (600 obratov/min) pri 37°C. Med inkubacijo in stresanjem smo pripravili koncentracije izvlečkov ter top agar.

Top agar smo segreli in mu dodali 5mM histidin/biotin (1ml his/bio na 100 ml top agarja). Epruvetke smo postavili v termoblok ter v vsako dodali 2 ml pripravljenega top agarja, 100 µl bakterijske suspenzije in 100 µl vzorca, v tiste s S9 metabolno aktivacijo pa še 500 µl mešanice S9. Vsebino epruvetke smo nato na kratko premešali na mešalniku (800 obratov), razlili na ploščo minimalnega glukognega gojišča tako da smo prekrili celotno površino.

- Preverjanje mutagenosti vzorcev:

Testirali smo različne koncentracije RA in CONH. Negativna kontrola je bila sterilna voda, pozitivna kontrola pa 4-nitrovinolin-N-oksid (NQNO) v primeru brez, in 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin (IQ) v primeru testiranja v prisotnosti metabolne aktivacije.

- Preverjanje antimutagenega delovanja vzorcev:

Bakterijski suspenziji v testih brez metabolne aktivacije je bil dodan NQNO s končno koncentracijo 5 µg/ml (500 ng/ploščo). Pri testih z metabolno aktivacijo je bil dodan IQ s končno koncentracijo 100 ng/ml (10 ng/ploščo). Tako pripravljeno bakterijsko suspenzijo smo nato uporabili v testu, kjer smo dodali različne koncentracije vzorcev. Za negativno kontrolo je služil vzorec brez dodanega mutagena, samo s sterilno vodo, pozitivna kontrola pa je bila samo bakterijska suspenzija z mutagenom brez vzorca.

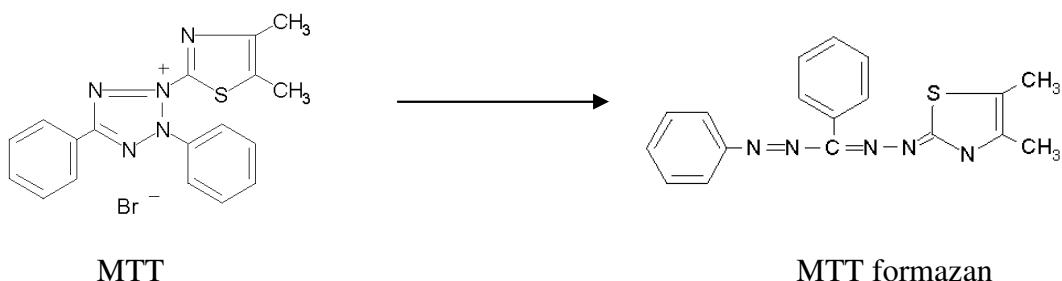
Vsako koncentracijo vzorca smo testirali v treh ponovitvah.

Plošče smo inkubirali 3 dni pri 37°C. Po končani inkubaciji smo prešteli število spontanih revertantov, z mikroskopom pa smo preverili tudi ozadje na ploščah, da smo izključili morebitno toksično delovanje vzorcev in mutagenov (povzeto po navodilih 10G-Pos02-01, Ames (*S. typhimurium*) laboratorija GEN).

3.6 Določanje citotoksičnega delovanja izvlečkov rožmarina na celice HepG2 s testom MTT

3.6.1 Test MTT

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) je rumena vodotopna substanca, ki jo mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze metabolno aktivnih celic reducirajo v vijolične nevodotopne kristale formazana. Kristali formazana so topni v DMSO, izopropanolu in podobnih topilih.



Slika 5: Pretvorba tetrazolijeve soli MTT v formazanske kristale

Količina nastalega formazana je sorazmerna s številom živih celic. Količino nastalih formazanskih kristalov dobimo z merjenjem absorbkcije pri svetlobi valovne dolžine 570 nm z referenčnim filtrom 690 nm (povzeto po navodilih 10G-Pos02-01, MTT test, laboratorija GEN).

Pripravili smo raztopino MTT s koncentracijo 5 mg/ml v 1x PBS, jo sterilizirali s filtriranjem preko filtra s porami velikosti 0.22 µm (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) in do uporabe shranili pri -20°C na temi.

3.6.2 Priprava celic HepG2

Na mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami (Nunc, Naperville, ZDA) smo nasadili celice HepG2 z gostoto 50 000 celic/ml. V vsako luknjico smo dodali 200 µl celične suspenzije ter tako dobili gostoto 10 000 celic/luknjico. Ploščo smo inkubirali 4 ure (37°C, 5% CO₂, vlažna atmosfera), da so se celice prilepile na podlagu.

3.6.3 Določanje citotoksičnega delovanja RA in CONH

Po inkubaciji smo gojišče zamenjali s svežim, ki je vsebovalo 0.5, 5, 25, 50 in 100 µg/ml RA oziroma CONH. Vsako koncentracijo vzorca smo testirali v petih paralelkah. Kontroli smo dodali le sveže gojišče. Sledila je 21-urna inkubacija pri 37°C, 5% CO₂ in v vlažni atmosferi. Nato smo v vsako luknjico dodali 20 µl MTT (50 mg/ml) ter inkubirali še 3 ure. Po inkubaciji smo odstranili gojišče in v vsako luknjico dodali 200 µl DMSO, da smo raztopili formazanske kristale. Izmerili smo absorbcijo pri svetlobi valovne dolžine 570 nm z referenčnim filtrom 690 nm.

3.7 DPPH – test ugotavljanja sposobnosti lovljenja prostih radikalov

DPPH (2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil) je radikal, ki se uporablja v testu sposobnosti lovljenja prostih radikalov. DPPH radikal se veže na reaktivne kisikove zvrsti in reakcijo izmerimo spektrofotometrično kot spremembo barve.

Test z DPPH smo uporabili, da bi ugotovili, ali RA in CONH delujeta kot lovilca prostih radikalov.

Test smo izvedli na mikrotitrski plošči s 96 luknjicami (Nunc, Naperville, ZDA). V vsako luknlico smo nanesli 100 µl vzorca in 100 µl DPPH (300 µM raztopina pripravljena v 99.8 % etanolu), ki smo ga dodali tik pred začetkom merjenja. Testirali smo štiri različne koncentracije vsakega od izvlečkov (0, 5, 10, 50 in 100 µg/ml, za koncentracijo 0 µg/ml smo namesto ekstrakta dodali 100 µl 1x PBS). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili askorbinsko kislino, in sicer v enakih koncentracijah kot vzorca. Za slepo probo smo v pet luknjic dodali etanol in PBS (vsakega po 100 µl) brez dodanega DPPH na koncu. Takoj, ko smo dodali DPPH, smo začeli meriti absorbcojo pri svetlobi valovne dolžine 515 nm. Reakcijo smo merili 90 minut v 10-minutnih intervalih.

3.8 Določanje genotoksičnega in antigenotoksičnega delovanja izvlečkov rožmarina s testom komet

Test komet ali gelska elektroforeza posameznih celic (SCGE; iz ang. single cell gel electrophoresis) je hitra in občutljiva metoda za določanje poškodb DNK, katero sta leta 1984 razvila Östling in Johanson. S to metodo lahko z v nevtralnih pogojih zaznamo prelome obeh verig DNK (DSB; iz ang. double strand breaks). Prvotni test so tudi modificirali tako, da so izpostavili celice na elektroforezi alkalnim pogojem, pri katerih je možno zaznati tudi enoverižne prelome DNK (SSB; iz ang. single strand breaks) in alkalno labilna mesta (ALS; iz ang. alkali labile sites) (Singh in sod., 1988).

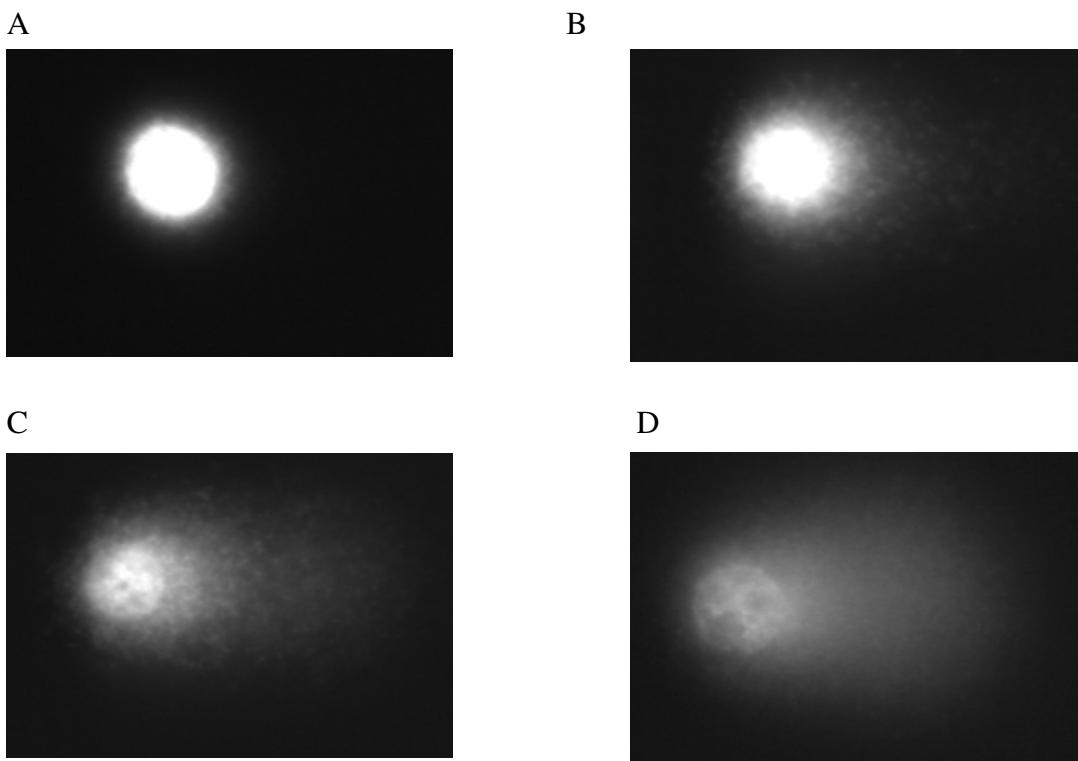
Z alkalno verzijo testa komet, lahko poleg omenjenih poškodb zaznamo tudi takšne, ki so le prehodno prisotne (na primer nastanejo pri nukleotidnem ali baznem izrezovanju) in so posledica celičnih popravljalnih mehanizmov. Prelomi, ki jih zaznamo s testom komet, nakazujejo na poškodbe DNK, ali na uspešno popravljanje poškodb nastalih na DNK (Collins s sod., 1997).

Večina genotoksičnih agensov povzroči več enoverižnih prelomov DNK ter alkalno labilnih mest, kot pa dvoverižnih. Ker se pri pH>12.6 alkalno labilna mesta izrazijo kot enoverižni prelomi, je alkalna različica testa najprimernejša za določanje genotoksičnega delovanja, saj na ta način zaznamo največ poškodb (Tice s sod., 2000).

Pri testu komet suspenzijo posameznih celic pomešamo z agarozo in jo nanesemo na objektno stekelce, katerega položimo v hladno raztopino za liziranje. Ta vsebuje visoko koncentracijo soli in detergentov (pH 10), kateri odstranijo celično vsebino, tako da ostane samo jedro z dodatno zvito DNK. Stekelca z geli nato prenesemo v alkalno raztopino (pH>13), kjer se DNK denaturira, odvije in izrazijo se enoverižni prelomi. Sledi elektroforeza v alkalnem okolju. Negativno nabita DNK v električnem polju potuje proti anodi. Po koncu elektroforeze stekelca prestavimo v raztopino za nevtralizacijo. Pomembno je, da so vse faze od liziranja celic naprej izvedene v temi in pri 4°C, da se izognemo dodatnim poškodbam DNK (povzeto po Žegura in Filipič, 2004). Sledi barvanje s fluorescenčnim barvilom (na primer etidijev bromid), ki omogoči vizualizacijo DNK s fluorescenčnim mikroskopom. Bolj poškodovana kot je DNK, manjši so njeni fragmenti, hitrejše bo njihovo potovanje po gelu proti anodi. Slike poškodovanih jeder so podobne kometom, saj manjši fragmenti v električnem polju priputujejo dalje kot pa nepoškodovana DNK (Slika 6). Za ovrednotenje poškodb uporabimo računalniško analizo slik posameznih jeder ozziroma kometov.

Pri kometih lahko izmerimo različne parametre, ki odražajo obseg poškodovanosti DNK:

- % DNK v repu (odstotek DNK, ki je prepotovala iz jedra v rep komet)
- dolžina repa kometa (prepotovana razdalja delcev DNK od glave do repa)
- različni momenti kometa (na primer razširjen moment, ki je produkt % DNK v repu in njegove dolžine)



Slika 6: Jedra celic HepG2 po testu komet

Jedra so pobarvana z etidijevim bromidom in slikana pri 400x povečavi. Na sliki A je nepoškodovano jedro kontrolne celice, slike B, C in D prikazujejo različno poškodovana jedra celic, ki so bile izpostavljene 25 µM B[a]P.

