

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja POŽIN

**ODZIVNOST RAZLIČNIH CELIČNIH LINIJ NA
TOKSIČNE IN GENOTOKSIČNE UČINKE
MODELNIH MUTAGENOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja POŽIN

**ODZIVNOST RAZLIČNIH CELIČNIH LINIJ NA TOKSIČNE IN
GENOTOKSIČNE UČINKE MODELNIH MUTAGENOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SENSITIVITY OF DIFFERENT CELL LINES TO TOXIC AND
GENOTOXIC EFFECT OF MODEL MUTAGENS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Danjana Drobne
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: Prof. dr. Kristina Sepčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora: 7.4.2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Požin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 57.083.36:575.224:615.277(043.2)=163.6
KG celične linije/ citotoksičnost/ genotoksičnost/ test MTT/ test komet/ karcinogeni/
jetrne celice/ mutageni
AV POŽIN, Mateja
SA FILIPIČ, Metka (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2009
IN ODZIVNOST RAZLIČNIH CELIČNIH LINIJ NA TOKSIČNE IN
GENOTOKSIČNE UČINKE MODELNIH MUTAGENOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 76 str., 1 pregl., 28 sl., 63 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Epidemiološke študije so pokazale, da prehrana in onesnaženost okolja zaradi prisotnosti genotoksičnih snovi povečujejo tveganje za nastanek raka pri ljudeh. Zaradi škodljivih vplivov teh snovi na človeka je pomembno, da tovrstne snovi pravočasno zaznamo, za kar so potrebni ustrezni testni sistemi. Proučevali smo občutljivost različnih, metabolno aktivnih humanih jetrnih celičnih linij, (HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2) in črevesne celične linije (CaCo2) za zaznavanje citotoksičnosti in genotoksičnosti znanih karcinogenov. Testirali smo heterociklične amine prehranskega izvora: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP), 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol (AαC) in 2-amino-3-metil-imidazo[4,5-f]quinolin (IQ), aromatski amin 2-acetilaminofluoren (2-AAF), poliaromatski ogljikovodik (benzo[a] piren (B(a)P), aflatoxin B1 (AFB₁) in alkilirajoči mutagen N-metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidin (MNNG). Vsi ti mutageni razen MNNG potrebujejo za izražanje svojih citotoksičnih in genotoksičnih lastnosti metabolno aktivacijo. Citotoksičnost smo preverjali z MTT testom po 20 urah izpostavljenosti celic različnim koncentracijam testnih snovi. Izmed heterocikličnih aminov je bil najmanj citotoksičen IQ, ki je pri 500 μM zmanjšal preživelost jetrnih celičnih linij za okrog 20%, medtem ko sta PhIP in AαC pri tej koncentraciji zmanjšala preživelost teh celic za 80%. Na preživelost CaCo2 celic je IQ ni vplival, PhIP pa je bil bolj citotoksičen kot AαC. 2-AFF je bil pri najvišji koncentraciji (160 μM) citotoksičen za HepG2, HepG2ECACC in CaCo2 celice. B(a)P in AFB₁ sta pokazala šibak citotoksičen učinek le pri HepG2ECACC celicah, medtem, ko MNNG ni bil citotoksičen. Genotoksičnost smo po 20 urah izpostavljenosti celic različnim koncentracijam testnih snovi določali s komet testom. IQ, PhIP, AαC ter 2-AAF niso pri necitotoksičnih koncentracijah niso povzročili povečanja poškodb DNA pri nobeni celični liniji. B(a)P in AFB₁ sta pri vseh koncentracijah pokazala izrazito povečanje poškodovanosti DNA pri vseh treh jetrnih celičnih linijah, medtem, ko sta pri CaCo2 celicah povzročila manjše povečanje poškodovanosti DNA le pri najvišji koncentraciji. Direktni mutagen MNNG je deloval genotoksično na vse celice. Raziskava je pokazala, različno občutljivost uporabljenih celičnih linij na citotoksične in genotoksične učinke različnih mutagenov. Jetrne celice HepG2 in HepG2ECACC so pokazale primerljivo občutljivost za zaznavanje B(a)P in AFB₁, HCC1.2 celice so bile manj občutljive, najmanj občutljive pa so bile CaCo2 celice. Genotoksičnosti HAA in 2-AFF s komet testom nismo zaznali zato menimo, da ni primeren za detekcijo genotoksičnosti tovrstnih spojin. HAA povzročajo adukte na DNA, ki jih je včasih težko zaznati z testom komet, zato bi bilo smiselno uporabiti še kakšno drugo testno metodo (npr. mikronukleus test).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 57.083.36.575.224.615.277(043.2)=163.6

CX cell lines/ cytotoxicity/ genotoxicity/ MTT assay/ comet assay/ liver cell lines/
carcinogens/ mutagens

AU POŽIN, Mateja

AA FILIPIČ, Metka (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2009

TI SENSITIVITY OF DIFFERENT CELL LINES ON TOXIC AND GENOTOXIC
EFFECTS OF MODEL MUTAGENS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 76 p., 1 tab., 28 fig., 63 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Epidemiological studies have shown that diet and polluted environment, because of genotoxicant, enhance the risk for cancer development. Because of their negative influence on human, it is important that we detect them in time. For this purpose we use the appropriate test systems. We investigated sensitivity of different metabolically active human liver cell lines (HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2) and colon cell line (Caco2), for detection of cytotoxicity and genotoxicity well known carcinogens. We tested food born heterocyclic amines: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC) in 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ), aromatic amine 2-acetylaminofluorene (2-AAF), poliaromatic hydrocarbon benzo[a] Pyrene (B(a)P), aflatoxin B1 (AFB₁) and alkylate mutagen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG). All of these mutagens, except MNNG, need metabolic activation to express their cytotoxicity and genotoxicity. Cytotoxicity we tested with MTT assay after 20 hours exposure of cells to different concentrations of tested mutagens. IQ was the least cytotoxic from heterocyclic amines, at 500 μM concentration decreases viability of liver cell lines for around 20%. At the same concentration PhIP in AαC decrease viability of these cell lines for 80%. On viability of Caco2 cells IQ had no influence, PhIP was more cytotoxic than AαC. 2-AAF was cytotoxic to HepG2, HepG2ECACC in Caco2 cells at the highest concentration (160 μM). B(a)P in AFB₁ showed slightly cytotoxic influence with HepG2ECACC cells, meanwhile MNNG was not cytotoxic.

We tested genotoxicity after 20 hours exposure of cells to different concentrations of tested mutagens with comet assay. Non cytotoxic concentrations of IQ, PhIP, AαC and 2-AAF didn't increase damage of DNA with none of tested cell lines. B(a)P and AFB₁ showed significant increase in damage of DNA with all three liver cell lines at all concentrations, but they slightly increase damage of DNA with Caco2 cells only at the highest concentration. Direct mutagen MNNG had genotoxic influence on all cells.

Our research showed different sensitivity of used cell lines on cytotoxic and genotoxic influence of different mutagens. Liver cells HepG2 and HepG2ECACC showed similar sensitivity for detection of B(a)P in AFB₁, HCC1.2 cells were less sensitive and the least were Caco2 cells. We didn't detect genotoxicity of HAA and 2-AAF with comet assay, so we believe that is not appropriate for detection of genotoxicity of these kind mutagens. HAA form adducts on DNA, which is sometimes difficult to detect with comet assay, therefore it would be proper to use also some other assay (e.g. micronucleus test).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 PREHRANA IN MUTAGENI	5
2.2 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI (HAA)	5
2.2.1 Metabolizem HAA	6
2.2.2 2-Amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolin (IQ)	7
2.2.3 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP)	8
2.2.4 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indole (AaC)	9
2.3 2-ACETILAMINO FLUOREN (2-AAF)	10
2.4 BENZO[A] PIREN (B(A)P)	11
2.5 AFLATOKSIN B ₁ (AFB ₁)	13
2.6 N-METIL-N'-NITRO-N-NITROZOGVANIDIN (MNNG)	15
2.7 CELIČNE LINIJE	16
2.7.1 HepG2	16
2.7.2 HCC-1.2	17
2.7.3 CaCo2	17
3 MATERIALI IN METODE DELA	18
3.1 KEMIKALJE	18
3.2 CELIČNE LINIJE	19
3.2.1 Gojenje celičnih linij HepG2 in HepG2FCACC	19
3.2.2 Gojenje celične linije HCC-1.2	20
3.2.3 Gojenje celične linije Caco2	20
3.3 TEST MTT	21
3.3.1 Določanje citotoksičnega delovanja mutagenih agensov na različne celične linije	21
3.4 TEST KOMET	22
3.4.1 Metodologija	24
3.4.1.1 Priprava raztopin za test komet	24
3.4.2 Potek testa komet	25
3.4.2.1 Priprava stekelc in nanos suspenzije tretiranih celic	25
3.4.2.2 Alkalna liza celic	25
3.4.2.3 Alkalno odvijanje DNA in elektroforeza	26
3.4.2.4 Nevtralizacija	26
3.4.2.5 Shranjevanje stekelc	26

3.4.2.6	Barvanje in slikanje jeder celic.....	26
3.4.2.7	Analiza slik in obdelava podatkov.....	27
3.4.3	Določanje genotoksičnega delovanja mutagenov na različne celične linije ...	27
4	REZULTATI.....	29
4.1	TEST MTT.....	29
4.1.1	Citotoksično delovanje IQ.....	29
4.1.2	Citotoksično delovanje PhIP.....	31
4.1.3	Citotoksično delovanje A \square C.....	33
4.1.4	Citotoksično delovanje 2-AAF.....	35
4.1.5	Citotoksično delovanja B(a)P.....	37
4.1.6	Citotoksično delovanje AFB ₁	39
4.1.7	Citotoksično delovanje MNNG.....	41
4.2	TEST KOMET.....	43
4.2.1	Genotoksično delovanje IQ.....	43
4.2.2	Genotoksično delovanje PHIP.....	45
4.2.3	Genotoksično delovanje A α C.....	47
4.2.4	Genotoksično delovanje 2-AAF.....	49
4.2.5	Genotoksično delovanje B(a)P.....	51
4.2.6	Genotoksično delovanje AFB ₁	53
4.2.7	Genotoksično delovanje MNNG.....	55
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	58
5.1	RAZPRAVA.....	58
5.1.1	Citotoksično delovanje mutagenov na različne celične linije.....	59
5.1.2	Genotoksično delovanje mutagenov na različne celične linije.....	61
5.2	SKLEPI.....	66
6	POVZETEK.....	68
7	VIRI.....	71

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv različnih koncentracij IQ na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.....	30
Slika 2: Vpliv različnih koncentracij IQ na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.....	31
Slika 3: Vpliv različnih koncentracij PhIP na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.....	32
Slika 4: Vpliv različnih koncentracij PhIP na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.....	33
Slika 5: Vpliv različnih koncentracij AαC na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.....	34
Slika 6: Vpliv različnih koncentracij AαC na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.....	35
Slika 7: Vpliv različnih koncentracij 2-AAF na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.....	36
Slika 8: Vpliv različnih koncentracij 2-AAF na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2 celic.....	37
Slika 9: Vpliv različnih koncentracij B(a)P na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.....	38
Slika 10: Vpliv različnih koncentracij B(a)P na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2 celic.....	39
Slika 11: Vpliv različnih koncentracij AFB ₁ na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.....	40
Slika 12: Vpliv različnih koncentracij AFB ₁ na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, Caco2 in HCC-1.2.....	41
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij MNNG na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.....	42
Slika 14: Vpliv različnih koncentracij MNNG na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.....	43
Slika 15: Vpliv različnih koncentracij IQ na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.....	44
Slika 16: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic IQ.....	45
Slika 17: Vpliv različnih koncentracij PhIP na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.....	46

Slika 18: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic IQ.....	47
Slika 19: Vpliv različnih koncentracij AcC na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.....	48
Slika 20: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic IQ.....	49
Slika 21: Vpliv različnih koncentracij 2-AAF na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.....	50
Slika 22: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic 2-AFF.....	51
Slika 23: Vpliv različnih koncentracij B(a)P na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.....	52
Slika 24: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic B(a)P.....	53
Slika 25: Vpliv različnih koncentracij AFB ₁ na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.....	54
Slika 26: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic AFB ₁	55
Slika 27: Vpliv različnih koncentracij MNNG na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.....	56
Slika 28: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic MNNG.....	57

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Kemikalije.....	18
---------------------------	----