3.8.1 Priprava reagentov in raztopin za test komet

Agaroza

- 1 % NMP; agaroza z normalno točko tališča (iz ang. normal melting point)
- 1 % LMP; agaroza z nizko točko tališča (iz ang. low melting point)

10 mg/ml NMP in LMP agaroze smo ob mešanju in segrevanju v mikrovalovni pečici raztopili v 1x PBS. Po potrebi smo strjeno agarozo med poskusom ponovno segreli.

Raztopina za liziranje celic

- 2.5 M NaCl (146.4 g/l H₂O)
- 100 mM EDTA (37.2 g/l H₂O)
- 100 mM Tris (1.21 g/l H₂O)

Za vsak poskus smo pripravili svež raztopino, kateri smo uravnali pH vrednost na 10 z 10 M NaOH ali s HCl. Raztopino smo ohladili na 4°C in pred uporabo dodali 1% Triton X-100 ter dobro premešali.

Pufer za elektroforezo

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

Za vsak poskus smo pripravili svež pufer in ga do uporabe hranili pri 4°C.

Pufer za nevtralizacijo

- 0.4 M Tris (48.44 g/l H₂O)

Za vsak poskus smo pripravili svež pufer in uravnali pH na 7.5 z 10 M NaOH ali s HCl. Do uporabe smo ga hranili pri 4°C.

3.8.2 Alkalni test komet

3.8.2.1 Izvedba testa komet

Nasajanje celic HepG2

Ustrezno gostoto celic smo nasadili na ploščo z dvanajstimi luknjicami (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) in jih inkubirali 4 ure pri 37°C, pri 5 % CO₂ in v vlažni atmosferi, da so se celice prilepile na podlago. Nato smo gojišče zamenjali z raztopino vzorca (v gojišču ali v PBS). Po ustremnem času tretiranja smo gojišče ali raztopino odstranili, sprali celice z 1x PBS in dodali 0,1 % tripsin za HepG2 celice. Ko so se celice odlepile od podlage smo dodali sveže gojišče, kar je ustavilo delovanje tripsina. Suspenzijo celic smo odpipetirali v centrifugirke ter centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/min. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v svežem gojišču.

Priprava stekelc in nanos agaroze

Za test smo uporabili objektna stekelca peskana po celi površini (Gerhard Menzel Glasarbeitungswerk Braunschweig, Nemčija), katera so bila čez noč namočena v metanolu,

da so se razmastila. Pred uporabo smo stekelca posušili z obžiganjem. Na označena stekelca smo nanesli plast 1 % NMP agaroze, in sicer 2x po 80 µl, ter pokrili s krovnim stekelcem. Tako smo dobili dva gela. Objektno stekelce smo nato položili v hladilnik, dokler se agaroza ni strdila. Krovno stekelce smo odstranili tik pred nanosom druge plasti agaroze iz 1 % LMP agaroze in celične suspenzije. 30 µl celične suspenzije smo zmešali s 70 µl 1 % LMP agaroze in 70 µl te suspenzije nanesli na prvo plast agaroze na stekelcu ter ponovno pokrili s krovnim stekelcem. Objektnik smo ponovno položili v hladilnik, dokler se agaroza ni strdila. Takrat smo krovna stekelca previdno odstranili.

Liza

Pripravljena stekelca smo položili v raztopino za liziranje in jih pri 4°C in v temi inkubirali vsaj 60 minut.

Odvijanje DNK

Po liziranju smo stekelca prestavili v elektroforetsko kadičko. Zložili smo jih tesno skupaj in enako orientirane (del z gelom proti anodi). Da smo zagotovili homogenost električnega polja, smo prazna mesta zapolnili s stekelci. V kadičko smo dodali elektroforetski pufer, do približno 3 mm nad stekelci. Sledila je 20-minutna inkubacija pri 4°C v temi.

Elektroforeza

Po odvijanju smo stekelca izpostavili električnemu polju za 20 min pri napetosti 0,5-1 V/cm (nastavili smo napetost 25 V, tok pa je znašal približno 300 mA in se je uravnaval z volumnom pufra).

Nevtralizacija

Po elektroforezi smo stekelca prenesli v novo kadičko, v katero smo nalili hladen nevtralizacijski pufer (pH 7,5). Stekelca smo nevtralizirali pri 4°C v temi 15 min.

Shranjevanje stekelc

Stekelca smo položili v kadičko, v kateri smo na dno položili navlaženo stančevino. Kadičko smo pokrili z alu-folijo, jo zaprli v vrečko in shranili v hladilnik pri 4°C. Stekelca smo analizirali v roku enega tedna.

Barvanje

Tik pred mikroskopiranjem smo na vsak gel dodali 20 µl etidijevega bromida s koncentracijo 5 µg/ml ter ga pokrili s krovnim stekelcem.

Slikanje jeder celic

Slike kometov smo opazovali z mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescenčno svetlobo (Nikon HB-10104AF, Japonska) pri 400x povečavi (40x objektiv). Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515-560nm in barierni 590 nm.

Na vsakem objektnem stekelcu smo slikali po 50 jeder, pri čemer smo se izogibali robnim delom gela. Slike smo s kamero (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies, Velika Britanija) prenesli na računalnik in jih analizirali s pomočjo programa Comet Assay (Comet Assay IV, Perspective instruments, Velika Britanija). Program je izmeril več parametrov, za prikaz rezultatov pa smo izbrali % DNK v repu kometa. Rezultate smo obdelali s statističnim programom SigmaStat 3.11 (SPSS, Chicago, ZDA), kjer smo za analizo razlik med skupinami uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo vrednosti median % DNK v repu znotraj poskusov smo uporabili test Dunnet; $p<0,05$ smo določili kot statistično značilno razliko.

Vsako izvedbo testa smo ponovili v treh neodvisnih poskusih.

3.8.3 Določanje genotoksičnega delovanja RA in CONH s testom komet

Najprej smo določili, ali netoksične koncentracije izvlečkov RA in CONH delujejo genotoksično na celice HepG2 (ali povzročata prelome DNK celic HepG2).

Celice smo nasadili na ploščo z dvanajstimi luknjicami in ko so se prilepile na podlago, smo odstranili gojišče ter jih tretirali s svežim, ki je vsebovalo najvišjo netoksično koncentracijo vzorcev: RA 50 µg/ml in CONH 5 µg/ml. Ploščo smo inkubirali 21 ur (37°C , 5 % CO_2 , vlažna atmosfera). Negativno kontrolo smo tretirali samo z gojiščem, pozitivno kontrolo pa z 0,75 mM IQ. Po inkubaciji smo odstranili gojišče in celice sprali z 1x PBS. Nato smo pripravili celično suspenzijo in pričeli s testom komet (glej Izvedba testa komet).

3.8.4 Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH po izpostavitvi celic HepG2 tert-butil hidroperoksidu (t-BHP)

3.8.4.1 *Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH ob izpostavitvi celic HepG2 t-BHP po predhodnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH (predtretma)*

Celice smo nasadili na ploščo z dvanajstimi luknjicami in ko so se prilepile na podlagu, odstranili gojišče ter jih tretirali s svežim, ki je vsebovalo različne koncentracije vzorcev RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml). Negativno in pozitivno kontrolo smo tretirali samo s svežim gojiščem. Ploščo smo inkubirali 21 ur (37°C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). Po končani inkubaciji smo odstranili vzorce, celice sprali z 1x PBS. Nato smo za 20 minut v luknjice dodali v 1x PBS razredčen 0,5 mM t-BHP (v luknjico z negativno kontrolo smo dodali samo 1x PBS). Po 20-minutnem tretiranju smo vzorce odstranili, celice sprali z 1x PBS, pripravili celično suspenzijo in pričeli s testom komet (glej Izvedba testa komet).

3.8.4.2 *Ugotavljanje antiogenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH po hkratnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in t-BHP (kotretma)*

Celice smo nasadili na ploščo z dvanajstimi luknjicami in ko so se prilepile na podlagu, smo odstranili gojišče ter jih sprali z 1x PBS. Celice smo nato izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml), ki so bile pripravljene v 1x PBS v kombinaciji z 0.5 mM t-BHP. V luknjico z negativno kontrolo smo dodali samo 1x PBS, pozitivna kontrola pa je bil samo t-BHP (0.5 mM). Celice smo tretirali 20 minut, nakar smo vzorce odstranili, celice sprali z 1x PBS, pripravili celično suspenzijo in pričeli s testom komet (glej Izvedba testa komet).

3.8.4.3 Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH po predhodnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in po hkratnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in t-BHP (pred in kotretma)

Celice smo nasadili na ploščo z dvanajstimi luknjicami in ko so se prilepile na podlago, smo odstranili gojišče ter jih tretirali s svežim, ki je vsebovalo različne koncentracije RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml). Negativno in pozitivno kontrolo smo tretirali samo s svežim gojiščem. Ploščo smo inkubirali 21 ur (37°C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). Po končani inkubaciji smo odstranili vzorce in celice sprali z 1x PBS. Celice smo nato izpostavili različnim koncentracijam izvlečkov RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml), ki so bile pripravljene v 1x PBS v kombinaciji z 0.5 mM t-BHP. V luknjico z negativno kontrolo smo dodali samo 1x PBS, pozitivna kontrola pa je bil samo t-BHP (0.5 mM). Celice smo tretirali 20 minut, nakar smo vzorce odstranili, celice sprali z 1x PBS, pripravili celično suspenzijo in pričeli s testom komet (glej Izvedba testa komet).

3.8.5 Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH ob izpostavitvi celic HepG2 mutagenu B[a]P (kotretma)

Celice smo nasadili na ploščo z dvanajstimi luknjicami in ko so se prilepile na podlago, smo odstranili gojišče ter jih tretirali s svežim, ki je vsebovalo različne koncentracije RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml) v kombinaciji z B[a]P (končna koncentracija 40 µM). Negativno kontrolo smo tretirali samo s svežim gojiščem, pozitivno kontrolo pa samo z B[a]P (40 µM). Ploščo smo inkubirali 21 ur (37°C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). Po končani inkubaciji smo odstranili vzorce, celice sprali z 1x PBS, pripravili celično suspenzijo in pričeli s testom komet (glej Izvedba testa komet).

3.8.6 Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH ob izpostavitvi celic HepG2 mutagenu PhIP (kotretma)

Celice smo nasadili na ploščo z dvanajstimi luknjicami in ko so se prilepile na podlago, smo odstranili gojišče ter jih tretirali s svežim, ki je vsebovalo različne koncentracije RA

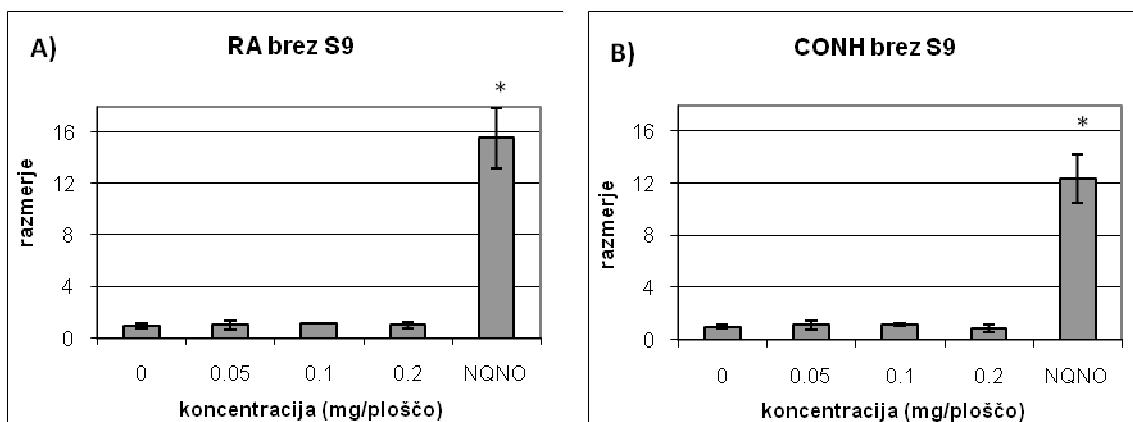
(0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml) v kombinaciji s PhIP (končna koncentracija 80 µM). Negativno kontrolo smo tretirali samo s svežim gojiščem, pozitivno kontrolo pa samo z PhIP (80 µM). Ploščo smo inkubirali 21 ur (37°C, 5 % CO₂, vlažna atmosfera). Po končani inkubaciji smo odstranili vzorce, celice sprali z 1x PBS, pripravili celično suspenzijo in pričeli s testom komet (glej Izvedba testa komet).

4 REZULTATI

V prvem delu diplomske naloge smo želeli preveriti ali izvlečka rožmarinske kisline (RA) in karnozola ter karnozojske kisline (CONH) delujeta mutageno na bakterije vrste *S. typhimurium*, sev TA98. Predvsem pa nas je zanimal njun antimutageni potencial.

4.1 Amesov test

Najprej smo z Amesovim testom ugotavljali potencialno mutageno delovanje izvlečkov RA in CONH. Bakterije vrste *S. typhimurium*, sev TA98, smo izpostavili delovanju različnih koncentracij RA (0, 0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) in CONH (0, 0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) v odsotnosti in prisotnosti metabolne aktivacije S9.

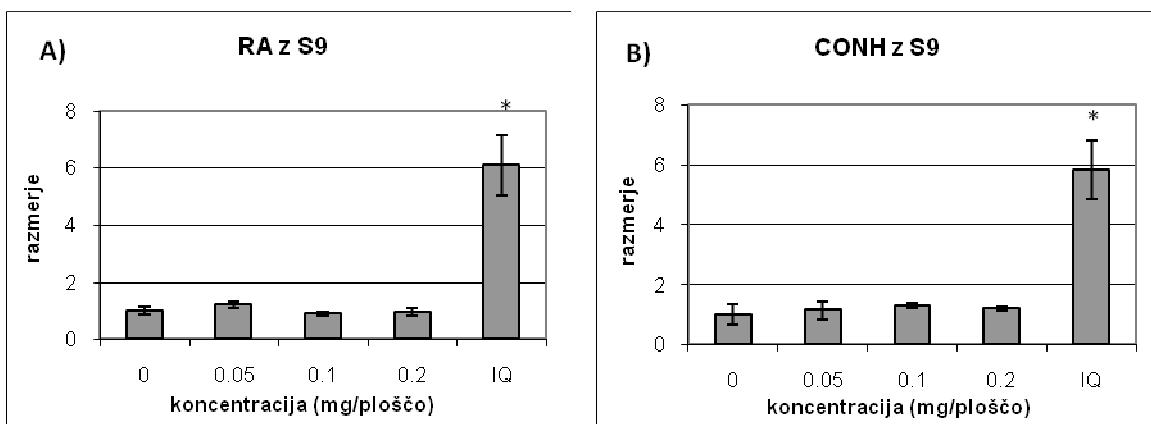


Slika 7: Relativno razmerje števila kolonij *S. typhimurium* seva TA98 (odnos med kontrolno skupino in skupinami tretiranimi z različnimi koncentracijami A) RA in B) CONH brez metabolne aktivacije)

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 smo izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) in CONH (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo). Za kontrolno skupino (koncentracija 0 mg/ploščo) smo namesto vzorca dodali sterilno vodo, za pozitivno kontrolo pa smo dodali 2-n-nonil-4-hidroksikvinolin *N*-oksid (NQNO) v koncentraciji 500 ng/ploščo. Vsaka koncentracija je bila testirana v treh paralelkah. Rezultati so prikazani kot relativno razmerje med številom spontanih revertant pri kontroli in vzorčni skupini \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (Studentov t-test, $p < 0.05$).

Različne koncentracije vzorcev RA in CONH brez metabolne aktivacije niso statistično značilno povečale števila revertant v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola 2-n-nonil-4-hidroksikvinolin *N*-oksid (NQNO 500 ng/ploščo) je inducirala statistično

značilno več revertant glede na kontrolno skupino in je povečala relativno razmerje med spontanimi in induciranimi revertanti za faktor 12 do 16 (Slika 7).

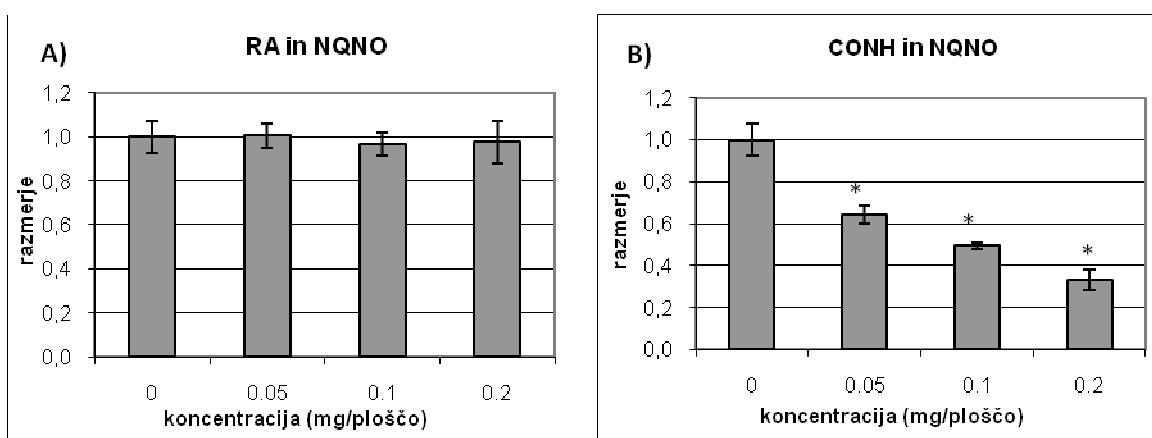


Slika 8: Relativno razmerje števila kolonij *S. typhimurium* seva TA98 (odnos med kontrolno skupino in skupinami tretiranimi z različnimi koncentracijami A) RA in B) CONH z metabolno aktivacijo)

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 smo izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) in CONH (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) ter mešanici za metabolno aktivacijo S9. Za kontrolno skupino (koncentracija 0 mg/ploščo) smo namesto vzorca dodali sterilno vodo, za pozitivno kontrolo pa smo dodali 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin (IQ) v koncentraciji 10 ng/ploščo. Vsaka koncentracija je bila testirana v treh paralelkah. Rezultati so prikazani kot relativno razmerje med številom spontanih revertant pri kontroli in vzorčni skupini \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (Studentov t-test, $p < 0.05$).

Različne koncentracije vzorcev RA in CONH z metabolno aktivacijo niso statistično značilno povečale števila revertant v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolin (IQ 10 ng/ploščo) je inducirala statistično značilno več revertantov glede na kontrolno skupino in je povečala relativno razmerje med spontanimi in induciranimi revertantami za faktor 6 (Slika 8).

Ugotovili smo, da RA in CONH pri nobeni testirani koncentraciji brez ali v prisotnosti metabolne frakcije S9 nista delovala mutageno na bakterijski testni sistem.

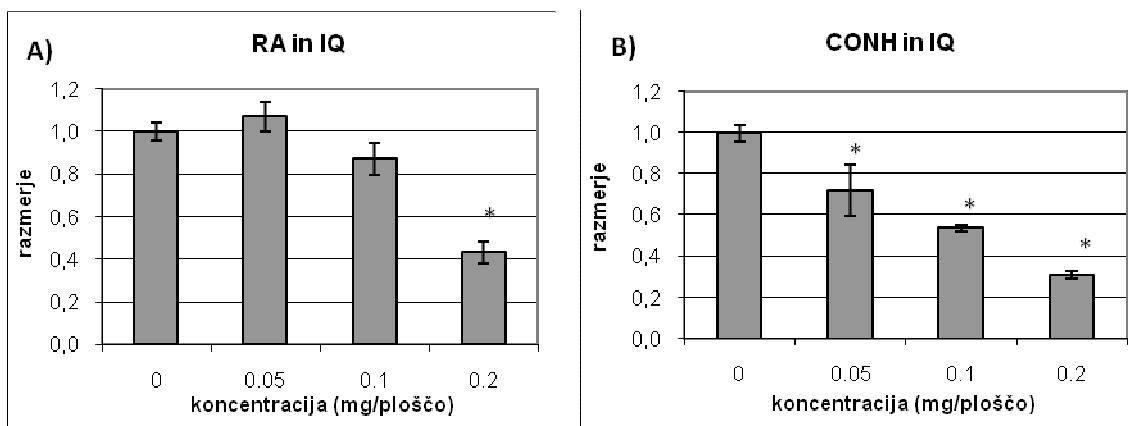


Slika 9: Relativno razmerje števila kolonij *S. typhimurium* seva TA98 zraslih na pločah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam vzorcev A) RA in B) CONH skupaj z mutagenom NQNO

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 z dodanim NQNO (500 ng/ploščo) smo izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) in CONH (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo). Skupina brez dodanega izvlečka je služila kot kontrola, saj je bila izpostavljena le mutagenu (NQNO). Vsaka koncentracija je bila testirana v treh paralelkah. Rezultati so prikazani kot relativno razmerje med številom spontanih revertant pri kontroli in vzorčni skupini \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (Studentov t-test, $p < 0.05$).

Nobena od testiranih koncentracij RA (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo), ni značilno znižala števila z NQNO induciranih revertant.

Izvleček CONH (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) je pri vseh koncentracijah statistično značilno znižal število z NQNO induciranih revertant. Število induciranih revertantov je bilo znižano v odvisnosti od koncentracije CONH, pri najnižji koncentraciji za okrog 40% in pri najvišji za več kot 60% (Slika 9).



Slika 10: Relativno razmerje števila kolonij *S. typhimurium* seva TA98 zraslih na pločah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam vzorcev A) RA in B) CONH skupaj z IQ

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 z dodanim IQ (10 ng/ploščo) smo izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) in CONH (0.05, 0.1 in 0.2 mg/ploščo) ter mešanici za metabolno aktivacijo S9. Skupina brez dodanega izvlečka je služila kot kontrola, saj je bila izpostavljena le mutagenu (IQ). Vsaka koncentracija je bila testirana v treh paralelkah. Rezultati so prikazani kot relativno razmerje med številom spontanih revertant pri kontroli in vzorčni skupini \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino (Studentov t-test, $p < 0.05$).

Izvleček RA je le pri najvišji koncentraciji (0.2 mg/ploščo) statistično značilno znižal število z IQ induciranih revertant, medtem ko nižje koncentracije niso povzročile statistično značilnega znižanja števila induciranih revertant.

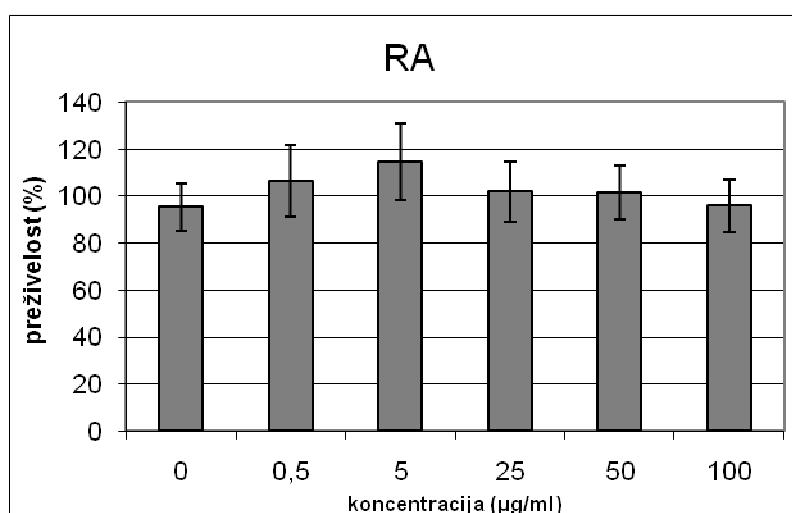
Izvleček CONH je pri vseh uporabljenih koncentracijah statistično značilno znižal število z IQ induciranih revertant. Zmanjšanje števila induciranih revertant je pokazalo koncentračijsko odvisnost. Pri najnižji koncentraciji je bilo število revertant zmanjšano za okrog 25% in pri najvišji za skoraj 70% (Slika 10).

Pri vseh opravljenih testih je bilo ozadje na pločah normalno (auksotrofne bakterije, ki so se delile le nekajkrat so bile enakomerno gosto prisotne na celi plošči), torej vzorca in mutagena na bakterije nista delovala toksično.

V drugem delu diplomske naloge smo ugotavljali potencialno citotoksično in genotoksično ter antioksidativno in antigenotoksično delovanje izvlečkov rožmarinske kisline (RA) in karnozola ter karnozojske kisline (CONH) na celični liniji humanega hepatoma, HepG2 celicah.

4.2 Test MTT

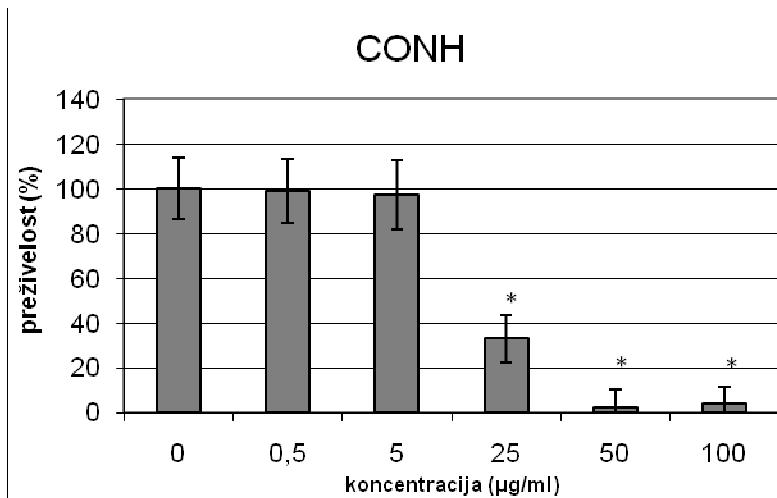
S testom MTT smo najprej želeli ugotoviti, ali vzorca RA in CONH delujeta citotoksično na HepG2 celice.