OKRAJŠAVE

2-AAF	2-Acetilaminofluoren (2-Acetylaminofluorene)
AFB ₁	Aflatoksin B1 (Aflatoxin B1)
ALS	alkalno labilna mesta (alkali labile sites)
AaC	2-Amino-9H-pirido[2,3-b]indol (2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole)
B(a)P	Benzo[a] Piren (Benzo[a] Pyrene)
Caco2	celična linija humanega adenokarcinoma črevesa
CYP	citokrom P450 (cytochrome P450)
DMSO	dimetil sulfoksid (dimethylsulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSB	prelomi obeh verig DNA (double-strand breaks)
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EtBr	etidijev bromid (ethidium bromide)
FBS	serum govejega zarodka (foetal bovine serum)
GST	glutation-S-transferaza (glutathione-S-transferase)
HAA	heterociklični aromatski amini
HCC-1.2	celična linija primarnega humanega hepatoblastoma
HePG2	celična linija humanih jeternih celic
HePG2ECACC	celična linija humanih jeternih celic
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka (International Agency for imidazo[4,5-f]quinoline
IQ	2-Amino-3-metil-imidazo[4,5-f]quinolin (2-Amino-3-methyl-
LMP agaroz	agaroz z nižjo točko taljenja (low melting point agarose)
MNNG	N-Metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidin (N-Methyl-N'-nitro-N-
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid
NAT	N-acetiltransferaza (N-acetyltransferase)
NMP agaroz	nitrosogvanidin)
	agaroz z normalno temperaturo taljenja (normal melting point agarose)
OD	optična gostota (optical density)
PAH	policiklični aromatski hidrokarboni (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PBS	raztopina fosfatnega pufra (phosphate buffered saline)
	phenylimidazo[4,5-b]pyridine)
PhIP	2-Amino-1-metil-6-fenylimidazo[4,5-b]piridin (2-Amino-1-methyl-6- phenylimidazo[4,5-b]pyridine)
SCGE	gelska elektroforeza posameznih celic (single-cell gel electrophoresis)
SSB	prelomi ene verige DNA (single-strand DNA breaks)
SULT	sulfotransferaza (sulfotransferase)
UGT	UDP-glukuronoziltransferaza (UDP-glucuronosyl transferase)

1 UVOD

Izpostavljenost karcinogenim spojinam, ki so prisotne v okolju povečujejo tveganje za nastanek raka. Veliko okoljskih karcinogenov je genotoksičnih, kar pomeni da povzročajo spremembe v DNA, katerih posledice so mutacije genov ali poškodbe kromosomov. Mutacije tumor supresorskih genov, onkogenov in genov odgovornih za popravljanje poškodb DNA pa so povezane z nastankom raka. Zaradi tega je pomembno, da potencialne genotoksične karcinogene prepoznamo ter omejimo izpostavljenost ljudi.

Za ugotavljanje genotoksičnosti kemikalij se uporabljajo različni testni sistemi, kjer se kot testni organizmi uporabljajo bakterije, kvasovke in sesalske celične linije. Največ uporabljani je testni sistem s sevi bakterije *Salmonella typhimurium* (Ames test), ki ga je leta 1975 razvil Bruce Ames s katerim zaznavamo povratne mutacije (Ames in sod., 1975). S testnimi sistemi s sesalčimi celičnimi linijami zaznavamo kromosomske aberacije, mutacije in primarne poškodbe DNA. Znano je, da številne genotoksične snovi povzročijo poškodbe DNA in mutacije šele po metabolični aktivaciji v reaktivno nukleofilno obliko, ki je sposobna reagirati z molekulo DNA. Govorimo o posredno delujočih karcinogenih. Vendar tako bakterije, kot tudi večina sesalčjih celičnih linij, ki se uporabljajo za ugotavljanje genotoksičnosti nimajo izraženih presnovnih encimov. Da bi nadomestili to pomanjkljivost, se pri testiranju uporablja eksogena aktivacija, ki je navadno mikrosomska frakcija jeter podgan z dodanimi kofaktorji. Že dolgo je znano, da eksogena aktivacija slabo odraža metabolne procese, ki potekajo v intaktnih jetrih (Bigger in sod., 1980; Bos in sod., 1983; Ashby in sod., 1980; Tennant in sod., 1987). Zaradi tega se skuša razviti nove testne sisteme z metabolno aktivnimi indikatorskimi celicami (Rueff in sod., 1996). V osnovi obstajajo trije pristopi:

1. Uporaba primarnih kultur glodavskih ali človeških jetrnih celic (Brambilla in sod., 1990; Butterworth in sod., 1989; Muller-Teggethoff in sod., 1995). Vendar primarne hepatocite tekom kultiviranja v *in vitro* pogojih hitro zgubljajo sposobnost presnavljanja (Guguen-Guillouzo in Guillouzo, 1983). Poleg tega uporaba človeških jetrnih celic pogosto ni dovoljena zaradi zelo omejene razpoložljivosti biopsijskega tkiva.

2. Drug pristop je konstrukcija gensko spremenjenih celic, ki izražajo določene presnovne encime prve in druge faze presnove (Crespi, 1995). Te celice so se izkazale kot zelo primerne za raziskave mehanizmov metabolične aktivacije, medtem, ko za rutinsko testiranje neznanih kemikalij niso primerne, ker izražajo le omejeno število encimov.

3. Tretji pristop pa je izolacija trajnih celičnih linij, ki so ohranile sposobnost presnove. Večine teh celičnih linij izvira iz jetrnega tkiva, ki je najpomembnejši presnovni organ sesavcev. Nekateri raziskovalci so dobili zelo dobre rezultate z posredno delujočimi karcinogeni z uporabo glodavskih metabolo aktivnih celičnih linij (Roscher in Wiebel, 1988; Dean in sod., 1980; Dean in sod., 1983; Tong in sod., 1981; Tong in sod., 1984; Salvia in sod., 1988). Znano je, da se sposobnost metabolne aktivacije in specifičnost presnovnih encimov za različne substrate med različnimi vrstami močno razlikuje (Selkirk, 1977, Maslansky in Williams, 1982), zaradi tega, ima uporaba celičnih linije človeškega izvora prednost pri zaznavanju in ocenjevanju tveganja za zdravje ljudi.

Trenutno je najbolje raziskan celični sistem z metabolo aktivnimi celicami človeškega izvora sistem z celicami humanega hepatoma HepG2. Vendar je problem ta, da se te celice genotipsko zelo nestabilne in obstajajo številni kloni, za katere so raziskave pokazale, da so zelo različno občutljivi glede zaznavanja genotoksičnih učinkov posredno delujočih karcinogenov (Majer in sod., 2004). V prizadevanjih, da bi našli metabolo aktivno jetrno celično linijo človeškega izvora, ki bo manj genetsko nestabilna kot HepG2 celice so na Inštitutu za raziskave raka Medicinske Univerze na Dunaju nedavno izolirali novo jetrno celično linijo HCC1.2, za katero pa za sedaj še ni nikakršnih podatkov o njeni občutljivosti za zaznavanje genotoksičnih snovi. Pomemben del presnove poteka v črevesu, črevo pa je tudi tarča delovanja številnih karcinogenov. Zaradi tega je smiselno razviti tudi testne sisteme s črevesnimi celicami. Ene takih so celice CaCo2, ki so delno metabolo aktivne. Čeprav se v genetski toksikologiji ne uporabljajo veliko obstaja nekaj podatkov, da zaznavajo genotoksične učinke nekaterih posredno delujočih karcinogenov.

Epidemiološke raziskave kažejo, da ima v etiologiji raka ljudi prehrana veliko vlogo. Pri tem ima vlogo tudi prisotnost genotoksičnih karcinogenov. Najpomembnejši prehranski karcinogeni so heterociklični aromatski amini, ki nastajajo pri pečenju mesa in rib,

poliaromatski ogljikovodiki, ki so v hrani kot posledica onesnaženja okolja ter načina priprave hrane ter nekatera onesnažila, kot na primer mikotoksin aflatoksin B1, ki je eden najmočnejših jetrnih karcinogenov in je pogosto prisoten v plesnivih živilih. V tej raziskavi smo proučevali občutljivost različnih metabolno aktivnih celičnih linij: celice človeškega hepatoma HepG2 (dva subklona različnega izvora) in HCC1.2 ter človeške črevesne celice CaCo2 za zaznavanje genotoksičnosti različnih skupin prehranskih karcinogenov. Iz skupine heterocikličnih aminov smo izbrali 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP), 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol (AαC) in 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolin (IQ), iz skupine policikličnih aromatskih ogljikovodikov smo izbrali (benzo[a] piren (B(a)P) in iz skupine mikotoksinov aflatoksin B1 (AFB₁). Poleg tega smo izbrali še dva modelna karcinogena: posredno delujoč 2-acetilaminofluoren (2-AAF) in neposredno delujoč N-metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidin (MNNG).

Na osnovi dobljenih rezultatov ter rezultatov predhodnih raziskav bo mogoče oceniti uporabnost izbranih celičnih linij za rutinsko testiranje genotoksičnosti.

1.1 NAMEN DELA

Večina sesalskih celičnih linij v *in vitro* pogojih kultiviranja ne izraža presnovnih encimov, kar zmanjšuje njihovo uporabnost za ugotavljanje in raziskovanje mehanizmov genotoksičnega delovanja posredno delujočih karcinogenov. Celične linije primarnega človeškega hepatoblastoma HepG2 in HCC1.2 ter črevesnega karcinoma CaCo2, ki smo jih izbrali za našo raziskavo imajo delno ohranjeno presnovno aktivnost. V nalogi bomo raziskali odzivnost teh celic na citotoksično in genotoksično delovanje znanih genotoksičnih karcinogenov: PhIP, AaC, IQ, 2-AAF, B(a)P, AFB₁ in MNNG. Vsi izbrani karcinogeni razen MNNG za svoje delovanje potrebujejo metabolno aktivacijo z encimi kot so citokromi P450 (CYP), glutation-S-transferaze (GST), sulfotransferaze (SULT), N-acetiltransferaze (NAT) in UDP-glukuronosiltransferaze (UGT). Pri metabolni aktivaciji nastanejo metaboliti, ki tvorijo adukte na DNA in jo s tem poškodujejo. Mutageni tako vplivajo na tiste celice, pri katerih so ti encimi prisotni. Namen je ugotoviti ali so izbrane celične linije dovolj metabolno aktivne, da zaznajo genotoksične učinke posrednih mutagenov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREHRANA IN MUTAGENI

Epidemiološke raziskave kažejo, da prehrana igra glavno vlogo pri etiologiji raka ljudi. Precej dokazov je, da uživanje kontaminirane hrane ali vode, ki vsebuje npr. pesticide, težke kovine, mikrotoksine in druge primesi, ob hkratni prisotnosti prehranskih mutagenov (HAA, PAH) lahko poveča tveganje za nastanek raka. Mutageni, ki so prisotni v hrani so lahko direktni ali indirektni. Slednji potrebujejo za izražanje svojega biološkega vpliva metabolno aktivacijo.

2.2 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI (HAA)

V poznih 1970 letih je profesor Sigmura s sodelavci odkril prisotnost heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) v hrani. Nadaljne študije so pokazale da HAA nastajajo v glavnem pri pripravi mesa in rib, ki vsebujejo kreatin in ostale prekurzorje, amino kisline in sladkorje ali ostale aldehide. Več kot 25 HAA je bilo izoliranih iz različnih vzorcev hrane, določena pa je bila tudi njihova struktura (Cheng in sod., 2006).

HAA lahko delimo na dve skupini, na amino-imidazo-azarene (imidazo-quinolini, imidazo-quinoksalinini, imidazo-piridini) in amino-karbolini (pirido-indoli, pirido-imidazoli) (Skog in Solyakov, 2002). Amino-imidazo-azareni, ki vsebujejo N-metil-2 aminoimidazol, nastanejo z reakcijo piridinov ali pirazinov, ki so produkti toplotne degradacije amino kislin, s sladkorji in kreatinom, kar vodi do nastanka teh spojin. Kreatin, ki je prisoten v mesu mišic je glavni prekurzor nastanka teh spojin. Ti HAA nastajajo v mesu segretem na 150°C ali več (Skog in sod., 1998). Amino-karbolini (2-amino-9H-piridol[2,3-b]indol (AaC), 2-amino-3-metil-9H-piridol[2,3-b]indol (MeAaC), ter pirolizati glutaminske kisline in triptofana) nastajajo pri visokih temperaturah (> 250°C) s pirolizo proteinov in aminokislin (Matsumoto in sod., 1981). Amino-karbolini niso vezani na prekurzor kreatin in zato lahko nastanejo v hrani živalskega in rastlinskega izvora.

Genotoksičnosti HAA so prvič ugotovili z bakterijskim Amesovim testom. MeIQ, IQ in 8-MeIQx spadajo med najmočnejše bakterijske mutagene (Sigmura in sod., 2004, cit. po Turesky, 2007). Zanimivo je, da se mutagena aktivnost HAA pri evkariontskih sesalskih celicah ne ujema z njihovo mutageno aktivnostjo pri prokariontskih celicah. Na primer, PhIP, ki je pri bakterijskih celicah pokazal šibko mutagenost, je pri evkariontskih celicah pokazal močno aktivnost (Cheng in sod., 2006). Vsi HAA so indirektni mutageni, ki potrebujejo metabolno aktivacijo. Predvideva se, da so razlike med biološkimi vplivi HAA v različnih *in vitro* testih posledica različnih eksogenih in endogenih metabolnih aktivacijskih sistemov, različnih sposobnosti popravljanja DNA aduktov, različnih tarčnih zaporedij baznih parov in vpliva sosednjih baz na HAA-DNA lezije, kar vse vpliva na frekvenco mutacij (Turesky, 2007).