Slika 11: Določanje citotoksičnega delovanja vzorcev RA na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam RA (0.5, 5, 25, 50 in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Celice kontrole smo izpostavili le gojišču. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi RA glede na kontrolo \pm SD.

Pri testiranju različnih koncentracij vzorca RA (0.5, 5, 25, 50 in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) s testom MTT, smo ugotovili, da vzorec RA ni deloval citotoksično na celice HepG2 (Slika 11).



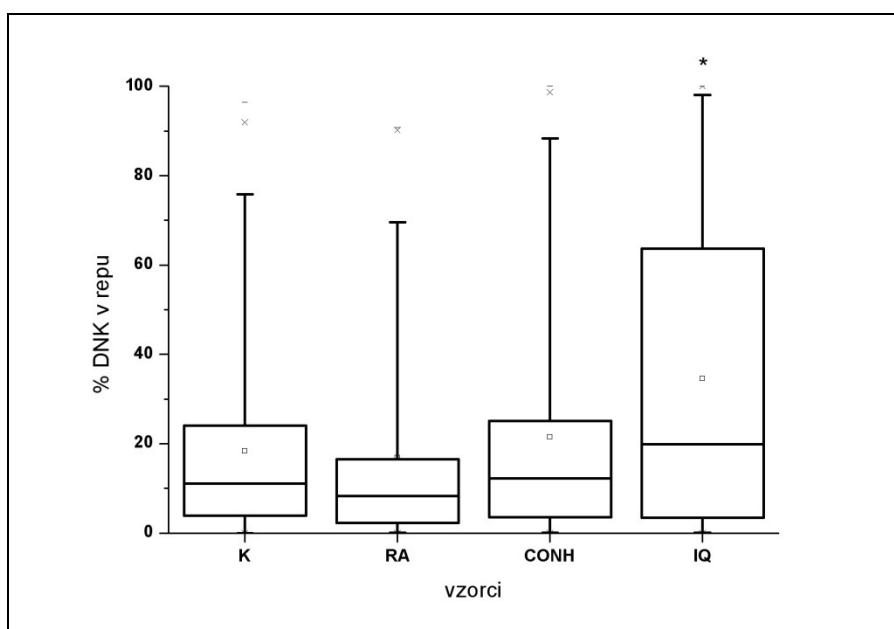
Slika 12: Določanje citotoksičnega delovanja vzorcev CONH na celicah HepG2 s testom MTT

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam CONH (0.5, 5, 25, 50 in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in nato ugotavljali živost celic s testom MTT. Celice kontrole smo izpostavili le gojišču. Rezultati so podani kot odstotek živih celic po izpostavitvi CONH glede na kontrolo \pm SD. * predstavlja statistično značilno razliko glede na kontrolno skupino ($p<0.05$).

Pri testiranju različnih koncentracij vzorca CONH s testom MTT smo ugotovili, da koncentracije 0.5 in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ne vplivajo na preživetje celic HepG2, medtem ko so višje koncentracije (25, 50 in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) statistično značilno znižale preživelost celic; pri 50 in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ za več kot 95% (Slika 12).

4.3 Genotoksičnost RA in CONH

Najprej smo želeli preveriti, ali najvišje koncentracije rožmarinske kisline (RA) in karnozola ter karnozajske kisline (CONH), ki pri testu MTT niso pokazale citotoksičnega delovanja na celice HepG2, same po sebi povzročajo poškodbe DNK.



Slika 13: Določanje genotoksičnega delovanja vzorcev RA in CONH na celicah HepG2 s testom komet

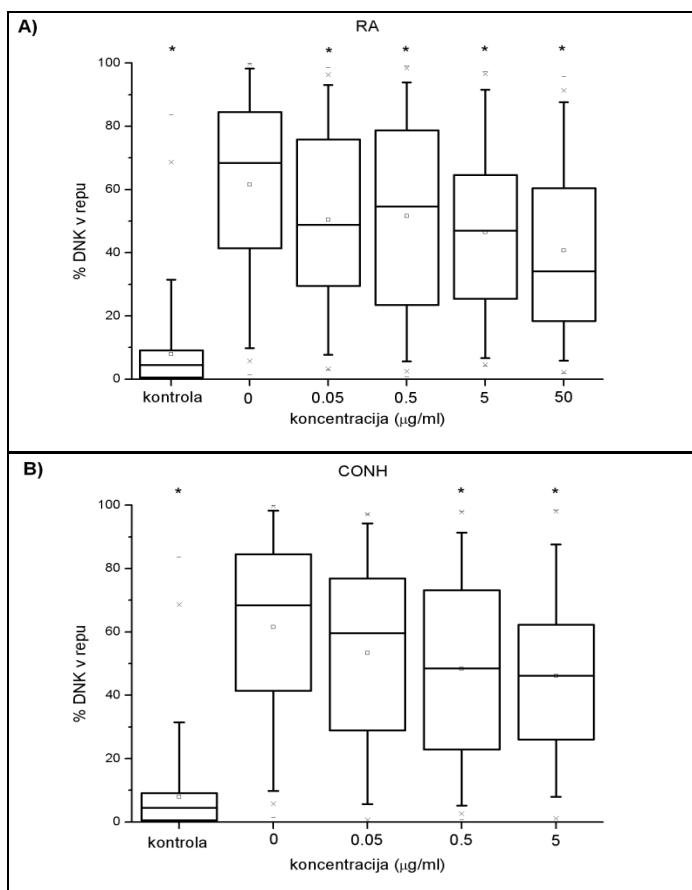
Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili najvišjim koncentracijam vzorcev RA ($50 \mu\text{g/ml}$) in CONH ($5 \mu\text{g/ml}$), ki na celice ne delujejo toksično. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celice kontrole (K) smo izpostavili samo gojišču, celice pozitivne kontrole pa 0.75 mM IQ. Celoten poskus smo ponovili 3x in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNK v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks, srednje vrednosti so prikazane kot kvadrati (*), maksimalne oziroma minimalne vrednosti kot -, 99% interval zaupanja pa kot x. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Kruskal Wallis test, $p < 0.05$).

Rezultati so pokazali, da najvišje necitotoksične koncentracije vzorcev niso povzročile statistično značilno povišanega števila prelomov DNK (niso bile genotoksične) v primerjavi z negativno kontrolo, medtem ko je IQ, ki je služil kot pozitivna kontrola, povzročil statistično značilno večje število prelomov DNK (Slika 13).

Pri nadalnjih poskusih ugotavljanja antigenotoksičnega delovanja RA in CONH smo uporabili koncentracije, ki niso citotoksične za HepG2 celice: RA: 0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml in CONH: 0.05, 0.5 in 5 µg/ml.

4.4 Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenimi s t-BHP (predtretma)

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml), nato smo gojišče zamenjali z 1x PBS, ki je vseboval *tert*-butil hidroperoksidom (t-BHP) s končno koncentracijo 0.5 mM in tretirali 20 minut.



Slika 14: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH ob izpostavitvi celic HepG2 oksidativnem agensu *tert*-butil hidroperoksidu (t-BHP) po predhodnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH (predtretma)

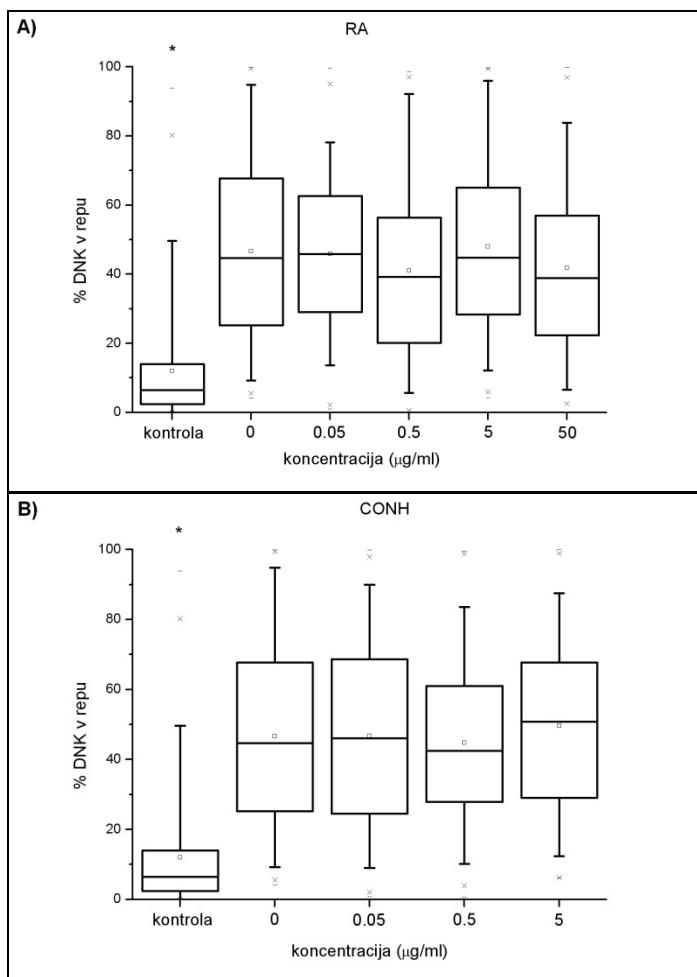
Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorcev RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml). Po inkubaciji smo celice za 20 minut izpostavili 0.5 mM t-BHP. Genotoksično delovanje smo ugotavljali s testom komet. Celice kontrole smo za 21 ur izpostavili samo gojišču, nato pa 20 minut 1x PBS pufru. Pozitivna kontrola (koncentracija 0 µg/ml) je bila 21 ur izpostavljena samo gojišču, nato pa 20 min t-BHP. Celoten poskus smo ponovili 3x in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNAK v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks, srednje vrednosti so prikazane kot kvadrati (□), maksimalne oziroma minimalne vrednosti kot –, 99% interval zaupanja pa kot x. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Kruskal Wallis test, p<0.05).

Rezultati so pokazali, da so pri poskusih, kjer smo celice HepG2 21 ur predtretirali z različnimi koncentracijami RA, vse testirane koncentracije RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) statistično značilno zmanjšale število poškodb, ki smo jih povzročili z oksidativnim agensom t-BHP.

Pri poskusih, kjer smo celice HepG2 21 ur predtretirali z različnimi koncentracijami CONH, sta koncentraciji 0.5 in 5 µg/ml statistično značilno zmanjšali število poškodb, ki smo jih povzročili s t-BHP. Pri koncentraciji 0.05 µg/ml nismo ugotovili statistično značilnega zmanjšanja poškodb DNK v primerjavi s pozitivno kontrolo (Slika 14).

4.5 Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenimi s t-BHP (kotretma)

Celice HepG2 smo za 20 minut izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml) skupaj z 0.5 mM t-BHP in tretirali 20 minut.



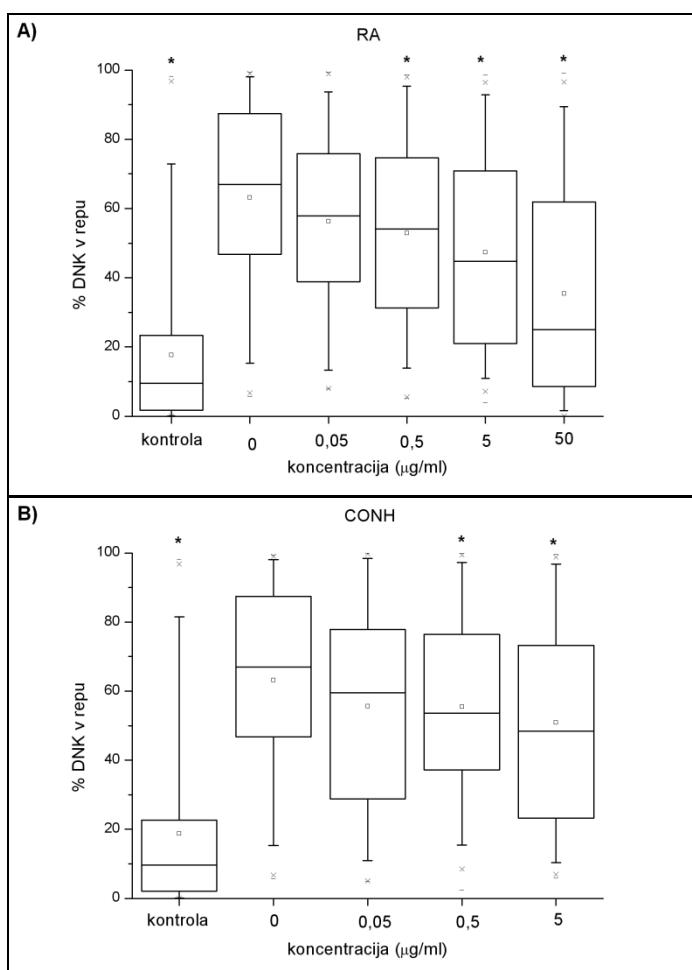
Slika 15: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH po hkratnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in t-BHP (kotretma)

Celice HepG2 smo za 20 minut izpostavili različnim koncentracijam vzorcev RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml) skupaj z 0.5 mM t-BHP. Celice kontrole smo za 20 ur izpostavljena samo t-BHP. Celoten poskus smo ponovili 3x in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNK v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks, srednje vrednosti so prikazane kot kvadrati (*), maksimalne oziroma minimalne vrednosti kot –, 99% interval zaupanja pa kot x. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Kruskal Wallis test, p<0.05).

V poskusih, kjer smo celice hkrati izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml) skupaj s t-BHP, smo ugotovili, da vzorca pri nobeni koncentraciji nista statistično značilno zmanjšala poškodb DNK, ki smo jih povzročili s t-BHP, v primerjavi s pozitivno kontrolo (Slika 15).

4.6 Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenim s t-BHP (pred- in kotretma)

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml). Nato smo gojišče zamenjali z gojiščem, ki je vsebovalo enake koncentracije RA in CONH kot tekom predtretiranja ter 0.5 mM t-BHP in tretirali še 20 minut.



Slika 16: Ugotavljanje antioksidativnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH po predhodnem tretiraju celic z RA oziroma s CONH in po hkratnem tretiraju celic z RA oziroma s CONH in t-BHP (pred in kotretma)

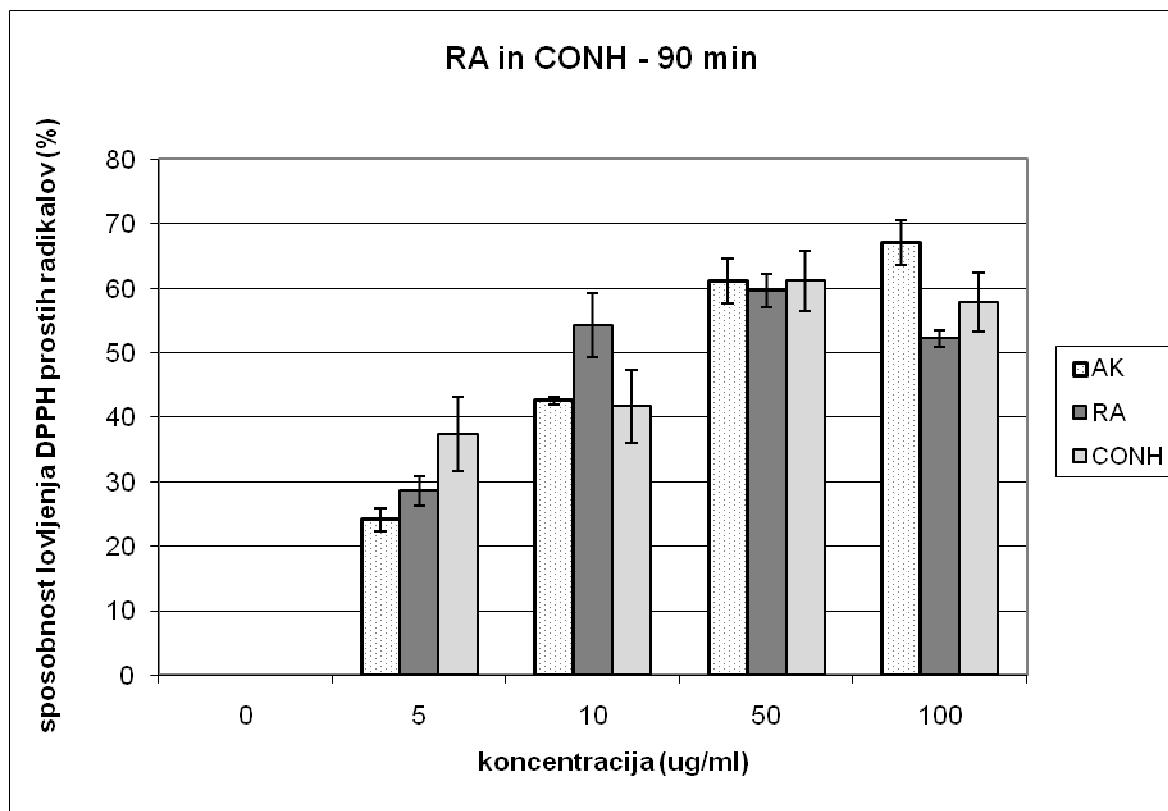
Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorcev RA (0.05, 0.5, 5 in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in CONH (0.05, 0.5 in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Po 21 urni inkubaciji smo celice HepG2 za 20 min izpostavili različnim koncentracijam vzorcev RA (0.05, 0.5, 5 in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in CONH (0.05, 0.5 in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) v kombinaciji z 0.5 mM t-BHP. Celice kontrole smo za 21 ur izpostavili samo gojišču in nato 20 minut 1x PBS pufru. Positivna kontrola (koncentracija 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) je bila 21 ur izpostavljena samo gojišču in nato 20 minut samo t-BHP. Celoten poskus smo ponovili 3x in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNK v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks, srednje vrednosti so prikazane kot kvadrati (□), maksimalne oziroma minimalne vrednosti kot -, 99% interval zaupanja pa kot x. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Kruskal Wallis test, $p < 0.05$).

Rezultati so pokazali, da so pri poskusih, kjer smo celice HepG2 21 ur predtretirali z različnimi koncentracijami RA in nato še 20 minut z vzorci v kombinaciji s t-BHP, koncentracije 0.5, 5 in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RA statistično značilno zmanjšale število poškodb, ki smo jih povzročili z oksidativnim agensom t-BHP, medtem ko najnižja koncentracija RA (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ni statistično značilno zmanjšala števila poškodb v primerjavi s pozitivno kontollo.

Pri poskusih, kjer smo celice HepG2 21 ur predtretirali z različnimi koncentracijami CONH in nato še 20 minut z vzorci v kombinaciji s t-BHP, sta koncentraciji 0.5 in 5 µg/ml CONH statistično značilno zmanjšali število poškodb, ki smo jih povzročili z oksidativnim agensom t-BHP, medtem ko najnižja koncentracija CONH (0.05 µg/ml) ni statistično značilno zmanjšala števila poškodb v primerjavi s pozitivno kontrolo (Slika 16).

4.7 Ugotavljanje delovanja izvlečkov RA in CONH kot lovilcev prostih radikalov (test DPPH)

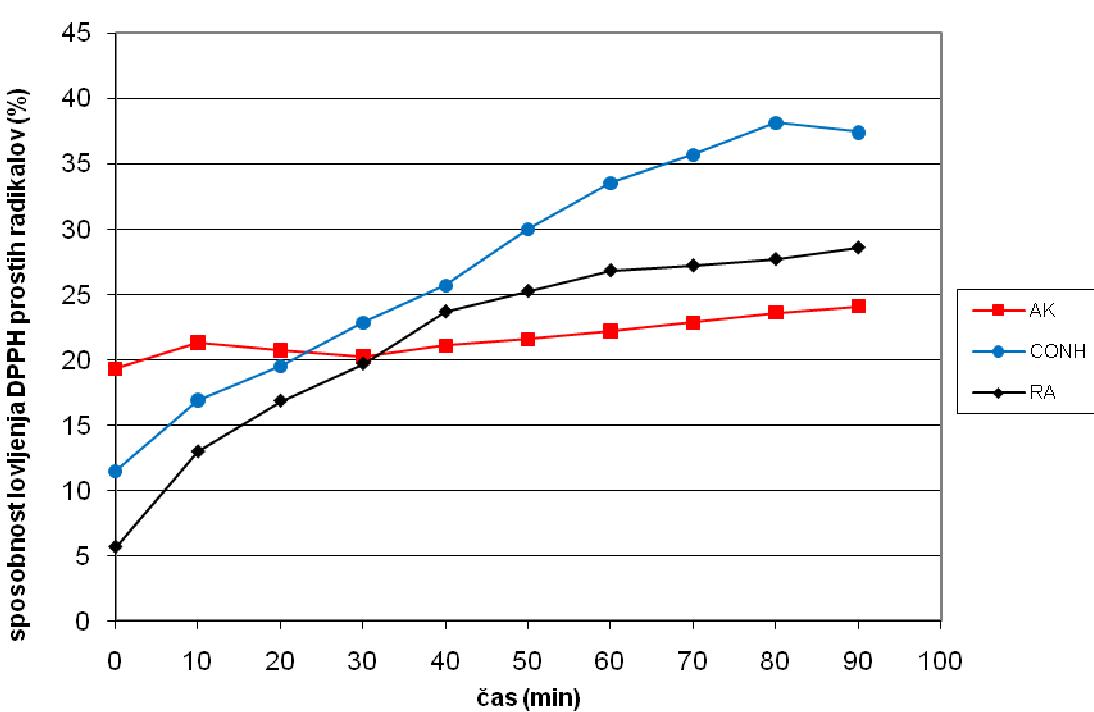
V testu DPPH smo kot pozitivno kontrolo uporabili askorbinsko kislino (AK), ki je znan antioksidativen agens in deluje kot lovilec prostih radikalov.



Slika 17: Ugotavljanje delovanja izvlečkov RA in CONH kot lovilcev prostih radikalov po 90 minutah

Na mikrotitersko ploščo smo v vsako luknjico nanesli 100 µl vzorcev RA in CONH (štiri različne koncentracije obeh izvlečkov: 0, 5, 10, 50 in 100 µg/ml; za koncentracijo 0 µg/ml smo namesto izvlečka dodali 100 µl 1x PBS) in 100 µl DPPH (300 µM v 99.8 % etanolu), ki je bil dodan tik pred začetkom merjenja. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili askorbinsko kislino (AK), v koncentracijah 0, 5, 10, 50 in 100 µg/ml (za koncentracijo 0 µg/ml smo namesto AK dodali 100 µl 1x PBS). Za slepo probo smo uporabili 100 µl etanola in 100 µl 1x PBS, brez dodatka DPPH. Vsako koncentracijo smo nanesli v pet luknjic. Tako po dodatku DPPH smo začeli meriti absorpcijo pri svetlobi valovne dolžine 515 nm. Reakcijo smo merili 90 minut v 10-minutnih intervalih. Prikazani so rezultati po 90 minutah ± SD.

Rezultati so pokazali, da sta RA in CONH učinkovita lovilca prostih radikalov, primerljiva z učinkovitostjo askorbinske kisline.



Slika 18: Sposobnost RA, CONH in AK (koncentracija 5 µg/ml) pri lovljenju DPPH prostih radikalov

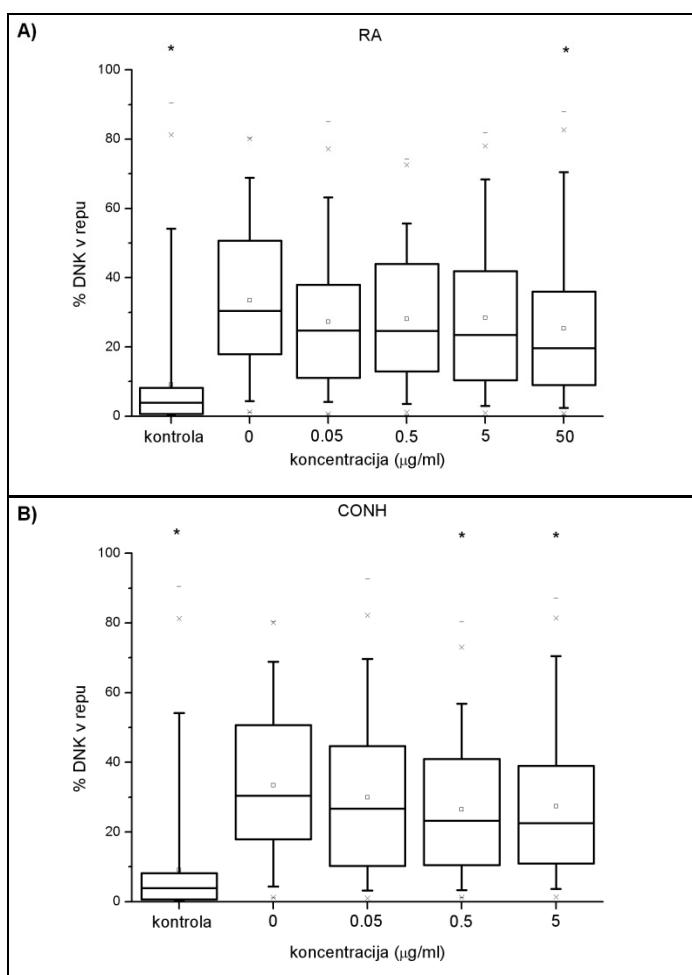
Na mikrotitersko ploščo smo v vsako luknjico nanesli 100 µl vzorcev RA in CONH (s koncentracijo 5 µg/ml) in 100 µl DPPH (300 µM v 99.8 % etanolu), ki je bil dodan tik pred začetkom merjenja. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili askorbinsko kislino (AK) v koncentraciji 5 µg/ml. Vsak vzorec smo nanesli v pet luknjic. Takoj po dodatu DPPH smo začeli meriti absorpcijo pri svetlobi valovne dolžine 515 nm. Reakcijo smo merili 90 minut v 10-minutnih intervalih. Graf prikazuje rezultate sposobnosti lovljenja DPPH prostih radikalov vzorcev RA, CONH ter pozitivne kontrole AK (vsi s koncentracijo 5 µg/ml) v odvisnosti od časa.