2.2.1 Metabolizem HAA

HAA potrebujejo za izražanje svojega biološkega vpliva metabolno pretvorbo. Jetra so najbolj aktiven organ, ki sodelujejo pri tem. Pri metabolizmu HAA sodelujejo encimi faze I in II. To so citokromi P450 (CYP), glutation-S-transferaze (GST), sulfotransferaze (SULT), N-acetiltansferaze (NAT) in UDP-glukuronosiltransferaze (UGT). Oksidacija HAA poteče v jetrih, kjer sodelujejo CYP. CYP1A2 bioaktivira HAA z N-oksidacijo eksociklične amino skupine pri čemer nastanejo genotoksični N-hidroksi-HAA metaboliti. CYP1A2 bioaktivira IQ, MeIQx in PhIP, vendar ne katalizira oksidacije (detoksikacijo) heteroaromatičnega sistema obročev. Za razliko od tega pa pri HAA, ki nastanejo s pirolizo (AαC in MeAαC) CYP1A2 in ostali CYP oksidirajo heteroaromatične obroče. CYP1A1 in 1B1 katalizirata N-oksidacijo HAA v ekstrahepatičnih tkivih. N-hidroksi-HAA metaboliti se lahko vežejo na DNA ali pa jih encimi faze II (v glavnem NAT, SULT) nadalje aktivirajo, da postanejo nestabilni estri in reagirajo z DNA v glavnem na C8 in N² atomu deoksigvanozina. NAT ima pomembno vlogo pri bioaktivaciji IQ, MeIQ in PhIP. Pri encimih faze II obstaja veliko genetskih polimorfizmov. Za večino N-hidroksi HAA substanzov je za bioaktivacijo NAT2 katalitično superioren od NAT1, vendar pa so N-hidroksi metaboliti PhIP in AαC aktivirani z obema oblikama. Med SULT, ki aktivirajo HAA je SULT1A1 najbolj aktivna oblika in katalizira bioaktivacijo kar nekaj HAA, med njimi tudi PhIP in N-hidroksi AαC (Turesky, 2007).

Nekateri elektrofilni N-hidroksi-HAA in estri N-hidroksi-HAA se lahko z glutationom (GSH) direktno reducirajo nazaj v prvotne amine ali pa preko katalizacije z GST, ki poteče verjetno preko formacije nestabilnih GSH konjugatov. N-hidroksi-HAA lahko reducira tudi NADPH odvisna reduktaza. K bioaktivaciji HAA pa lahko z oksidacijo eksocikličnih amino skupin prispevajo tudi peroksidaze in prostaglandin H sintaze (COX). SULT direktno konjugira eksociklično amino skupino IQ in MeIQx, kar vodi do nastanka stabilnih derivatov žveplove kisline.

Še ena pomembna metabolna pot, ki se pojavlja tudi pri ljudeh, je UGT-katalizirana glukuronizacija HAA in N-hidroksi-HAA metabolitov na eksocikličnih ali imidazolnih dušikovih atomih (Turesky, 2005). Poročano je bilo o kinetičnih parametrih različnih UGT, ki so odgovorni za glukuronizacijo N-hidroksi PhIP, med katerimi je najpomembnejši katalitsko aktiven protein UGT1A1 (Malfatti in Felton, 2004, cit. po Turesky, 2007).

Večina nastalih metbolitov HAA tvori adukte na DNA. Glavna reakcija pri kateri ti nastajajo je elektrofilni napad dušikovih ionov metabolitov HAA na gvaninske baze na N-2 in C-8 poziciji, kar lahko povzroči različne stopnje poškodovanosti DNA. V primeru IQ in 8-MeIQx, DNA adukti nastajajo tudi na N² skupini deoksivanosina in na C-5 atomu heterocikličnih obročev, kar nakazuje na delokalizacijo naboja dušikovega iona (Turesky in Vouros, 2004). Določanje tvorbe DNA aduktov se uporablja kot biomarker za oceno mutagenega in karcinogenega potenciala genotoksičnih kemikalij (Cheng in sod., 2006).

2.2.2 2-Amino-3-metil-imidazo[4,5-f]quinolin (IQ)

IQ uvrščamo v skupino amino-imidazo azarenov (AIA). To so HAA, ki vsebujejo N-metil-2 aminoimidazol. IQ nastaja pri pečenju rib in govedine, pirolizi proteinov, prisoten pa je tudi v komercialnih govejih ekstraktih (IQ..., 1997). IARC (angl. International Agency for Research on Cancer) je IQ zaradi nezadostnih dokazov o karcinogenosti za ljudi in zadostnih dokazov o karcinogenosti za poskusne živali označila kot verjetno karcinogenega ljudem in ga uvrstila v skupino verjetnih karcinogenov za ljudi - 2A (angl. Group 2A: probably carcinogenic to humans).

IQ je močan jetrni karcinogen tudi pri ne-humanih primatih. V večletnem tretiranju pride do nastanka tumorja, zaradi česar je ta spojina ena izmed najmočnejših karcinogenov testiranih pri ne-humanih primatih (Turesky, 2007).

V gojenih sesalskih celicah so AIA povzročili mutacije, kromosomske aberacije, zamenjava sestrskih kromatid in povečano popravljanje poškodb DNA in prelomi verige DNA (Schut in Snyderwine, 1999). S CHO celicami (angl. Chinese hamster ovary cells) so ugotovili, da IQ najbolj pogosto povzroča enobazne tranzverzije, v glavnem GC→TA (Cheng in sod., 2006). Ker je IQ indirektni mutagen, potrebuje za svojo aktivnost metabolno aktivacijo (glej Metabolizem HAA) in kot ostali HAA tudi ta mutagen povzroča adukte na DNA, poleg tega pa tvori adukte tudi z proteini.

2.2.3 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP)

PhIP je najpogostejši HAA prisoten v hrani, ki naj bi lažje nastajal pri pripravi piščančjega mesa kot pa pri pripravi govedine, prašičjega mesa ali rib (Skog in Solyakov, 2002). PhIP je mutagen v bakterijskih testih in v genotoksikoloških testih na sesalskih celicah, pri podganah pa je bilo dokazano, da izpostavljenost visokim dozam povzroča tumorje na črevesu, prostati in prsih (Chepanoske in sod., 2004). IARC ga je uvrstila v skupino možnih karcinogenov za ljudi - 2B (angl. Group 2B: possibly carcinogenic to humans) (PhIP..., 1997).

Kot vsi indirektni mutageni tudi PhIP potrebuje za svojo aktivnost metabolno aktivacijo (glej Metabolizem HAA). Reaktivni metaboliti, ki nastanejo pri tem se lahko kovalentno vežejo na DNA in proteine. Po izpostavitvi kemičnim karcinogenom nastanejo proteinski adukti in dajo kvantitativno mero interne doze, pa tudi kapaciteto posameznika za bioaktivacijo karcinogena (Skipper in sod., 1994, cit. po Chepanoske in sod., 2004). Ta mutagen povzroči fundamentalne spremembe v biokemiji celice, ki se kaže v različnem izražanju genov. Izgleda da začetne posledice izpostavitvi aktiviranemu PhIP vključujejo poškodbe DNA, celice, ki pa preživijo te zgodnje dogodke ohranijo okvarjen set genov, kar vodi do njihove apoptoze ali preživetja z mutiranim genomom (Gooderham in sod., 2007).

PhIP je najpogostejši HAA prisoten v hrani. Augustsson in sod. (1997) in Zimmerli in sod (2001) so izračunali, da dnevni vnos pri človeku znaša od 0.07-4.3 ng/kg telesne mase (Durling in Abramsson-Zetterberg, 2005). Laytona in sod. (1995), pa so ocenili da dnevni vnos znaša od <1 do 17 ng/kg telesne mase. Pri teh realnih prehranskih vrednostih mutagenosti PhIP ne moremo dokazati z konvencionalnimi testi, vendar ima PhIP kljub temu potencial, da ima genotoksične vplive pri ljudeh, kar je potrdila tudi detekcija PhIP-DNA aduktov v vzorcih mlečnih žlez. (Gooderham in sod., 2007). Karakteristike mutacij, ki jih povzročajo HAA v sesalskih celicah so preučevali na različnih genih, npr. na hprt (angl. hipoxantine-guanine-phosphoribosyl transferase). S CHO (angl. Chinese hamster ovary cells) in humanimi limfoblastoidnimi celicami so ugotovili, da PhIP povzroča enobazne tranzverzije, med katerimi je najbolj pogosta GC→TA, prisotni pa sta tudi AT→TA in CG→AT tranzverzija. (Cheng in sod., 2006).

Lauber in sod. (2004) so dokazali, da ima PhIP pri nizkih koncentracijah (10^{-9} M- 10^{-11} M) estrogene lastnosti in lahko povzroči mitogeni odgovor. Ker uživanje mesa lahko vodi do koncentriranja PhIP v telesnih tekočinah, pa obstaja možnost da so nizke doze PhIP estrogene in mitogene tudi pri človeku. (Gooderham in sod., 2007).

2.2.4 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indole (AαC)

AαC je mutagen in karcinogen HAA in ga uvrščamo v skupino amino-karbolinov. Tako AαC kot njegov metilni homolog 2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol (MeAαC) sta pogosto označena kot α-karbolina (angl. α-carbolines) in klasificirana kot nepolarna heterociklična aromatska amina (Frederiksen in Frandsen, 2004).

AαC je prisoten v različni pečeni hrani, proteinskih produktih pirolize in cigaretnemu dimu, zaradi česar je zelo možna splošna izpostavljenost ljudi tej spojini (AαC..., 1998). Prisotnost AαC v prehranskih produktih so raziskali Knize (1997) in Skog in Sofyakov (2002). Matsumoto in sod. (1981) in Manabe in sod. (1990) pa so raziskali prisotnost amino-α-karbolinov v cigaretnem dimu.

IARC je na osnovi zadostnih dokazov o karcinogenosti AαC eksperimentalnim živalim in nobenih dokazov o karcinogenosti ljudem, uvrstila AαC v skupino možnih karcinogenov za ljudi 2B (angl. Group 2B: possibly carcinogenic to humans) (AαC..., 1998).

Ta mutagen je prokarcinogen in za svojo aktivnost potrebuje metabolno aktivacijo (glej Metabolizem HAA). Človeški CYP1A2 aktivira približno 27% AαC, pri tem pa nastanejo N²-OH derivati. Aktivirani heterociklični amini lahko tvorijo adukte z makromolekulami kot so proteini in DNA. Raziskan je bil *in vitro* metabolizem AαC pri človeških in glodalčjih hepatičnih mikrosomih, karakterizirani pa so bili tudi nekateri glavni metaboliti. Frederiksen in Frandsen (2002) sta raziskala in primerjala *in vitro* metabolizem AαC v hepatičnih mikrosomih podgan in ljudi. Ugotovila sta, da pri metabolizmu AαC nastaneta dva glavna in trije manjši detoksifikacijski metaboliti, del AαC pa je bil aktiviran v N²-OH derivat. Pri človeških mikrosomih je bil glavni del metabolitov (60%) aktiviran in so delno tvorili dimere in proteinske adukte (Frederiksen in Frandsen, 2004)

Medtem ko je bil *in vitro* metabolizem AαC dobro raziskan, pa obstaja le nekaj *in vivo* študij, ki so osredotočene na tvorbo DNA aduktov. To so raziskali Zangh in sod. (1996) in Oghaki in sod. (1984) (Frederiksen in Frandsen, 2004).

2.3 2-ACETILAMINO FLUOREN (2-AAF)

2-AFF je karcinogen za živali in se uporablja le kot pozitivna kontrola pri toksikoloških raziskavah karcinogenosti in mutagenosti aromatskih aminov. Sprva je bil namenjen uporabi kot pesticid, vendar zaradi karcinogenosti za živali ni nikdar prišel na tržišče (Hazardous Substance Database..., 2000).

2-AAF je indirektni mutagen, ki za delovanje potrebuje predhodno metabolno aktivacijo. Na osnovi zadnjih raziskav je bilo sklenjeno, da ima 2-AAF genotoksične in epigenetske lastnosti (Neumann in sod., 1997). Mutagene lastnosti te spojine se pokažejo če jo testiramo v metabolno kompetentnih sistemih. Citotoksično in mutageno delovanje 2-AAF so dokazali tudi Newman in sod. (1997), ko so izvedli eksperiment z AS52 celicami z dodano mikrosomsko frakcijo podganjih jeter (S9 zmes).

V celici mono-oksidge (CYP1A1 in CYP1A2) pretvorijo 2-AAF v proksimalni karcinogen N-hidroksi-acetilaminofluoren, temu pa sledi nadaljna aktivacija, ki vodi do nastanka končnih reaktivnih oblik, ki reagirajo z DNA (Valentin-Severin in sod., 2003). Dodajanje aktivirane oblike 2-AAF celičnim kulturam ali živalim vodi do nastanka kovalentnih aduktov na DNA. Najpogostejši obliki teh aduktov so N-(deoksigvanosin-8-il)-2-(acetilamino)fluoren (dG-2-AAF) in N-(deoksigvanosin-8-il)-2-aminofluoren (dG-2-AF) (Shibutani in sod., 1998). Newman in sod. (1997) so ugotovili, da so najpogostejše mutacije, ki jih povzroča 2-AAF, G→T tranzverzija, G→A tranzicija in delecija baznega para.

Poleg genotoksičnih lastnosti so bile opisane tudi negenotoksične lastnosti 2-AAF. 2-AAF inducira encime, ki metabolizirajo zdravila in je bil označen kot mešan-tip spodbujevalca encimov CYP1A1 in CYP1A2. Poleg encimov faze I in II, pa 2-AAF vpliva tudi na encime endogenega karbonatnega metabolizma. V treh tednih diete, ki je vsebovala 0,02% 2-AAF je bilo opažena zmanjšana aktivnost glukoza-6-fosfataze (G-6-P) ter fosfoenol piruvat karboksilaze (PEPCK) in povečana aktivnost glukoza-6-fosfodehidrogenaze. Pomembno pa je omeniti, da so te lastnosti posledica adaptivnega odgovora normalnega jetrnega tkiva (Newmann in sod., 1997). Nekateri biološki učinki tega mutagena pa so lahko tudi posledica aktivacije Ah receptorja (angl. arylhydrocarbon receptor).

2.4 BENZO[A]PIREN (B(a)P)

B(a)P uvrščamo med policiklične aromatske ogljikovodike (angl. PAHs-polycyclic aromatic hydrocarbons) in nastaja pri nepopolnem izgorevanju ali pirolizi organskega materiala, ki vsebuje ogljik in kisik. Poleg naravnih virov PAH (npr. gozdni požari) je tudi veliko s človekom povezanih procesov, ki vodijo do kontaminacije zraka, vode, hrane, zemlje in sedimentov. Ljudje lahko pridejo v stik z PAH preko zraka, vode, hrane in kajenja cigaret (BENZO[*a*]PYRENE..., 1998). Obstajata dva glavna vira pojavljanja B(a)P v hrani. Eden je odlaganje in privzem B(a)P iz onesnaženega zraka na prehranske rastline. Tako so zelenjava, sadje, žitarice in rastlinska olja glavni vir vnosa B(a)P v človeka. Drugi vir pa je način priprave hrane (npr. dimljenje, pečenje, priprava na žaru...).

PAH nastajajo le pri višjih temperaturah, ponavadi pri več kot 350-400°C (BENZO[a]PYRENE..., 1998).

Na osnovi omejenih dokazov, da je B(a)P karcinogen ljudem in dovolj dokazov, da je karcinogen pri poizkusih na živalih, ga je IARC označila kot verjetno karcinogen ljudem in ga uvrstila v skupino 2A (angl. Group 2A: probably carcinogenic to humans).

Opravljenih je bilo veliko raziskav o mutagenosti B(a)P, velikokrat pa je bil v različnih testih uporabljen tudi kot pozitivna kontrola. Pri raziskavah na sesalskih celičnih kulturah je povzročal adukte na DNA, popravljanje DNA, zamenjavo sestrskih kromatid, kromosomske aberacije, točkovne mutacije in transformacije. Pri poizkusih na sesalcih *in vivo* je dal pozitivne rezultate pri testih za vezavo na DNA, zamenjavo sestrskih kromatid, kromosomskih aberacijah, abnormalnost spermijev in pri "somatsko specifičnem lokus testu" (angl. somatic specific locus test) (BENZO[a]PYRENE..., 1998).

B(a)P je prokarcinogen in potrebuje za izražanje svojih bioloških lastnosti, predhodno metabolno aktivacijo. Biotransformacija B(a)P je zelo kompleksen proces. Najprej citokrom P450 monoooksigenazni sistem oksidira B(a)P do aren-oksido. B(a)P do končnih karcinogenov v glavnem aktivirata CYP1A1 in epoksidna hidrolaza (Plazar in sod., 2007a). Iz arenskih oksidov lahko spontano nastanejo fenoli ali pa s hidratacijo ustrezni trans-dihidrodioli, lahko pa tudi kovalentno reagirajo z glutationi, bodisi spontano ali s pomočjo GST. Iz fenolov lahko z oksidacijo nastanejo quinoni. Fenoli, kinoni in dihidrodioli lahko nadalje konjugirajo v glukuronide in sulfatne estre. Kinoni ravno tako tvorijo glutationske konjugate. Lahko pa pride do nadaljnje oksidacije dihidrodiolov, kjer nastane veliko neidentificiranih metabolitov. Tako iz B(a)P-7,8-dihidrodiola z nadaljnjim oksidativnim metabolizmom nastane B(a)P-7,8-dihidrodiol-9,10 epoksid, ki ima mutagene in karcinogene lastnosti. Vsa postane še bolj zapleteno, saj vsak diepoksid obstaja v štiri optično aktivnih izomerah. Prevladujoč diol-epoksid je BPD. Pri različnih sesalskih celicah in organih izpostavljenih B(a)P je to napogostejši izomer kovalentno vezan na DNA in tvori deoksigvanozinske adukte (Larsen J.C.). Temeljni karcinogeni metabolit B(a)P je 7β,8α-Dihidroksi-9α,10α-epoksi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[a]piren (BPDE) (Sugihara in sod.,

2007). Monoooksigenaze in epoksidne hidrolaze B(a)P in ostali PAH z lastnim vplivom na citokrom P450 stimulirajo svoj metabolizem.

Metabolizem B(a)P je bil opažen pri kulturi primarnih hepatocit, enoslojni kulturi bronhialnih epitelialnih celic, kulturi hepatocit in kulturi humanih jetrnih mikrosomih (Larsen J.C.). Dokazano je, da B(a)P metabolizirajo tudi Caco2 in HepG2 celice (Sugihara in sod., 2007; Plazar in sod., 2007a; Plazar in sod., 2007b).

2.5 AFLATOKSIN B₁ (AFB₁)

Poleg aflatoksina B₁, obstajajo še aflatoksin B₂, G₁ in G₂. To so mikrotoksini, ki jih producirajo tri plesni vrste *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, in kontaminirajo rastline in njihove produkte. Aflatoksina M₁ in M₂, hidroksilirana metabolita aflatoksinov B₁ in B₂, sta lahko prisotna v mleku ali mlečnih izdelkih, ki izvirajo iz živali, ki so zaužile kontaminirano hrano (Aflatoxins..., 1998)

Izpostavljenost človeka aflatoksinom v nanogramskih do mikrogramskih količin dnevno se pojavi v glavnem z zaužitjem koruze in arašidov, ki so del vsakodnevne prehrane predvsem v nekaterih tropskih državah (Aflatoxins (Group 1)..., 2002). Zaradi tega se potencialna karcinogenost AFB₁ pojavlja predvsem pri ljudeh, ki živijo v Afriki in Aziji. Istočasna okužba z virusom hepatitis B (HBV) in verjetno tudi z hepatitisom C (HCV) lahko pospeši metabolizem AFB₁, vpliva pa tudi na njegovo karcinogenost, biokemijo in farmakologijo. Yeh in sod. (1990) so z svojo epidemiološko raziskavo ugotovili, da imata HBV in AFB₁ vlogo v razvoju primarnega hepatocelularnega raka. Pojavljajo pa se težave saj je težko ločiti med vplivom AFB₁ oz. HBV. V nasprotju z Yeh in sod. (1990), pa so Campbell in sod. (1990) ugotovili da ni direktne povezave med izpostavljenostjo AFB₁ in razvojem jetrnega raka (Aflatoxins..., 1998).

IARC je AFB₁ je označila kot karcinogenega ljudem in ga uvrstila v skupino 1. To je prokarcinogen in za svojo aktivnost potrebuje metabolno aktivacijo, pri čemer nastanejo elektrofilni intermediati. Metabolizem AFB₁ pri človeku je dobro karakteriziran. McLean in Dutton (1995) sta podala dober pregled celične interakcije in metabolizma aflatoksina,

Gorelick (1990) pa je primerjal metabolizem AFB₁ pri različnih vrstah. Guengerich in sod. (1996) so raziskali vpletenost citokroma P450, glutation-S-transferaze in epoksid hidrolaze v metabolizmu AFB₁ in pomen za tveganje nastanka humanega jetrnega raka (Aflatoxins..., 1998). Glavni encimi, ki sodelujejo pri metabolizmu AFB₁ so CYP1A2, 3A4, 3A5, 3A7 in GSTM1 encimi, sodelujejo pa tudi drugi (Aflatoxins (Group 1)..., 2002). Gallagher in sod. (1996) so ugotovili, da je pri ljudeh glavna pot *in vivo* aktivacije AFB₁ pri koncentracijah, prisotnih v hrani primarno preko CYP1A2. CYP1A2 in 3A4 oksidirata AFB₁ v reaktivni AFB₁8,9-epoksid in hidroksilna neaktivirana produkta AFM1 in AFQ1. Z biomarkerskimi raziskavami, so dokazali prisotnost teh produktov v urinu posameznikov, ki so bili izpostavljeni AFB₁ in s tem tudi, da sta oba encima, CYP1A2 in 3A4, vpletena v AFB₁ *in vivo* metabolizem (Aflatoxins..., 1998).

Pri metabolizmu AFB₁ nastane AFB₁8,9-epoksid, ki je kratko živeč vendar zelo reaktiven in velja za glavnega povzročitelja celičnih poškodb. Ta bioaktivacija, ki je odvisna od citokroma P450 odvisne epoksidacije terminalnega furanskega obroča AFB₁, je odgovorna za vezavo na celične makromolekule kot so DNA, RNA in ostali proteini (McKean in sod., 2006). Detoksifikacija teh metabolitov poteče z glutation-S-transferazno konjugacijo. V primeru, ko količina z hrano vnesenega AFB₁ preseže zmoglosti encimov faze II da detoksificirajo nastali mutagenski AFB₁8,9-epoksid ali če je zaradi kateregakoli razloga aktivnost teh poti zmanjšana (npr. zaradi polimorfizma glutation-S-transferaznega gena), se elektrofilni metaboliti akumulirajo in z visoko afiniteto vežejo na gvaninsko bazo v DNA in tvorijo 8,9-dihidro-8-(N⁷-gvanil)-9-hidroksi-AFB₁ DNA (AFB₁-N⁷-gvanin) adukt. Ta adukt lahko povzroči gvanin v timin tranzverzijo v celični DNA (Asare in sod., 2007).

Molekularne epidemiološke študije so ugotovile, da se pri humanem jetrnem tumorju v regijah, kjer je visoka izpostavljenost aflatoksinom, pogosto pojavlja (do 67%) G→T mutacija na tretji bazi kodona 249 gena p53 (Ozturk in sod., 1991). Hisch in Atkison (1995) sta raziskala ali to res drži in ugotovila, da če je nedavna izpostavljenost aflatoksinu res vpletena v že dobro razvito hepatokarcinogenezo, je to preko kakega drugega mehanizma in ne preko te mutacije (Aflatoxins..., 1998). Dokazano je bilo tudi, da AFB₁ inducira mutacijo gena p53 pri kulturi humanih HCC celic (Aflatoxins..., 1998). Vendar

večje pojavljanje te mutacije pri humanem hepatocelularnem karcinomu še ni popolnoma razloženo.

2.6 N-METIL-N'-NITRO-N-NITROZOGVANIDIN (MNNG)

MNNG je monofunkcionalni alkilirajoči agens, ki je potencialno karcinogen in mutagen. Lahko je prisoten je v cigaretinem dimu, ter sodeluje pri nastanku raka na prebavilih in kolorektalnem raku pri živalih in ljudeh. (Yu in sod., 2006).

IARC je ta direkten mutagen označil kot verjetno karcinogenega ljudem in ga uvrstila v skupino 2A (angl. Group 2A: probably carcinogenic to humans). Po podatkih IARC je MNNG pri testiranju karcinogenosti pri miših, podganah, hrčkih, zajcih in psih povzročil tumorje na mnogih organih. Pri raziskavah na humanih celicah *in vitro* je induciral kromosomske aberacije, zamenjave sestrskih kromatid in prelome verige DNA. To potrjujejo tudi kasnejše raziskave. Roser in sod. (2001) so v svoji raziskavi z testom komet dokazali, da lahko MNNG povzroči prelome verige DNA, poleg tega pa MNNG povzroča tudi adukte na DNA in proteinih. Dominantna mutagenska lezija, ki jo povzroča je O⁶-alkil gvanin adukt, kar lahko vodi do nepravilnega parjenja in končno tudi do kromosomskih abracij, točkovnih mutacij in celične smrti (Yu in sod., 2006).