Rezultati so pokazali, da sta vzorca (RA in CONH) pri koncentraciji 5 µg/ml zmanjšala količino prostih radikalov v odvisnosti od časa.

4.8 Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti poškodbam DNK povzročenim z BaP in PhIP

V diplomski nalogi nas je zanimalo tudi, ali imata izvlečka RA in CONH poleg antigenotoksičnega potenciala zaradi antioksidativnega delovanja, tudi antigenotoksičen potencial proti delovanju prokarcinogenov: benzo[a]pirena (B[a]P) in 2-amino-1-metil-6-fenilimldazo[4,5-b]piridina (PhIP), ki povzročata poškodbe DNK, ki večinoma niso posledica tvorbe prostih radikalov.

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) in CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml) v kombinaciji s promutagenom B[a]P (40 µM).



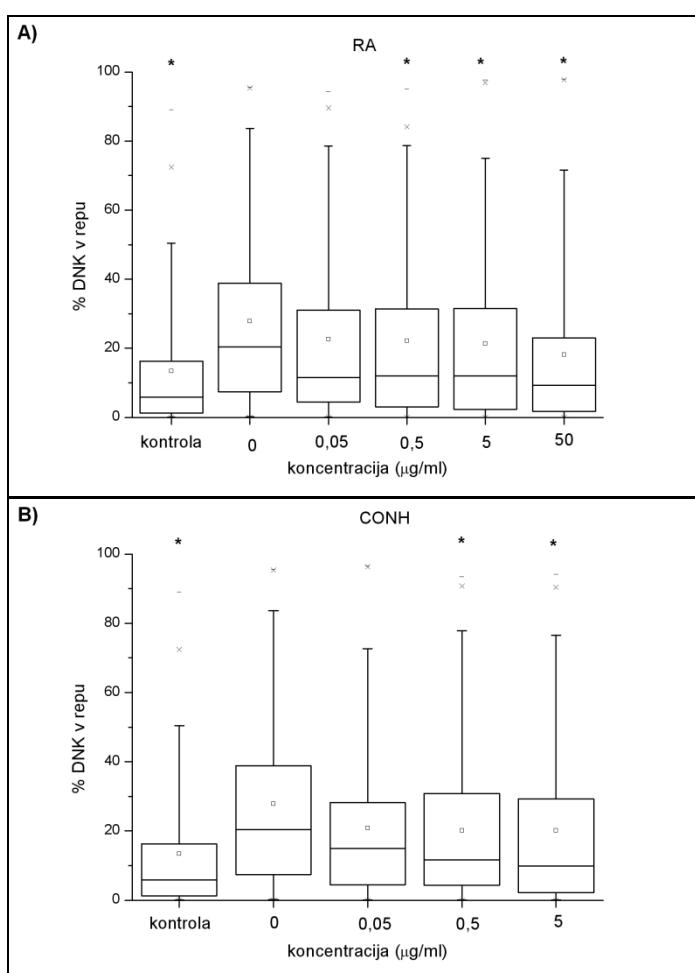
Slika 19: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH ob hkratnem tretiraju celic z RA oziroma s CONH in B[a]P

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorcev RA (0.05, 0.5, 5 in 50 µg/ml) ali CONH (0.05, 0.5 in 5 µg/ml) v kombinaciji z B[a]P (40 µM). Celice kontrole smo za 21 ur izpostavili samo gojišču. Pozitivna kontrola (koncentracija 0 µg/ml) je bila 21 ur izpostavljena gojišču s 40 µM B[a]P. Celoten poskus smo ponovili 3x in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNK v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks, srednje vrednosti so prikazane kot kvadrati (□), maksimalne oziroma minimalne vrednosti kot -, 99% interval zaupanja pa kot x. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Kruskal Wallis test, p<0.05).

Rezultati so pokazali, da je pri poskusih, kjer smo celice HepG2 21 ur izpostavljeni različnim koncentracijam RA skupaj s 40 µM B[a]P, le RA pri najvišji koncentraciji 50 µg/ml statistično značilno zmanjšala število prelomov DNK, ki smo jih povzročili z B[a]P. Pri poskusih, kjer smo celice HepG2 21 ur izpostavili različnim koncentracijam CONH skupaj s 40 µM B[a]P, sta koncentraciji 0.5 in 5 µg/ml statistično značilno zmanjšali število prelomov DNK, ki smo jih povzročili z mutagenom B[a]P. Pri koncentraciji 0.05

$\mu\text{g}/\text{ml}$ nismo ugotovili statistično značilnega zmanjšanja števila prelomov DNK v primerjavi s pozitivno kontrolo (Slika 19).

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam RA (0.05, 0.5, 5 in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in CONH (0.05, 0.5 in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) v kombinaciji z mutagenom PhIP (80 μM).



Slika 20: Ugotavljanje antigenotoksičnega delovanja vzorcev A) RA in B) CONH ob hkratnem tretiranju celic z RA oziroma s CONH in PhIP

Celice HepG2 smo za 21 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorcev RA (0.05, 0.5, 5 in 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ali CONH (0.05, 0.5 in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) skupaj s PhIP (80 μM). Celice kontrole smo za 21 ur izpostavili samo gojišču. Pozitivna kontrola (koncentracija 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) je bila 21 ur izpostavljena gojišču z 80 μM PhIP. Celoten poskus smo ponovili 3x in znotraj poskusa analizirali po 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNK v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Robovi boksa prikazujejo prvi in drugi interkvartilni razmik, mediana je črta, ki razmejuje boks, srednje vrednosti so prikazane kot kvadrati (□), maksimalne oziroma minimalne vrednosti kot –, 99% interval zaupanja pa kot x. Ročaji grafikona kvantilov predstavljajo 95-ti percentil; * statistično značilna razlika glede na kontrolno skupino (Kruskal Wallis test, $p < 0.05$).

Rezultati so pokazali, da je pri HepG2 celicah izpostavljenih 0.5, 5 in 50 µg/ml RA v kombinaciji z 80 µM PhIP statistično značilno zmanjšano število prelomov DNK, v primerjavi s pozitivno kontrolo izpostavljeni le PhIP. Najnižja koncentracija RA (0.05 µg/ml) ni statistično značilno zmanjšala števila prelomov DNK v primerjavi s pozitivno kontrolo.

Pri poskusih, kjer smo celice HepG2 21 ur izpostavili različnim koncentracijam CONH skupaj z 80 µM PhIP, sta koncentraciji 0.5 in 5 µg/ml statistično značilno zmanjšali poškodbe, ki smo jih povzročili z mutagenom PhIP. Pri koncentraciji 0.05 µg/ml nismo ugotovili statistično značilnega zmanjšanja poškodb DNK v primerjavi s pozitivno kontrolo (Slika 20).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

Rožmarinska kislina, karnozol in karnozojska kislina so aromatske spojine, ki jih najdemo pri nekaterih družinah rastlin, med drugim tudi v družini usnatic (*Lamiaceae*), kamor spada rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.). Te spojine so do sedaj pokazale svojo biološko aktivnost na mnogih področjih, kjer so ugotovili njihovo antioksidativno, protivnetno, antimutageno, antikarcinogeno, antibakterijsko in antivirusno delovanje. Razvoj mnogih bolezni pri človeku je povezan z oksidativnim stresom, proti kateremu igrajo pomembno vlogo antioksidanti, ki jih najdemo v hrani (na primer vitamin C, vitamin E in karotenoidi). Opazili so tudi, da imajo nekatere fenolne snovi celo močnejše antioksidativno delovanje kot vitamin C in vitamin E (Aljadi in Kamaruddin, 2004).

V diplomski nalogi smo žeeli oceniti delovanje dveh izvlečkov rožmarina. Prvi je vseboval rožmarinsko kislino (RA), drugi pa karnozol in karnozojsko kislino (CONH). Preverili smo njuno citotoksično, genotoksično, mutageno, antimutageno, antigenotoksično in antioksidativno delovanje.

Mutageno delovanje smo preverili z Amesovim testom. Pokazali smo, da ekstrakta RA in CONH do koncentracije 0.2 mg/ploščo (najvišja uporabljeni koncentraciji) na bakterije *Salmonella typhimurium*, sev TA98, nista delovala mutageno. Skupaj z metabolno aktivacijo izvlečka prav tako do koncentracije 0.2 mg/ploščo nista delovala mutageno, iz česar lahko povzamemo, da naša vzorca ne preideta v aktivno obliko po izpostavitvi z S9. V literaturi nismo zasledili drugih raziskav, ki bi preučevale mutagenost rožmarinske in karnozojske kisline ter karnozola.

Nato smo z Amesovim testom preverili še antimutageno delovanje izvlečkov na bakterije *Salmonella typhimurium*, sev TA98. Izvleček RA ni deloval antimutageno ob uporabi neposrednega mutagena NQNO, medtem ko je izvleček CONH pri vseh treh preizkušenih koncentracijah statistično značilno znižal število induciranih revertant. Ob uporabi posrednega mutagena IQ in metabolne aktivacije S9, sta oba izvlečka delovala

antimutageno, vendar izvleček RA le pri najvišji uporabljeni koncentraciji. Sklepamo lahko, da je delovanje izvlečkov RA in CONH različno, saj izvleček RA ni imel vpliva na neposreden mutagen NQNO, medtem ko je proti posrednemu mutagenu IQ pokazal učinek. V literaturi podatkov o antimutagenem delovanju rožmarinske kislina nismo zasledili, za karnozol in karnozojsko kislino pa so Minnunni in sod. (1992) pokazali antimutageno aktivnost na bakterijah *S. typhimurium* seva TA102, vendar pri oksidativnem stresu povzročenem s t-BHP in H₂O₂. Podatkov, da karnozol in karnozojska kislina inhibirata delovanje mutagenov, v literaturi nismo zasledili. Lahko pa omenimo, da so Edenharder in sod. (1997) opravili raziskave s podobnimi snovmi (flavonoidi), kjer so na bakterijah *S. typhimurium* seva TA98 pokazali antimutageno delovanje proti IQ pri šestnajstih različnih flavonoidih. Za metabolno aktivacijo so uporabili frakcijo S105, vendar je bil mehanizem inhibicije pri dvajsetih flavonoidih zelo podoben kot pri frakciji S9. Konkretnega mehanizma delovanja niso ponudili. Miranda in sod. (2000) so ugotovili, da ksantohumol, ki je prav tako flavonoid, pri bakteriji *S. typhimurium* TA98 deluje antimutageno proti IQ preko inhibicije aktivnosti citokroma P450. Tako lahko sklepamo, da izvlečka, ki smo jih uporabili, delujeta podobno, in sicer tako, da zavirata metabolno pretvorbo prokarcinogena v aktivno obliko.

V naši diplomski nalogi smo na celicah HepG2 s testom MTT ugotovili, da izvleček RA pri testiranih koncentracijah (do 100 µg/ml) ni vplival na preživetje celic. Sklepamo lahko, da tudi višje koncentracije ne delujejo citotoksično, saj sta Huang in Zheng (2006) pokazala, koncentracije do 400 µg/ml ne vplivajo na preživetje endotelnih celic. Izvleček CONH je deloval citotoksično pri koncentraciji 25 µg/ml, medtem ko koncentracija 5 µg/ml ni vplivala na preživetje HepG2 celic. Podobno so Dörrie in sod. (2001) ugotovili, da karnozol pri koncentraciji 9 µg/ml zniža viabilnost mononuklearnih krvnih celic, medtem ko pri koncentraciji 6 µg/ml znižanja viabilnosti niso opazili. Zanimivo pa je, da je karnozol pri koncentraciji 6 µg/ml po 24-urni izpostavitvi sprožil apoptozo celic pri B-povezanih levkemijah, in sicer preko vpliva na izražanje Bcl-2 proteina, ki sodeluje pri apoptizi. Aruoma in sod. (1996) so pokazali, da karnozol pri koncentraciji 8 µg/ml ni toksičen za C8166 človeške limfoblastidne celice. V poskusih, ki so jih opravili Visanji in sod. (2006) pa karnozol na celice Caco-2 ni deloval citotoksično pri koncentraciji 16.5

µg/ml. Seveda je potrebno ponovno omeniti, da izvleček CONH vsebuje poleg karnozola tudi karnozojsko kislino in zato primerjave samo s karnozolom niso popolnoma zanesljive.

Ugotavljali smo tudi, ali v brezceličnem mediju izvlečka RA in CONH delujeta kot lovilca prostih radikalov. Oba izvlečka sta dobro delovala kot lovilca prostih radikalov, saj smo ju lahko primerjali z učinkovitostjo askorbinske kisline, ki je znan antioksidant. Oba izvlečka sta pokazala izredno veliko sposobnost lovljenja DPPH radikala tudi prek daljšega časa, vendar se je po 90 minutah že opazilo nasičenje in zravnanje krivulje (Slika 18). Tudi Yesil Celiktas in sod. (2007) so z izvlečki, ki so vsebovali karnozol in karnozojsko kislino ugotovili visoko kapaciteto lovljenja prostih radikalov (najvišji uporabljeni koncentraciji sta bili 4 µg/ml za karnozol v kombinaciji s 25 µg/ml karnozojske kisline).