Za svojo aktivnost MNNG ne potrebuje predhodne metabolne aktivacije. Pripada monofunkcionalni skupini alkilirajočih agensov, ki se kovalentno vežejo z enojnimi nukleofilnimi centri v DNA (Horváthová in sod., 1998). MNNG neposredno ne povzroča prelome verige DNA, ampak alkilira različne predele DNA. Ta direktno aktivni alkilirajoči agens metilira vse kisikove in večina dušikovih atomov DNA (Robichová in sod., 2002). Alkilira N¹, N³, N⁶ in N⁷ pozicijo adenina, N¹, N², N³, N⁷ in O⁶ pozicijo gvanina, N³, N⁴ in O² pozicijo citozina in N³, O² in O⁴ pozicijo timina. Alkilacija vodi do modifikacije baz, kar oslabi N-glikozidno vez in vodi do depurinacije/depirimidinacije in nastanka alkalno labilnih abaznih mest. DNA glikozilaze odstranijo alkalno labilna abazna mesta, kar vodi do nastanka enoveržnega preloma DNA. Alkilacija O⁶ pozicije je verjetno odgovorna za mutagenost in karcinogenost alkilirajočih agensov. Dokazano je bilo da MNNG inducira

poškodbe kromosomov v sesalskih celicah, kar lahko prispeva k njegovem citotoksičnem vplivu (Robichová in sod., 2002).

2.7 CELIČNE LINIJE

2.7.1 **HepG2**

Celične linije, ki izvirajo iz jetrnih celic se pogosto uporabljajo v raziskavah metabolizma ksenobiotikov in genotoksičnosti. Ena izmed takih celičnih linij je HepG2, ki ima ohranjene tako morfološke karakteristike podobne jetrnim parenhimatskim celicam kot tudi glavne encime potrebne za aktivacijo različnih indirektnih mutagenov (Valentin-Severin in sod., 2004). Celice HepG2 so leta 1972 izolirali iz primarnega hepatoblastoma enajstletnega dečka iz Argentine. Celice so delno ohranile metabolno aktivnost in imajo aktivne metabolne encime I faze (citokrom P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP 2B, CYP2E1) in encime II faze (glutation-S-transferaza, sulfotransferaza, N-acetiltransferaza, glukuronosiltransferaza), ki igrajo ključno vlogo pri aktivaciji in detoksifikaciji mutagenov, ki delujejo na DNA (Knasmüller in sod., 2004). HepG2 celice imajo aneuploiden kariotip (od 48 do 54), najpogosteje imajo 52 kromosomov. Delitveni čas celic je 20-24 ur (Žegura, 2002).

V uporabi obstaja več različnih klonov te celične linije, ki se med seboj razlikujejo tako morfološko, kot tudi glede aktivnosti presnovnih encimov. V naši raziskavi smo uporabili dva različna klona HepG2 celic. S HepG2 smo označili klon, ki smo ga prejeli od Prof. Darroudija (Oddelek za kemijsko mutagenozo, Univerza v Leidnu, Nizozemska) in ga na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka že več let uporabljajo, z HepG2ECCAC pa smo označili klon, ki so ga na oddelku kupili pri Evropski kolekciji celičnih kultur (Angl. European Collection of Cell Cultures). Klona se morfološko razlikujeta, nedavna raziskava pa je pokazala, da se kloni razlikujejo tudi glede sposobnosti zaznavanja genotoksične aktivnosti B(a)P (Majer in sod., 2004).

2.7.2 HCC-1.2

Celice HCC so izolirane iz jeter pacientov s primarnim hepatocelularnim karcinomom. Pod ime HCC uvrščamo več celičnih linij: HCC-1.1, HCC-1.2, HCC-2 in HCC-3. Celice HCC-1.1 (spindle) in HCC-1.2 (poligonalne) izvirajo iz istega donorja, vendar imajo različne morfološke lastnosti ter se razlikujejo v kromosomskih aberacijah. Mi smo v naši raziskavi uporabili celično linijo HCC-1.2, ki imajo aneuploiden kariotip. V celični kulturi celice HCC-1.2 rastejo v kupčkih, tvorijo tridimenzionalne strukture.

2.7.3 CaCo2

Leta 1974 so celice Caco2 izolirali iz adenokarcinoma oz. primarnega črevesnega tumorja 72-letnega kavkazijskega moškega. To so humane epitelne črevesne celice, ki v celični kulturi rastejo v enem sloju pritrjene na podlago. Ob večanju celične gostote lahko pri celicah zasledimo okrogle vakuole, katerih frekvenca se večja čim bolj se približujemo konfluentni rasti. Ta celična linija ima veliko značilnosti epitelnih celic tankega črevesa. Caco2 celice na robu razvijejo čopaste mikrovile in tesne stike, prisotni pa so tudi hidroliza, črevesni nevronske-hormonsko odvisni sprejem vitaminov in ionski transport. Kot glavno obrambo pred aktivnimi kisikovimi spojinami pa te celice izrazijo superoksidno dismutazo, glutation peroksidazo in enime z katalazno aktivnostjo (Robichová in sod., 2002).

Caco2 celice se uporabljajo pri raziskavah o vplivu zdravil na lipidni metabolizem in celično adhezijo, pri regulaciji ekspresije proteinov, pri genetskih raziskavah, pri raziskavah CFTR (angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), pri izolaciji človeških patogenih virusov in diagnozi prebavnih infekcij (ECACC).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 KEMIKALIJE

<i>KEMIKALIJE</i>	<i>PROIZVAJALEC</i>	<i>KAT.ŠTEV</i>
Benzo[a] Piren (B(a)P)	Sigma, St. Louis, ZDA	B_1760
2-Amino-3-metil-imidazo[4,5-f]quinolin (IQ)	Toronto Research Chemicals, Kanada	A 616500
N-Metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidin (MNNG)	Sigma, St. Louis, ZDA	M 7629
2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP)	Toronto Research Chemicals, Kanada	A 617000
2-Amino-9H-pirido[2,3-b]indole (AaC)	Toronto Research Chemicals, Kanada	A 629000
2-Acetilamino fluoren (2-AAF)	Sigma, St. Louis, ZDA	A 7015-56
Aflatoxin B1 (AFB ₁)	Sigma, St. Louis, ZDA	A 6636
Gojišče za rast celic, RPMI-1640	Euro Clone	ECB 9006L
FBS	Euro Clone	EC S 0180L
L-glutamin	Euro Clone	ECB 3000D
Williamsov medij E	Sigma, St. Louis, ZDA	W 1878
Penicilin/streptomycin	Euro Clone	ECB 3001D
PBS	Euro Clone	ECM 4004XL
Gojišče za rast celic, Minimum essential medium with Earl's salt MEM/EBSS	Euro Clone	ECB 2071L
Raztopina z neesencialnimi amino kislinami MEM-non-essential Amino acid solution	Sigma, St. Louis, ZDA	M 7145
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Sigma, St. Louis, ZDA	154938-1L
NMP agaroz	Invitrogen, GB	15517-022
NaCl	Merck, Germany	1.06404.1000
LMP agaroz	Invitrogen, GB	15517-022
EDTA	Sigma, St. Louis, ZDA	E 5134-500G
Tris HCl	Merck, Germany	1.08382.0100
NaOH	Merck, Germany	1.06482.1000
HCl	Merck, Germany	1.00318.1000
Triton X-100	Sigma, St. Louis, ZDA	X100-500ML
EtBr	Gibco, GB	15585-011
Tripansko modrilo	Sigma, St. Louis, ZDA	T-8154
MTT	Sigma, St. Louis, ZDA	M-5655
TrypLE Express	Gibco, GB	12604-013

Tabela 1: Kemikalije

3.2 CELIČNE LINIJE

Na Nacionalnemu inštitutu za biologijo (Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka) imajo dva klona HepG2 celic. Enega je poklonil dr. Firouzi Darroudi (Oddelek za kemijsko mutagenozo, Univerza v Leidnu, Nizozemska) – v naši raziskavi je označen z HepG2. Drugi klon pa so kupili pri ECACC (angl. European Collection of Cell Cultures) in ga označujemo z HepG2ECACC. Celice HCC-1.2 so na Nacionalnemu inštitutu za biologijo dobil od dr. Bettine Grasl-Kraupp iz Inštituta za raziskave raka, Medicinske univerze na Dunaju. CaCo2 celično linijo so kupili pri ECACC (angl. European Collection of Cell Cultures). Vse celične linije hranijo v tekočem dušiku.

3.2.1 Gojenje celičnih linij HepG2 in HepG2ECACC

Celice HepG2 smo gojili v celičnem gojišču, ki je vsebovalo Williamsov medij E, 10% FBS (serum govejega zarodka, iz angl. foetal bovine serum), 2 mM L-glutamina ter 100 E/ml penicilin/streptomycin, celice HepG2ECACC pa smo gojili v celičnem gojišču, ki je vsebovalo gojišče za rast celic Minium essential medium with Earl's salt (MEM/EBSS), 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 E/ml penicilin/streptomycin in 1% neesencialnih aminokislin. Celice smo gojili pri 37°C v vlažni atmosferi s 5% CO₂ v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Crporation, New York, ZDA) s prostornino 75 cm³. Pri 80% preraščenosti plošče smo celice presadili. Pri tem smo najprej iz platenke odstranili medij in površino s celicami sprali z 1x PBS. Nato smo odstranili 1x PBS in dodali 3 ml 0.1% tripsina za celice HepG2 in platenko dali v inkubator. Po približno 3 minutah inkubacije pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi smo celice rahlo pretresli, da so se odlepile od podlage. V platenko smo dodali 6 ml svežega medija in s tem zaustavili delovanje tripsina, ki bi lahko povzročil nadaljne poškodbe DNA. Celice smo prenesli v centrifugirko in jih centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Nato smo odstranili medij in celice resuspendirali v 5 ml svežega gojišča. Da smo dobili posamezne celice smo celično suspenzijo okoli 10x potegnili z brizgo skozi injekcijsko iglo. Suspenzijo posameznih celic smo prenesli v novo platenko ter po potrebi dodali sveže gojišče.

3.2.2 Gojenje celične linije HCC-1.2

Celice HCC-1.2 smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) s prostornino 75 cm³ na 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Do gojenja so bile celice shranjene v tekočem dušiku. Gojili smo jih v celičnem mediju, ki je vseboval gojišče za rast celic RPMI-1640, 5 ml FBS in 2 mM L-glutamina. Celice smo presajali pri 70-80% preraščenosti plošče. Najprej smo iz plastenke odstranili medij in dodali 3 ml 0.1% tripsina za celice HCC-1.2, s katerim smo sprali površino plošče. Tripsin smo odstranili in dodali 1 ml svežega tripsina ter inkubirali 1-2 minuti pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Celice so zelo hitro postale okrogle in so se odlepile od podlage. Da se je večina celic odlepilo od podlage smo ploščo previdno z nagibanjem sprali z tripsinom. Nato smo dodali 5 ml svežega gojišča in tako zaustavili delovanje tripsina, ki bi lahko povzročil nadaljne poškodbe DNA. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 4 minute pri 1000 obratih/minuto. Odstranili smo medij in pelet resuspendirali v svežem mediju. Suspenzijo celic smo prenesli v novo plastenko in dodali sveže gojišče.

3.2.3 Gojenje celične linije Caco2

Celice Caco2 smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) s prostornino 75 cm³ na 37°C v vlažni atmosferi s 5% CO₂. Do gojenja so bile celice shranjene v tekočem dušiku. Gojili smo jih v celičnem gojišču, ki je vsebovalo gojišče za rast celic Minium essential medium with Earl's salt (MEM/EBSS), 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 E/ml penicilin/streptomycin in 1% neesencialnih aminokislin. Ob 80% preraščenosti smo celice presadili. Najprej smo iz plastenke odstranili medij in površino spreli z 1x PBS. Po odstranitvi 1x PBS smo dodali 3ml TrypLE Express-a (v nadaljevanju tripsin) in inkubirali 3 do 4 minute pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Po inkubaciji smo celice zelo previdno stresli, da so se odlepile od podlage in dodali 5 ml svežega gojišča, ter tako zaustavili delovanje tripsina. S tem smo preprečili nadaljne poškodbe DNA, ki bi jih lahko povzročil tripsin. Celice smo nato centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo odpipetirali

supernatant in pelet resuspendirali v svežem gojišču. Celično suspenzijo smo nato prenesli v novo platenko.

3.3 TEST MTT

MTT test je zelo enostavna in natančna metoda, ki se uporablja za določanje proliferacije, viabilnosti in citotoksičnosti celic. S to metodo posredno zaznavamo žive celice in je primerna le za celice, ki rastejo v enem sloju ali v suspenziji. Citotoksičen vpliv agensov na celične linije HepG2, HepG2 ECACC, Caco2 in HCC-1.2 smo določali z testom MTT. MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid) je vodotopna substanca rumene barve, ki jo mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste nevodotopne kristale formazana. Ti kristali so topni v dimetil sulfoksidu (DMSO), izopropanolu in podobnih topilih. Optična gostota je sorazmerna s številom celic pri homogeni celični populaciji in jo merimo pri valovni dolžini 690 nm. Ta linearnost pokriva zelo široko območje gostote celic iz česar je razvidno, da test lahko zazna zelo majhno število živih celic (Mosmann, 1983). Zaradi razlik v metabolni aktivnosti posameznih celičnih linij je razmerje med količino nastalega formazana in številom živih celic specifično.

3.3.1 Določanje citotoksičnega delovanja mutagenih agensov na različne celične linije

Za testiranje citotoksičnosti agensov na celične linije smo uporabili test MTT. Celice smo gojili v platenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) s prostornino 75 cm². Pri celicah Caco2, HepG2 in HepG2 ECACC smo pri približno 80% preraščenosti plošče odstranili medij in celice sprali z 1% PBS. Pri celicah HCC-1.2 smo po odstranitvi medija namesto z 1x PBS površino sprali z tripsinom. Celicam smo dodali tripsin in jih inkubirali pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Ko so se odlepile od podlage smo jim dodali ustrezen medij in zaustavili delovanje tripsina. Nato smo jih centrifugirali pri času in obratih potrebnih za določeno celično linijo. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v mediju. Celice HepG2 smo previdno potegnili 8-10x z brizgo skozi injekcijsko iglo in tako dobili suspenzijo posameznih celice. Celice z

gostoto 10 000 celic/luknjico smo nasadili na mikrotitersko ploščo s 96 luknjicami (Nunc Naperville IL, ZDA). Predhodno smo celice barvali z tripanskim modrilom in jih prešteli v hemocitometru. Po nasaditvi smo celice inkubirali za 3-4 ure pri 37°C v vlažni atmosferi s 5% CO₂, tako da so se pritrdile na podlago. Nato smo odstranili celični medij in ga zamenjali s svežim, ki je vsebovalo različne koncentracije mutagenov. Testirali smo sedem različnih mutagenov: IQ v koncentracijah 0,25, 0,5 in 0,75 mM; PhIP v koncentracijah 0,125, 0,25 in 0,5 mM; AcC v koncentracijah 0,125, 0,25 in 0,5 mM; 2-AAF v koncentracijah 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 in 160 µM; AFB₁ v koncentracijah 0,5, 0,75 in 1 µg/ml; B(a)P v koncentracijah 50, 75 in 100 µM; MNNG v koncentracijah 5, 10 in 20 µM. Koncentracije smo določili na osnovi podatkov za druge celične linije, ki smo jih dobili iz literature. Naredili smo tudi kontrolo gojišča, kjer smo celice izpostavili le celičnemu mediju in kontrolo topila, kjer smo celice izpostavili 1% DMSO v celičnem mediju. Po menjavi medija smo celice inkubirali 20 ur pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Nato smo dodali 10% MTT ter celice inkubirali nadaljne 3 ure. Po končani inkubaciji smo odstranili supernatant in formazanske kristale raztopili v 200 µl DMSO. Optično gostoto (OD) smo merili pri valovni dolžini 570 nm in referenčnem filtru 690 nm. Izmerjena OD je sorazmerna številu živih celic.

Pri statistični obdelavi rezultatov smo uporabili studentov-t test. $p < 0,05$ smo določili za statistično značilno razliko skupin celic tretiranih z določenim mutagenom glede na kontrolno skupino celic.

3.4 TEST KOMET

Leta 1984 sta Östling in Johanson razvila metodo za opazovanje poškodb DNA. To je test komet ali gelska elektroforeza posamezne celice (angl. SCGE; single cell gel electrophoresis). Tipi poškodb, ki jih lahko zaznamo s to metodo so enoverižni (angl. SSB; single-strand breaks) in dvoverižni (angl. DSB; double-strand breaks) prelomi DNA, alkalno labilna mesta (angl. ALS; alkali labile sites) kot so apurinska in apirimidinska mesta (AP), DNA-DNA ter DNA-protein prečne povezave in enoverižni prelomi DNA, ki so posledica nepopolnega popravljanja z izrezovanjem. (Volčič, 2006).

To je hitra, preprosta in zelo občutljiva metoda, ki temelji na principu da denaturirani fragmenti DNA lahko migrirajo med elektroforezo. Östling in Johanson sta elektroforezo izvedla pri nevtralnem pH, kar omogoča zaznavanje prelomov obeh verig DNA (DSB). Kasneje je prišlo do številnih modifikacij te metode, leta 1988 je Singh s sodelavci razvil metodo, kjer elektroforeza poteka pri bazičnih pogojih ($\text{pH} > 13$) in omogoča poleg zaznavanja DSB tudi zaznavanje SSB in alkalno labilnih mest (ALS). Pozneje so Olive in sod. (1990) opisali različico testa z elektroforezo pri blagih alkalnih pogojih ($\text{pH} = 12,3$), pri kateri se izrazijo ALS, ne pa tudi SSB (Petković, 2006).

Poškodbe, ki jih lahko zaznamo z alkalno verzijo testa komet so dvojni in enojni prelomi DNA, ter poškodbe, ki so le prehodno prisotne. Te so posledica celičnega popravljalnega mehanizma kot sta nukleotidno (NER) in bazno (BER) izrezovanje ali pa gre za alkalno stabilna mesta (Collins in sod., 1997, cit. po Volčič, 2006). Večina genotoksičnih snovi povzroči SSB in ALS. Alkalna različica testa komet je najprimernejša izbira za določanje genotoksičnega delovanja snovi, saj se pri $\text{pH} > 12,6$ ALS izrazijo kot SSB. (Volčič, 2006). To pa omogoča večjo občutljivost te metode.

Pri alkalni različici testa komet na objektna stekelca naneseemo suspenzijo posameznih celic pomešanih z agarozo. Nato jih potopimo v raztopino za liziranje, ki zaradi visoke koncentracije soli in detergentov ($\text{pH} 10$) odstrani vso celično vsebino, ostane le jedro z DNA. Po liziranju stekelca inkubiramo v alkalni raztopini ($\text{pH} > 13$), kjer se DNA začne odvijati na mestih prelomov verig. Odvijanju sledi faza elektroforeze. DNA zaradi negativnega naboja potuje proti pozitivnemu polu. Odvita in poškodovana DNA potuje proti anodi hitreje kot nepoškodovana DNA. Zmožnost potovanja odvite DNA je odvisna od velikosti in števila prelomov (Žegura, 2002). Stekelca nato položimo v raztopino za nevtralizacijo. Sledi barvanje jeder s fluorescentnim barvilom etidijev bromid, ki se vrine med bazne pare DNA in opazovanje z fluorescentnim mikroskopom. Po elektroforezi oblika jeder spominja na komete po čemer je metoda tudi dobila ime.

Poškodbe DNA ovrednotimo z analizo slik posameznih jeder oz. kometov. Da preprečimo nadaljne poškodbe DNA, faze od liziranja celic dalje izvajamo v temi pri 4°C . Parametri,

ki se najpogosteje uporabljajo za izražanje poškodb DNA so odstotek DNA, ki je migrirala iz glave kometa v rep kometa, dolžina repa (razdalja od DNA v glavi kometa do zadnjega fragmenta DNA v repu, izražena v mikrometrih), Olivin repni moment (produkt odstotka DNA v repu in razdalje od centra repa kometa do centra glave kometa) in razširjeni repni moment (produkt DNA v repu in dolžine repa) (Žegura in Filipič, 2004, cit. po Petković, 2006).

Test komet se lahko uporablja *in vitro* in *in vivo* raziskavah. V *in vitro* izvedbi test lahko uporabljamo za ugotavljanje genotoksičnosti, predvsem s sesalskimi celičnimi kulturami in človeškimi limfociti, lahko pa tudi s celičnimi kulturami, ki izvirajo iz drugih tkiv (Petković, 2006). Poleg tega se test komet uporablja tudi v okoljskem monitoringu in monitoringu pri ljudeh, pri molekularni epidemiologiji, z tem testom pa lahko opazujemo tudi potek in sposobnost popravljanja poškodb DNA.

3.4.1 Metodologija

3.4.1.1 Priprava raztopin za test komet

- Raztopina za liziranje celic:

2.5 M NaCl	(146.4 g/l H ₂ O)
100 mM EDTA-Na ₂	(37.2 g/l H ₂ O)
100 mM Tris	(1.21 g/l H ₂ O)

Z NaOH oz. HCl smo uravnavali pH raztopine na 10, jo ohladili na 4°C in pred uporabo dodali 1% detergenta Triton-X 100.

- Pufér za odvijanje in elektroforezo:

300 mM NaOH	(30 ml 10 M NaOH/l H ₂ O)
1 mM EDTA	(5ml 0.2 EDTA/ H ₂ O)

10 M NaOH (200 g/500 ml H₂O) in 0.2 M EDTA (37.2 g/500 ml H₂O) smo pripravili v naprej, ostale raztopine pa smo zmeraj pripravili sveže, 10 M NaOH smo do uporabe shranili na sobni temperaturi, 0.2 M EDTA pa pri 4°C.

◆ Raztopina za nevtralizacijo:

0.4 M Tris (48.44 g/l H₂O)

pH raztopine smo s HCl uravnavali na 7.5.

3.4.2 Potek testa komet

3.4.2.1 Priprava stekelc in nanos suspenzije tretiranih celic

Na peskana stekelca (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Nemčija), ki smo jih dan pred uporabo namočili v etanolu, da so se razmastila, smo nanesti prvo plast 1% NMP (angl. normal melting point) agaroze raztopljene v 1x PBS. Po nanosu 80 µl NMP agaroze smo objektna stekelca pokrili z krovnikom in jih položili na hladno. Po 5 minutah, ko se je agarosa strdila smo odstranili krovnik in nanesti 70 µl LMP (angl. low melting point) agaroze pripravljene v 1x PBS in je vsebovala 30 µl suspenzije tretiranih celic. Objektna stekelca smo ponovno pokrili z krovnikom in jih pustili na hladnem. Ko se je LMP agarosa strdila smo previdno odstranili krovnik.

3.4.2.2 Alkalna liza celic

Ohlajeno raztopino za liziranje celic smo zlili v kadičko in vanjo položili objektna stekelca, kjer smo jih pri 4°C in v temi pustili najmanj eno uro. V tej fazi se zaradi visokega pH (pH>10) razgradijo vsi proteini in RNA, detergenti pa razgradijo celične membrane.

3.4.2.3 Alkalno odvijanje DNA in elektroforeza

Po končanem liziranju celic smo stekelca prenesli v elektroforetsko kadičko enega zraven drugega, tako da so bili vsi geli obrnjeni proti anodi. Na prazna mesta smo položili prazna stekelca in tako zagotovili homogenost električnega polja. Stekelca smo prelili z sveže pripravljenim in na 4°C ohlajenim elektroforetskim pufrom, ki je segal največ 1 cm nad stekelca. Alkalno odvijanje DNA je potekalo 20 minut pri 4°C. Temu je sledila elektroforeza, ki je potekala nadaljnjih 20 minut. DNA smo izpostavili električnemu polju pri napetosti 25 V in toku 300 mA.

3.4.2.4 Nevtralizacija

Ohlajen nevtralizacijski pufer s pH 7.5 smo vlili v kadičko in po končani elektroforezi vanjo prenesli stekelca. V pufru smo jih pustili 15 minut.

3.4.2.5 Shranjevanje stekelc

Do mikroskopiranja smo stekelca shranili v kadičkah obloženih z vlažno staničevino. Tako smo preprečili izsušitev preparatov. Kadičke smo pokrili z alufolijo, spravili v plastične vračke in jih shranili pri 4°C. Celice na preparatih smo poslikali 6 do 7 dni od izvedbe testa.

3.4.2.6 Barvanje in slikanje jeder celic

Pred mikroskopiranjem smo jedra celic na gelih barvali z 20 µl etidijevega bromida s koncentracijo 5 µg/ml. Komete, ki so nastali po izpostavitvi jeder električnemu polju, smo gledali pod mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescentno svetlobo (Nikon HB-10104 AF, Japonska). Jedra celic smo slikali z kamero (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies, UK) pod 400x povečavo. Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515-560 nm, barierni pa 590 nm. V vsaki populaciji smo slikali 50 jeder pri čemer smo se izogibali robnim delom gelov.

3.4.2.7 Analiza slik in obdelava podatkov

Slike smo analizirali s pomočjo programa Comet assay (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK). Od parametrov, ki jih lahko izmerimo smo izbrali parameter % DNA v repu kometa. Statistično smo podatke obdelali s programom Sigma Stat 3.11 (SPSS, Chicago, USA), ter za analizo razlike med celicami tretiranimi z mutageni in kontrolnimi celicami uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnett, pri čemer smo $p < 0.001$ določili kot statistično značilno razliko.

3.4.3 Določanje genotoksičnega delovanja mutagenov na različne celične linije

Za določanje genotoksičnosti mutagenov na različne celične linije smo uporabili alkalni test komet. Celice smo gojili v platenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) s prostornino 75 cm². Celice Caco2, HepG2 in HepG2 ECACC smo pri 80% preraščenosti plošče odstranili medij in jih sprali z 1% PBS. Pri celicah HCC-1.2 smo po odstranitvi medija namesto z 1x PBS površino sprali z tripsinom. Nato smo celicam dodali ustrezen tripsin in jih inkubirali pri 37°C in 5% CO₂ v vlažni atmosferi. Ko so se odlepile od podlage smo jim dodali ustrezen medij in zaustavili delovanje tripsina. Celice smo centrifugirali pri času in obratih določenih za posamezno celično linijo. Po centrifugaciji smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v mediju. Pri testu komet potrebujemo posamezne celice zato smo celice HepG2 s brizgo previdno 8-10x potegnili skozi injekcijsko iglo.