Znano je, da mnogi antioksidanti v hrani delujejo kot lovilci prostih radikalov in na tak način zmanjšajo poškodbe DNK (Sierens s sod., 2001). Antigenotoksično delovanje izvlečkov RA in CONH proti oksidativnim poškodbam smo testirali s testom komet na celični liniji humanega hepatoma (HepG2 celice). Test komet je preprosta in občutljiva tehnika za analizo poškodb DNK na nivoju posameznih celic. Znanstveniki so to metodo že velikokrat uporabili v študijah o učinkih reaktivnih kisikovih zvrsti na DNK ter o delovanju nekaterih naravnih antioksidantov.

Za testiranje antigenotoksičnega delovanja izvlečkov smo uporabili koncentracije, ki na celice HepG2 niso delovale citotoksično in genotoksično, kar smo predhodno določili s testom MTT in testom komet. Poškodbe DNK smo povzročili z oksidativnim agensom t-BHP (*tert*-butil-hidroperoksid), zaznali pa smo jih kot prelome DNK v repu kometov po elektroforezi. Oksidativno delovanje t-BHP je odvisno od reaktivnih kisikovih zvrsti, t-BHP radikalov in železovih ionov znotraj celice in vpliv na te dejavnike lahko zmanjša raven poškodb DNK (Lima s sod., 2006). Preveriti smo želeli, na kakšen način izvlečka delujeta antigenotoksično, zato smo v ločenih poskusih celice 1) izpostavili izvlečkoma (za 21 ur) ter nato za 20 minut t-BHP (predtretma), 2) za 20 minut samo skupaj izvlečkoma ter t-BHP (kotretma) in 3) izpostavili izvlečkoma (za 21 ur) ter nato za 20 minut skupaj izvlečkoma in t-BHP (pred- in kotretma).

V poskusih, kjer smo celice najprej izpostavili izvlečkoma ter nato t-BHP je izvleček RA, pri vseh uporabljenih koncentracijah, statistično značilno zmanjšal poškodbe DNK. Izvleček CONH je statistično značilno znižal poškodbe DNK pri koncentracijah 0.5 in 5 µg/ml, pri najnižji 0.05 µg/ml pa ne (Slika 14), kar kaže, da je nekoliko manj učinkovit od RA. Sklepamo lahko, da tekom predtretiranja RA in CONH vzpostavita zaščito, ki varuje celice proti kasnejši izpostavitvi oksidativnemu stresu. Možno razlago za ta pojav ponujajo Perez-Fons in sod. (2006), ki so pokazali, da diterpeni iz rožmarina utrdijo celično membrano, kar lahko pripomore k njihovi antioksidativni kapaciteti, saj je tako otežena difuzija prostih radikalov preko membrane. Ker so bile celice dlje časa (21 ur) izpostavljene izvlečkom, so ti lahko prešli tudi v notranjost celic. Fenolne spojine lahko vzdržujejo normalno raven reducirane glutatione (GSH) v celici, ki ob izpostavitvi t-BHP upade, kar povzroči celično smrt (Lima s sod., 2006). Iz tega lahko sklepamo, da sta izvlečka RA in CONH delovala antigenotoksično proti t-BHP z utrditvijo celične membrane kar je vplivalo na prehod t-BHP v celico, znotraj celic pa preko vpliva na GSH obvarovala celice pred oksidativnimi poškodbami s t-BHP.

V poskusih s testom DPPH smo ugotovili, da izvlečka RA in CONH delujeta kot dobra lovilca prostih radikalov, zato nas je zanimalo ali lahko celice neposredno zaščitita pred oksidativnim stresom, ki smo ga povzročili z oksidativnim agensom t-BHP. Rezultati, ki smo jih dobili pri naših pogojih izpostavitve celic, so pokazali, da izvlečka nista zaščitila celic. Razlog za to je verjetno ta, da se t-BHP, ki je analog vodikovega peroksida, v celici najprej pretvori v prosti radikal in šele nato povzroča poškodbe. Tako je verjetno čas, ki smo ga izbrali (20 minut) prekratek, da bi prišlo do pretvorbe t-BHP v radikal ter hkrati do zaščite DNK z izvlečkoma, ki smo jih po 20 minutah odstranili. V primeru, da bi podaljšali čas kotretmaja, bi morda dobili zaščiten učinek izvlečkov. Ta rezultat torej nakazuje na dejstvo, da izvlečka RA in CONH delujeta antigenotoksično v daljšem časovnem okvirju, kjer sprožita druge načine obrambe, ne le neposredno lovljenje prostih radikalov. Naša izvlečka spadata med fenolne substance, za katere je znano, da delujejo tudi kot kelatorji kovinskih ionov, ki so pomembni za oksidativno delovanje t-BHP. Znižanje količine kovinskih ionov bi tako lahko tudi zmanjšalo delovanje t-BHP (Rice-Evans s sod., 1996). V tako kratkem času (20 minut) pa izvlečka najverjetneje ne preideta v celice, kjer bi lahko s keliranjem železovih ionov znižala delovanje t-BHP (povzeto v Lima s sod., 2006). Prav

tako, v primeru da izvlečka ne prideta v celico, ne moreta vplivati na druge obrambne mehanizme, kot je na primer vzdrževanje normalnega nivoja GSH in povečanje aktivnosti glutation S-transferaze (Lima s sod., 2005).

V zadnjem delu diplomske naloge smo želeli ugotoviti, ali imata izvlečka RA in CONH antigenotoksičen učinek na celice HepG2, če jih izpostavimo delovanju okoljskega mutagena benzo[a]pirena (B[a]P) in prehrambenega mutagena 2-amino-1-metil-6-fenilimldazo[4,5-b]piridina (PhIP). Celice smo hkrati izpostavili izvlečkom in mutagenom za 21 ur (kotretma).

Oba izvlečka sta zmanjšala število poškodb DNK, povzročenih z mutagenom B[a]P. Tudi Offord in sod. (1997) so pokazali, da je izvleček rožmarina (oziroma njegove aktivne komponente, kot na primer karnozol) potencialen inhibitor tvorbe poškodb DNK povzročenih z B[a]P (deluje antikarcinogeno), in sicer preko vsaj dveh mehanizmov: (i) preko inhibicije metabolne aktivacije prokancerogenov z encimi faze I (citokrom P450); (ii) z indukcijo detoksifikacijske poti katalizirane z encimi faze II, kot je na primer glutation S-transferaza. Da rožmarinska kislina in karnozol stimulirata aktivnost encimov faze II (glutation S-transferaza, NAD(P)H kinon reduktaza) je pokazal tudi Singletary (1996). Najpomembnejši encim za pospeševanje z B[a]P inducirane karcinogeneze v jetrih je citokrom 1A1 (CYP1A1) (Drahushuk s sod., 1998). V primeru, da ga je v celicah malo, B[a]P z vezavo na receptor za aromatske ogljikovodike sproži prepis genov za CYP1A1. Miši z utišanim genom za ta receptor so bile odporne na nastanek kožnih tumorjev induciranih z B[a]P (Nebert s sod., 2004). Wen in sod. (2005) so pokazali, da pride do najvišjega nivoja povezovanja B[a]P z DNK pri celicah HepG2 po 6 urah od izpostavitve, prav tako pa po 6 urah pride do najvišje aktivnosti CYP1A1. Pokazali so tudi, da polifenol 5-hidroksi-7-metoksiflavon ($20 \mu\text{M}$) že ob 6-urnem kotretmaju učinkovito odstrani CYP1A1 protein, medtem ko nivo izražanja mRNK ostaja visok dlje časa (do 48 ur). Tsuji in Walle (2007) menita, da ob kotretmaju jetrnih celic postrvi s polifenoli in B[a]P pride do inhibicije CYP1A1 na ravni proteina, prav tako pa se prepreči vezava B[a]P na DNK. Zaključimo lahko, da naša izvlečka varujeta pred poškodbami DNK tako, da inhibirata aktivacijo B[a]P z zaviranjem aktivnosti ali izražanja CYP1A1 in s stimulacijo izražanja encimov faze II.

Izvlečka sta ob kotretmaju zmanjšala število poškodb DNK, povzročenih z mutagenom PhIP. Thomas in sod. (2006) so ugotovili, da se ob izpostavitvi celične linije MCF10A mutagenu PhIP poveča izražanje večjega števila genov za citokrome P450, med drugim tudi tistih, ki katalizirajo aktivacijo PhIP-a. Nozawa in sod. (2006) so ugotovili, da je liofilizirano pivo v kombinaciji z mutagenom PhIP povzročilo povečano aktivnost glutation S-transferaze v jetrih podgan in znižalo aktivnost citokroma 1A2 ter zmanjšalo število DNK aduktov. Tako lahko sklepamo, da izvlečka RA in CONH ščitita pred genotoksičnostjo PhIP tako, da stimulirata delovanje encimov faze II in/ali inhibirata delovanje encimov I faze (citokrom 1A2).

5.2 Sklepi

Na podlagi dobljenih rezultatov smo oblikovali naslednje sklepe:

- Izvleček karnozola in karnozojske kisline (CONH) je v testnem sistemu z bakterijo *Salmonella typhimurium*, sev TA98, pokazal močno antimutageno delovanje. V odvisnosti od koncentracije je znižal število revertant induciranih z neposrednim (4-nitrovinolin-N-oksid – NQNO) in posrednim (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-vinolin – IQ) mutagenom.
- Izvleček rožmarinske kisline (RA) je v testnem sistemu z bakterijo *S. typhimurium* TA 98 pokazal šibko antimutageno delovanje le proti posrednemu mutagenu IQ, medtem ko ni deloval antimutageno proti neposrednemu mutagenu NQNO.
- Za celice humanega hepatoma HepG2 je izvleček CONH bolj citotoksičen kot izvleček RA. Izvleček RA pri koncentracijah do 100 µg/ml ni deloval toksično, medtem ko je bil izvleček CONH toksičen že pri koncentraciji 25 µg/ml.
- RA in CONH sta v brezceličnem mediju delovala kot učinkovita lovilca prostih radikalov. Njuna učinkovitost je primerljiva z učinkovitostjo askorbinske kisline.
- Pri predtretmaju HepG2 celic sta oba izvlečka, RA in CONH, delovala antigenotoksično proti poškodbam DNK povzročenim z oksidativnim stresom, medtem ko pri kotretmaju nista bila učinkovita. To kaže, da je njuno antigenotoksično delovanje posledica preprečevanja vstopa oksidanta v celico in/ali vplivov na znotrajcelične antioksidativne procese.
- Oba izvlečka, RA in CONH, sta delovala antigenotoksično proti poškodbam DNK povzročenim z okoljskim mutagenom benzo[a]pirenom (B[a]P) in prehrambenim mutagenom 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridinom (PhIP). BaP in PhIP

sta posredna mutagena in sklepamo, da je mehanizem antigenotoksičnega delovanja verjetno povezan z vplivom na inhibicijo metabolne aktivacije teh mutagenov.

- Izvlečka rožmarina sta v naših raziskavah pokazala učinkovito zaščitno delovanje proti genotoksičnim učinkom oksidativnega stresa in posrednih mutagenov, kar kaže na njuno potencialno uporabo za razvoj prehranskih dodatkov ali pa farmacevtskih pripravkov z zaščitnim delovanjem proti nastanku raka.

6 POVZETEK (SUMMARY)

V organizmih se reaktivne kisikove zvrsti (ROS) tvorijo kot stranski produkt aerobnega metabolizma, nastajajo pa lahko tudi pod vplivom različnih drugih dejavnikov (na primer izpostavljenost onesnaženemu okolju, kajenje, infekcije...). Poleg tega smo ljudje in drugi organizmi v okolju izpostavljeni tudi številnim drugim mutagenim karcinogenom. Za široko izpostavljenost ljudi so med najpomebnnejšimi snovmi s takšnim delovanjem poliaromatski ogljikovodiki, ki nastajajo pri nepopolnem izgorevanju ter karcinogeni, ki nastajajo pri topotni obdelavi nekaterih živil. Aerobni organizmi, med njimi tudi ljudje, so tekom evolucije razvili mehanizme za zaščito pred škodljivimi vplivi ROS in mutagenov. V primeru, kadar obramba pred takšnim stresom odpove, lahko pri človeku pride do razvoja številnih degenerativnih bolezni, kot so rak, bolezni srca in ožilja. Negativen vpliv ROS in mutagenov lahko zmanjšamo z ustrezno prehrano, ki vsebuje antioksidativne in antigenotoksične učinkovine, kot na primer askorbinsko kislino ali flavonoide. Snovi z antioksidativnimi lastnostmi najdemo tudi v zdravilnih rastlinah, katere ljudje uporabljajo tudi v prehrani in ena izmed njih je rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.).