Celice smo nasadili na plošče z 12 luknjami. Po 3-4 urah, ko so se pritrdile smo zamenjali celični medij s svežim, ki je vsebovalo različne koncentracije mutagenov. Testirali smo IQ v koncentracijah 250, 500 in 750 µM; PhIP v koncentracijah 80, 100 in 120 µM; AαC v koncentracijah 150, 250 in 350 µM; 2-AAF v koncentracijah 40, 80 in 160 µM; B(a)P v koncentracijah 12.5, 25 in 50 µM; AFB₁ v koncentracijah 3.2, 4.8 in 6.4 µM in MNNG v koncentracijah 0.25, 0.5 in 1 µM. Naredili smo tudi kontrolo gojišča, kjer smo celice izpostavili le celičnemu mediju in kontrolo topila, kjer smo celice izpostavili celičnemu mediju z < 1% DMSO. Po menjavi medija smo celice inkubirali 20 ur v vlažni atmosferi

pri 37°C in 5% CO₂. Naslednji dan smo odstranili gojišče, sprali celice z 1x PBS, jim dodali ustrezen tripsin in jih inkubirali nekaj minut. Ko so se celice odlepile smo jim dodali medij in tako zaustavili delovanje tripsina. Celično suspenzijo smo prenesli v epice in jih centrifugirali pri ustreznem času in obratih. Nato smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 60 µl medija. 30 µl suspenzije smo prenesli v drugo epico, tako da smo imeli dve epici z 30 µl celične suspenzije, ter nadaljevali z testom komet.

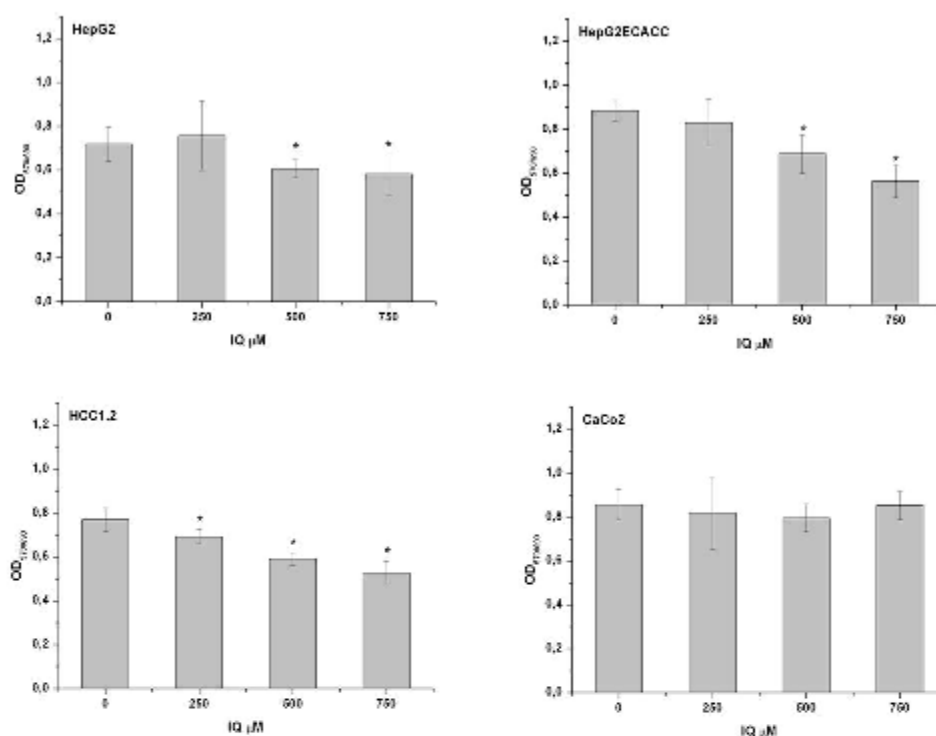
4 REZULTATI

4.1 TEST MTT

V diplomski nalogi nas je zanimal vpliv izbranih mutagenov na različne metabolno aktivne celične linije. Za testiranje citotoksičnega vpliva smo uporabili test MTT. Celične linije smo izpostavili različnim koncentracijam mutagenov in po 20 urah izvedli test MTT. Za vsako koncentracijo smo poskus izvedli v 5 paralelah. V rezultatih smo prikazali le kontrolo topila, saj med kontrolo medija in kontrolo topila ni bilo značilnih razlik. Rezultate smo prikazali kot povprečne vrednosti optične gostote (OD) 5 paralel, ki je sorazmerna številu živih celic, ter izračunali standardne odklone. Izračunali smo tudi odstotek preživetja celic, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam agensov.

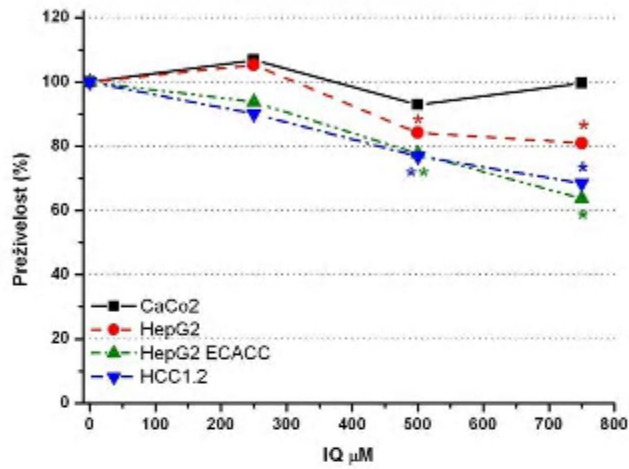
4.1.1 Citotoksično delovanje IQ

Rezultati so pokazali, da je IQ po 20 urni izpostavitvi rahlo, vendar statistično signifikantno znižal preživelost hepatičnih celic HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2, medtem, ko na preživelost črevesnih celic CaCo2 ni vplival. Signifikantno znižanje OD_{570/690} smo pri HepG2 in HepG2ECACC zaznali pri koncentracijah 500 in 750 µM, pri HCC1.2 celicah pa pri vseh testiranih koncentracijah (Slika 1).



Slika 1: Vpliv različnih koncentracij IQ na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic. Celice smo za 20 ur izpostavili 250, 500 in 750 μ M koncentraciji IQ in nato izvedli test MTT. Tretiranja celic so bila izvedena v petih paralelah. Rezultate smo podali kot OD_{570nm} (\pm STD). * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

HepG2ECACC in HCC-1.2 celice, so pokazale podoben odziv in so bile nekoliko bolj občutljive na citotoksično delovanje IQ kot HepG2 celice. Pri najvišji koncentraciji je IQ glede na kontrolo znižal preživetje HCC-1.2 celic za 31.5 %, HepG2ECACC celic za 36 %, HepG2 celic pa za 19% (Slika 2).

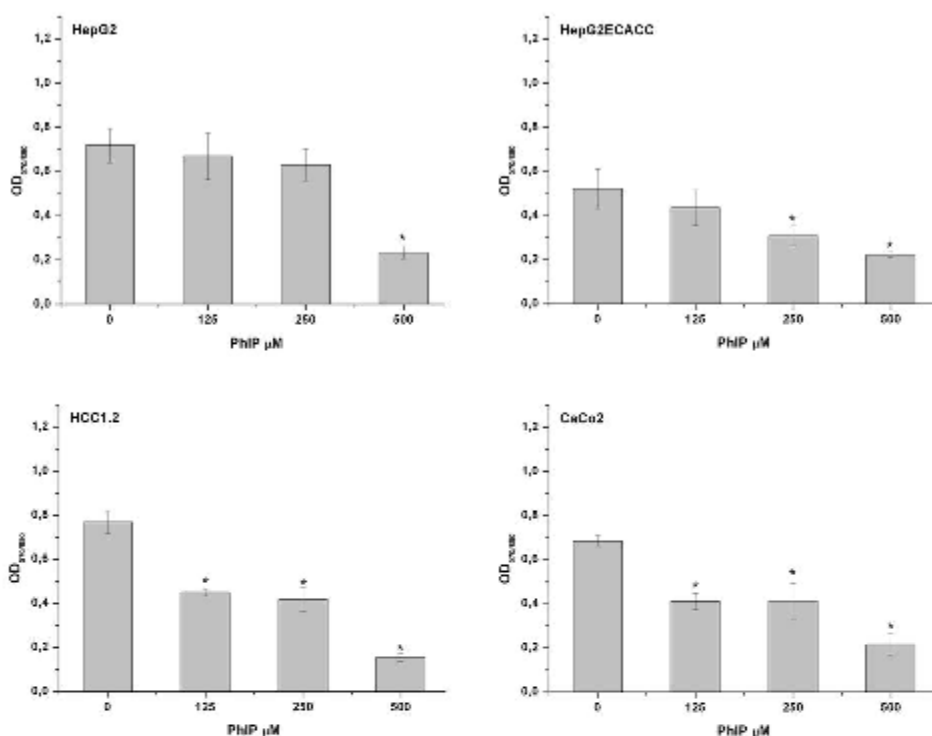


Slika 2: Vpliv različnih koncentracij IQ na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.

Celice smo za 20 ur izpostavili 250, 500 in 750 µM koncentraciji IQ in nato izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživetja celic glede na kontrolo topila. *statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

4.1.2 Citotoksično delovanje PhIP

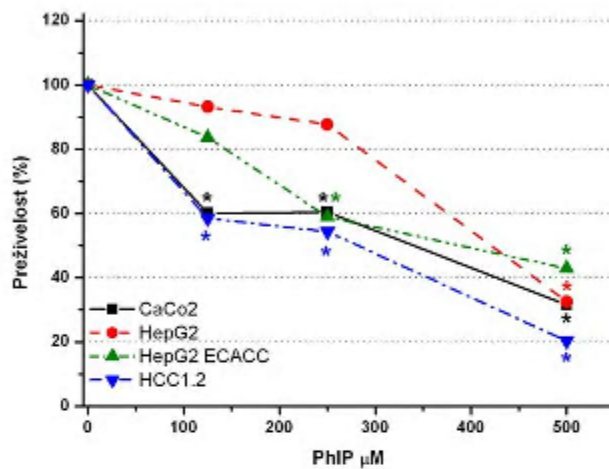
PhIP je po 20 urni izpostavitvi zmanjšal preživelost vseh štirih vrstah celic. Signifikantno znižanje $OD_{570/690}$ smo pri HepG2 celicah zaznali pri najvišji koncentraciji (500 µM), pri HepG2ECACC celicah pri koncentracijah 250 in 500 µM, pri HCC1.2 in pri CaCo2 celicah pa pri vseh testiranih koncentracijah (Slika 3).



Slika 3: Vpliv različnih koncentracij PhIP na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 125, 250 in 500 µM koncentraciji PhIP in nato izvedli test MTT. Tretiranje celic so bila izvedena v petih paralelah. Rezultate smo podali kot OD_{570nm} (+ STD). * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

Na citotoksično delovanje PhIP so najboljčutlivejše HCC1.2 in CaCo2 celice. Pri najnižji testirani koncentraciji je bila preživelost HCC1.2 in CaCo2 celic zmanjšana za 40%. Pri koncentraciji 250 µM je bila za 40% zmanjšana tudi preživelost HepG2ECACC celic. Pri najvišji koncentraciji je bila preživelost HCC1.2 celic zmanjšana za 80%, HepG2 in CaCo2 celic za 70%, HepG2ECACC celic pa za 57% (Slika 4).

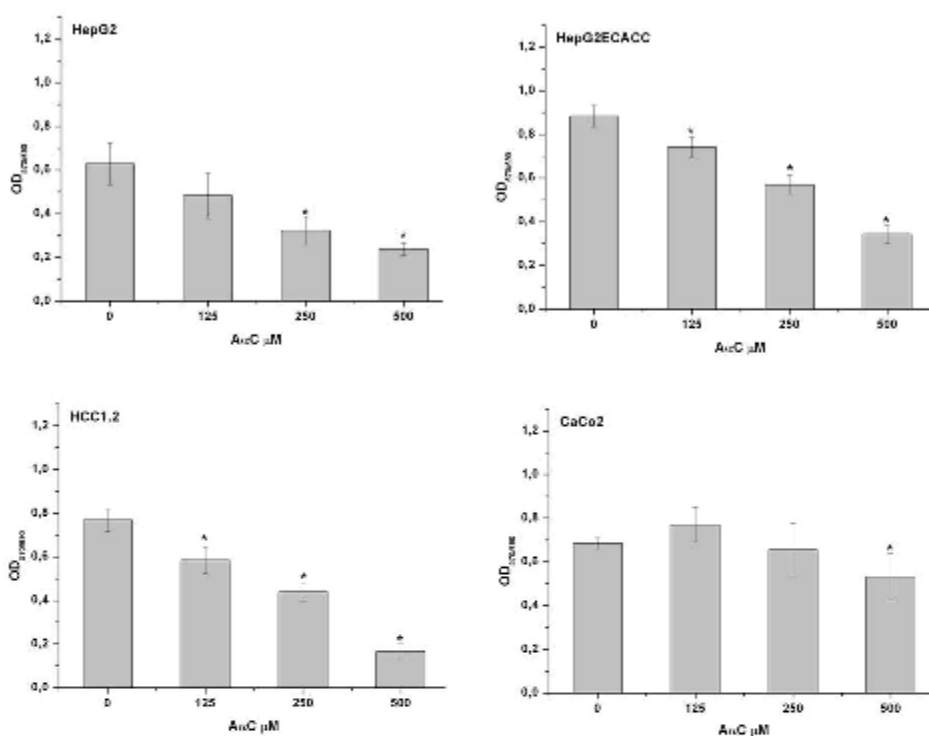


Slika 4: Vpliv različnih koncentracij PhIP na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.