Rožmarin je olesenela zimzelena večletna rastlina, ki izvira iz južne Evrope in pripada družini usnatic (*Lamiaceae*). Vsebuje flavonoide, fenole, terpenoide in hlapna olja.

V diplomski nalogi smo ugotavljali antimutagene, antioksidativne in antigenotoksične lastnosti dveh izvlečkov iz rožmarina. Izvleček RA je vseboval rožmarinsko kislino, izvleček CONH pa karnozol in karnozojsko kislino. Poskusi za ugotavljanje antimutagenosti so potekali na bakterijah *Salmonella typhimurium*, sev TA98. Mutacije smo inducirali z dvema mutagenoma, 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kvinolinom (IQ) in 4-nitrokvinolin-N-oksidom (NQNO) ter z Amesovim testom spremljali antimutageno delovanje. Antigenotoksičnost smo testirali na celični liniji humanega hepatoma (HepG2 celice), ki ima ohranljivo metabolno aktivnost in ima aktivne encime I in II faze. S testom MTT smo preverili tudi citotoksičnost obeh izvlečkov za HepG2 celice. Poškodbe DNK smo povzročili z oksidativnim agensom t-BHP (*tert*-butil hidroperoksid) in z mutagenoma PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin) ter B[a]P (benzo[a]piren). Zaščitno delovanje izvlečkov smo spremljali s testom komet. Antioksidativno delovanje smo

preverili v brezceličnem testnem sistemu kot neposredno sposobnost lovljenja prostih radikalov s testom DPPH.

Rezultati Amesovega testa so pokazali, da izvleček CONH deluje antimutageno, saj je koncentracijsko odvisno znižal število z neposrednim in s posrednim mutagenom induciranih revertantov, medtem ko je izvleček RA pokazal zelo šibko antimutageno delovanje, saj je znižal število z IQ (posrednim mutagenom) induciranih revertantov, ne pa tudi revertantov povzročenih z neposrednim mutagenom NQNO.

S testom MTT smo določili najvišje necitotoksične koncentracije obeh izvlečkov za HepG2 celice, pri katerih smo nato ugotavljali antigenotoksično delovanje. RA pri koncentracijah do 100 µg/mL ni bil citotoksičen, medtem ko je bil CONH pri koncentracijah nad 25 µg/mL citotoksičen.

Antigenotoksično delovanje izvlečkov na HepG2 celice po oksidativnem stresu smo določali s tremi različnimi načini izpostavitve celic. Najprej smo celice predtretirali z izvlečkoma in jih nato izpostavili oksidativnemu stresu s t-BHP. V drugem poskusu smo celice hkrati izpostavili izvlečkoma in t-BHP. Zadnji tretma je obsegal tako predtretma z izvlečkoma kot tudi hkratno tretiranje z izvlečkoma in t-BHP. Oba izvlečka sta v poskusih, ki sta vključevala predtretma, celice zaščitila pred poškodbami DNK. Pri hkratnem tretiranju z izvlečki in t-BHP pa nismo zaznali antigenotoksičnega delovanja, verjetno zaradi kratkega časa inkubacije z izvlečki.

Test antioksidativnosti oziroma sposobnosti lovljenja prostih radikalov v brezceličnem mediju je pokazal, da sta oba izvlečka učinkovita lovilca prostih radikalov, saj je bilo njuno delovanje primerljivo z delovanjem znanega antioksidanta, askorbinske kisline.

Izvlečka sta pokazala antigenotoksično delovanje tudi proti poškodbam DNK povzročenim s pro-mutagenoma B[a]P ter PhIP.

Raziskava je pokazala, da imata izvlečka rožmarinske kisline antimutageni, antigenotoksični in antioksidativni potencial.

7 VIRI

Aden D. P., Vogel A., Plotkin S. Damjanov I., Knowless B. B. 1979. Controlled synthesis of HbsAg in different human liver carcinoma derived cell line. *Nature*, 282: 615-616

Aherne S. A., O'Brien N. M. 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against *tert*-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in CaCO-2 cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 6: 507-514

Aljadi A. M., Kamaruddin M.Y. 2004. Evaluation of the contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85: 513-518

Aruoma O. I., Spencer J. P. E., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell B. 1996. An Evaluation of the Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provençal Herbs. *Food and Chemical Toxicology*, 34: 449-456

Bailleul B., Daubersies P., Galiegue-Zouitina S., Loucheux-Lefebvre M.-H. 1989. Molecular basis of 4-Nitroquinoline 1-Oxide Carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80: 691-697

Balogh Z., Gray J. I., Gomaa E. A., Booren A. M. 2000. Formation and Inhibition of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Ground Beef Patties. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 395-401

Chen S.-Y., Wang L.-Y., Lunn R. M., Tsai W.-Y., Lee P.-H., Lee C.-S., Ahsan H., Zhang Y.-J., Chen C.-J., Santella R. M. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Int. J. Cancer*, 99: 14-21

Cheng K.-W., Chen F., Wang M. 2006. Heterocyclic amines: Chemistry and health. Mol. Nutr. Food Res., 50: 1150-1170

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

Dörrie J., Sapala K., Zunino S. J. 2001. Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. Cancer Letters, 170: 33-39

Drahushuk A. T., McGarrigle B. P., Larsen K. E., Stegeman J. J., Olson J. R. 1998.
Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut
liver slices incubated in dynamic organ culture. Carcinogenesis, 19, 8: 1361-1368

Edenharder R., Rauscher R., Platt K. L. 1997. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 379, 1: 21-32

Estévez M., Ramírez R., Ventanas S., Cava R. 2007. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. LWT, 40: 58-65

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

Felton J. S., Knize M.G., Michelle Bennett L., Malfatti M. A., Colvin M. E., Kulp K. S. 2004. Impact of environmental exposures on the mutagenicity/carcinogenicity of heterocyclic amines. Toxicology, 198: 135-145

Gheldorf N., Engeseth N. J. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3050-3055

Huang S.-C., Ho C.-T., Lin-Shiau S.-Y., Lin J.-K. 2005. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor kappaB and c-Jun. Biochemical Pharmacology, 69: 221–232

Huang S.-S., Zheng R.-L. 2006. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. Cancer Letters, 239: 271-280

Kim D.-S., Kim H.-R., Woo E.-R., Hong S.-T., Chae H.-J., Chae S.-W. 2005. Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. Biochemical Pharmacology, 70:1066-1078

Knasmüller S., Parcefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A. T. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutation Research, 402: 185-202

Lima C. F., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. 2006. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. Life Sciences, 79: 2056-2068

Lima C.F., Andrade P. B., Seabra R. M., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. 2005. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. Journal of Ethnopharmacology, 97: 383-389

Lo A.-H., Liang Y.-C., Lin-Shiau S.-Y., Ho C.-T., Lin J.-K. 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor κB in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23, 6: 983-991

Lopaczynski W., Zeisel S. H. 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*, 21: 295-307

Makino T., Ono T., Muso E., Yoshida H., Honda G., Sasayama S. 2000. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15: 1140-1145

Maron D. M., Ames B. N. 1984. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Handbook of mutagenicity test procedures*. 2nd edition (Kilbey B. J., Legator M., Nichols W. Ramel C.; Elsevier), 93-140

Mba Gachou C., Laget M., Guiraud-Dauriac H., De Me'o M., Elias R., Duménil G. 1999. The protective activity of α-hederine against H₂O₂ genotoxicity in HepG2 cells by alkaline comet assay. *Mutation Research*, 445: 9-20

Minnunni M., Wolleb U., Mueller O., Pfeifer A., Aeschbacher H. U. 1992. Natural antioxidants as inhibitors of oxygen species induced mutagenicity (abstract). *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 269, 2: 193-200

Miranda C. L., Yang Y.-H., Henderson M. C., Stevens J. F., Santana-Rios G., Deinzer M. L., Buhler D. R. 2000. Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4,5-F]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metabolism and Disposition*, 28: 1297-1302

Møller P., Wallin H. 1998. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutation Research*, 410: 271-290

Natarajan A. T., Darroudi F. 1991. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis*, 5: 399-403

Navodila 10G-Pos02-01, Ames (*S. typhimurium*). Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo. Pripravili Nataša Sever in dr. Bojana Žegura.

Navodila 10G-Pos03-01, MTT test. Laboratorij GEN, Nacionalni inštitut za biologijo. Pripravila dr. Bojana Žegura.

Nebert D. W., Dalton T. P., Okey A.B., Gonzalez F. J. 2004. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 23: 23847-23850

Ninomiya K., Matsuda H., Shimoda H., Nishida N., Kasajima N., Yoshino T., Morikawa T., Yoshikawa M. 2004. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 1943-1946

Nogala-Kalucka M., Korczak J., Dratwia M., Lampart-Szczapa E., Siger A., Buchowski M. 2005. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chemistry*, 93: 227-235

Nozawa H., Nakao W., Takata J., Arimoto-Kobayashi S., Kondo K. 2006. Inhibition of PhIP-induced mammary carcinogenesis in female rats by ingestion of freeze-dried beer. *Cancer Letters*, 235, 1: 121-129

Nunoshiba T., Demple B. 1993. Potent Intracellular Oxidative Stress Exerted by the Carcinogen 4-Nitroquinoline-*N*-oxide. *Cancer Research*, 53: 3250-3252

Offord E. A., Macé K., Avanti O., Pfeifer A. M. A. 1997. Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. *Cancer Letters*, 114: 275-281

Oluwatuyi M., Kaatz G. W., Gibbons S. 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65: 3249-3254

Östling O., Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 1: 291-298

Pérez-Fons L., Aranda F.J., Guillén J., Villalaín J., Micol V. 2006. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453: 224-236

Petersen M., Simmonds M. S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125

Psotova J., Svobodova A., Kolarova H., Walterova D. 2006. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84: 167-174

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 7: 933-956

Sanbongi C., Takano H., Osakabe N., Sasa N., Natsume M., Yanagisawa R., Inoue K.-I., Kato Y., Osawa T., Yoshikawa T. 2003. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 8: 1060-1069

Sierens J., Hartley J. A., Campbell M. J., Leathem A. J. C., Woodside J. V. 2001. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutation Research*, 485: 169-176

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. *Exp Cell Res*, 175: 184-191

Singletary K. W. 1996. Rosemary extract and carnosol stimulate rat liver glutathione-S-transferase and quinone reductase activities. *Cancer Letters*, 100:139-144

Singletary K., MacDonald C., Wallig M. 1996. Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Letters*, 104: 43-48

Slameňová D., Kubošková K., Horváthová E., Robichova S. 2002. Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Letters*, 177: 145–153

Sotelo-Félix J.I, Martinez-Fong D., Muriel P., Santillán R.L., Castillo D., Yahuaca P. 2002. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 145-154

Takeda H., Tsuji M., Inazu M., Egashira T., Matsumiya T. 2002. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology*, 449: 261– 267

Thomas R. D., Green M. R., Wilson C., Weckle A. L., Duanmu Z., Kocarek T. A., Runge-Morris M. 2006. Cytochrome P450 expression and metabolic activation of cooked food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in MCF10A breast epithelial cells. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 3: 204-216

Tian J., Jiang W. 2006. Rosmarinic acid inhibits acute renal injury and cyst formation in cisplatin-treated rat kidney. V: EUROTOX 2006/6 CTDC Congress. 43rd Congress of the European Societies of Toxicology & 6th Congress of Toxicology in Developing Countries. Dubrovnik/Cavtat, 20-24 sept. 2006. *Toxicology Letters*, 164, S1: S265

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A. Kobayshi H., Miyamae Y., Rajas E., Rju 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

Ticli F.K., Hage L. I. S., Cambraia R. S., Pereira P. S., Magro A. J., Fontes M. R. M., Stábeli R. G., Giglio J. R., França S. C., Soares A. M., Sampaio S. V. 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. Toxicon, 46: 318-327

Tsuji P. A., Walle T. 2007. Benzo[a]pyrene-induced cytochrome P450 1A and DNA binding in cultured trout hepatocytes—Inhibition by plant polyphenols. Chemico-Biological Interactions, 169: 25-31

Visanji J. M., Thompson D. G., Padfield P. J. 2006. Induction of G₂/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. Cancer Letters 237: 130-136

Wen X., Walle U. K., Walle T. 2005. 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. Carcinogenesis, 26, 4: 803-809

Yesil Celiktas O., Bedir E., Vardar Sukan F. 2007. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. Food Chemistry, 101, 4: 1457-1464

Žegura B., Filipič M. 2004. Application of in vitro comet assay for genotoxicity testing. V: Methods in pharmacology and toxicology optimization in drug discovery: In vitro methods. Yan Z., Caldwell G. W. (ur.). Totova, New Jersey, Humana press: 301-313

ZAHVALA

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

Hvala mentorici doc. dr. Metki Filipič za omogočeno opravljanje diplome na Nacionalnem inštitutu za biologijo ter za pregled diplomske naloge.

Hvala članici strokovne komisije prof. dr. Kristini Sepčić in predsednici komisije prof. dr Damjani Drobne za pregled diplomske naloge.

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

Hvala vsem prijateljem za nepozabna študentska leta.