Celice smo za 20 ur izpostavili 125, 250 in 500 μM koncentraciji PhIP in nato izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživetja celic glede na kontrolo toplila. *statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

4.1.3 Citotoksično delovanje AoC

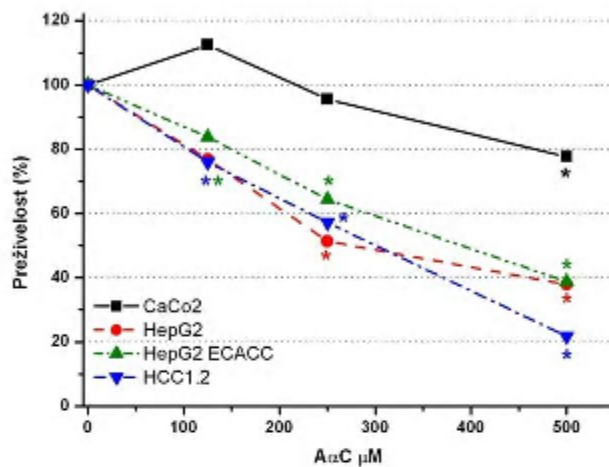
Po 20 urni izpostavitvi celic različnim koncentracijam AoC smo zaznali pri HepG2 celicah statistično signifikantno znižanje $\text{OD}_{570-650}$ pri koncentracijah 250 in 500 μM , pri HepG2ECACC in pri HCC1.2 celicah pri vseh testiranih koncentracijah, pri CaCo2 celicah pa le pri najvišji koncentraciji (500 μM) (Slika 5).



Slika 5: Vpliv različnih koncentracij AαC na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 125, 250 in 500 μM koncentraciji AαC in nato izvedli test MTT. Tretiranja celic so bila izvedena v petih paralelah. Rezultate smo podali kot OD_{750nm} (± STD). * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, p < 0.05).

Hepatične celične linije HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2 so pokazale podobno občutljivost na citotoksično delovanje AαC, medtem, ko so bile CaCo2 celice bistveno manj občutljive. Pri koncentraciji 125 μM je bila preživelost HepG2 in HCC1.2 celic zmanjšana za 24%, pri koncentraciji 250 μM je bila preživelost HepG2 celic zmanjšana za 50%, HepG2ECACC celic za 35% in HCC1.2 celic za 43%, pri najvišji koncentraciji pa je bila najbolj zmanjšana preživelost HCC1.2 celic – za 78 %, HepG2 in HepG2ECACC celic pa za 62 %. Pri CaCo2 celicah je bila za 32 % zmanjšana preživelost le pri najvišji koncentraciji. (Slika 6)

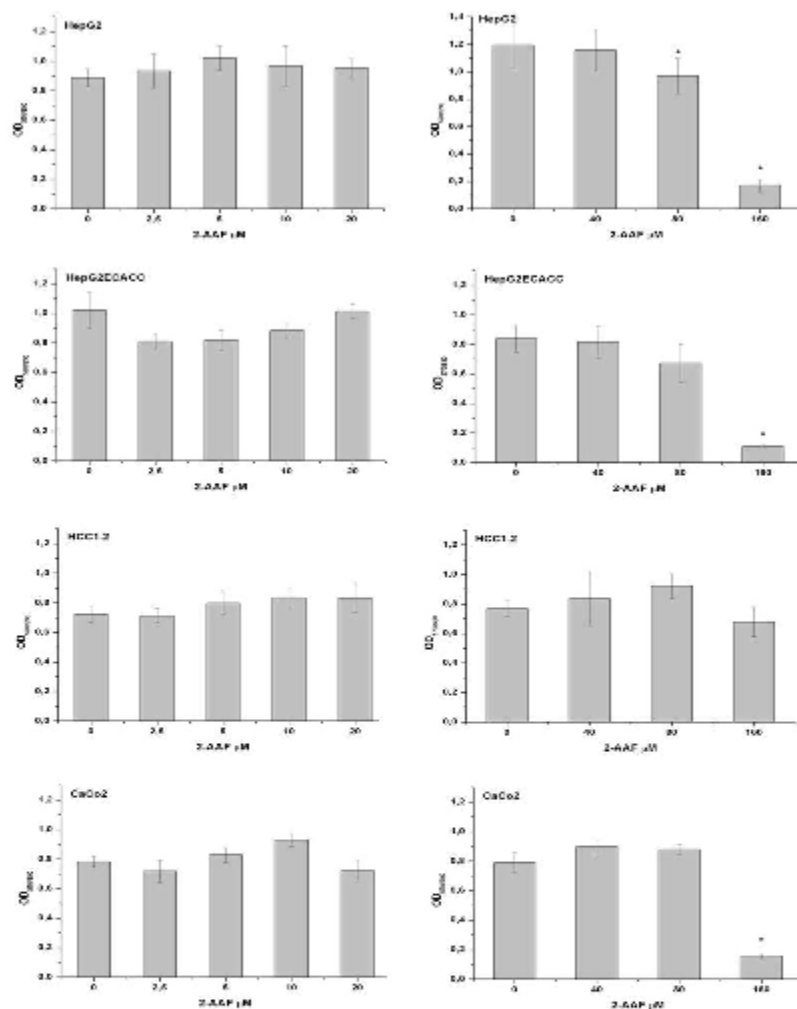


Slika 6: Vpliv različnih koncentracij AuC na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.

Celice smo za 20 ur izpostavili 125, 250 in 500 µM koncentraciji AuC in nato izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživetja celic glede na kontrolo topila. *statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

4.1.4 Citotoksično delovanje 2-AAF

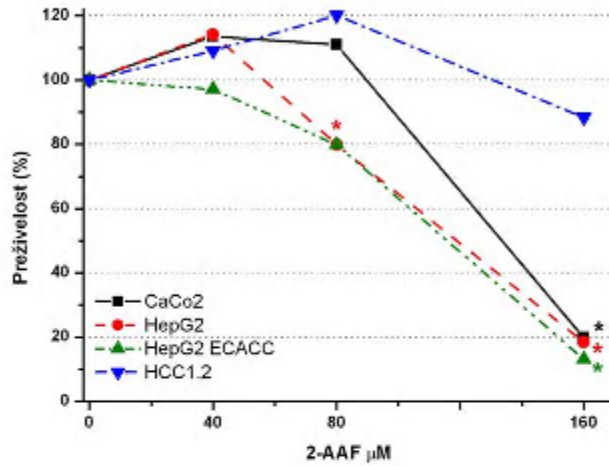
Citotoksičnost 2-AAF smo testirali v dveh koncentracijskih območjih: pri koncentracijah 2,5 do 20 µM in 40 do 160 µM. Pri 20 urni izpostavljenosti celic smo pri najvišji testirani koncentraciji zaznali statistično signifikantno znižanje $OD_{570.690}$ pri HepG2, HepG2ECACC in CaCo2 celicah. Pri HepG2 celicah je bila vrednost $OD_{570.690}$ signifikantno znižana tudi pri koncentraciji 80 µM. Pri HCC1.2 celicah 2-AAF ni signifikantno znižal $OD_{570.690}$ pri nobeni testirani koncentraciji (Slika 7).



Slika 7: Vpliv različnih koncentracij 2-AAF na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 2,5, 5, 10 in 20 ter 40, 80 in 160 μ M koncentraciji 2-AAF in nato izvedli test MTT. Tretiranja celic so bila izvedena v petih paralelah. Rezultate smo podali kot OD_{570nm} (\pm STD). * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

Glede na kontrolo je 2-AAF pri najvišji koncentraciji (160 μ M) znižal preživelost HepG2 celic za 82 %, HepG2ECACC celic za 87 % in CaCo2 celic za 80 %. Na HCC1.2 ni deloval citotoksično (Slika 8).

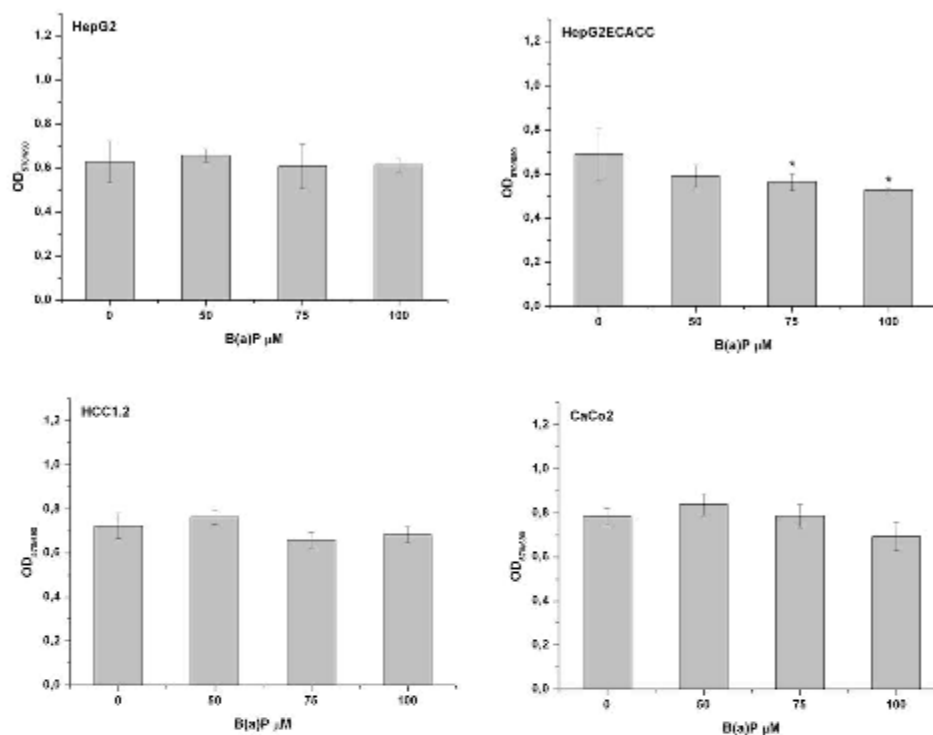


Slika 8: Vpliv različnih koncentracij 2-AAF na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 40, 80 in 160 μM koncentraciji 2-AAF in nato izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživetja celic glede na kontrolo topila. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

4.1.5 Citotoksično delovanje B(a)P

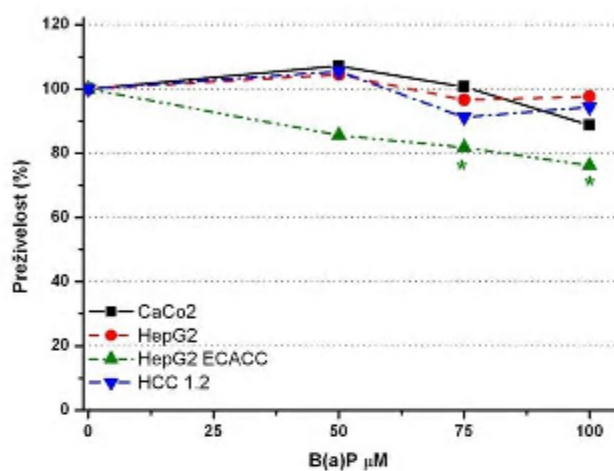
20 urna izpostavitve celic različnim koncentracijam B(a)P je povzročila statistično signifikantno znižanje $\text{OD}_{570/690}$ le pri HepG2ECACC celicah izpostavljenih 75 in 100 μM B(a)P (Slika 9).



Slika 9: Vpliv različnih koncentracij B(a)P na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 50, 75 in 100 μM koncentraciji B(a)P in nato izvedli test MTT. Tretiranja celic so bila izvedena v petih paralelah. Rezultate smo podali kot OD_{570nm} (\pm STD). * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

B(a)P je deloval citotoksično le na celice HepG2ECACC. Pri najvišji koncentraciji 100 μM je bila preživelost celic zmanjšana za 24 % glede na kontrolo, pri koncentraciji 75 μM pa za 19 %. (Slika 10).

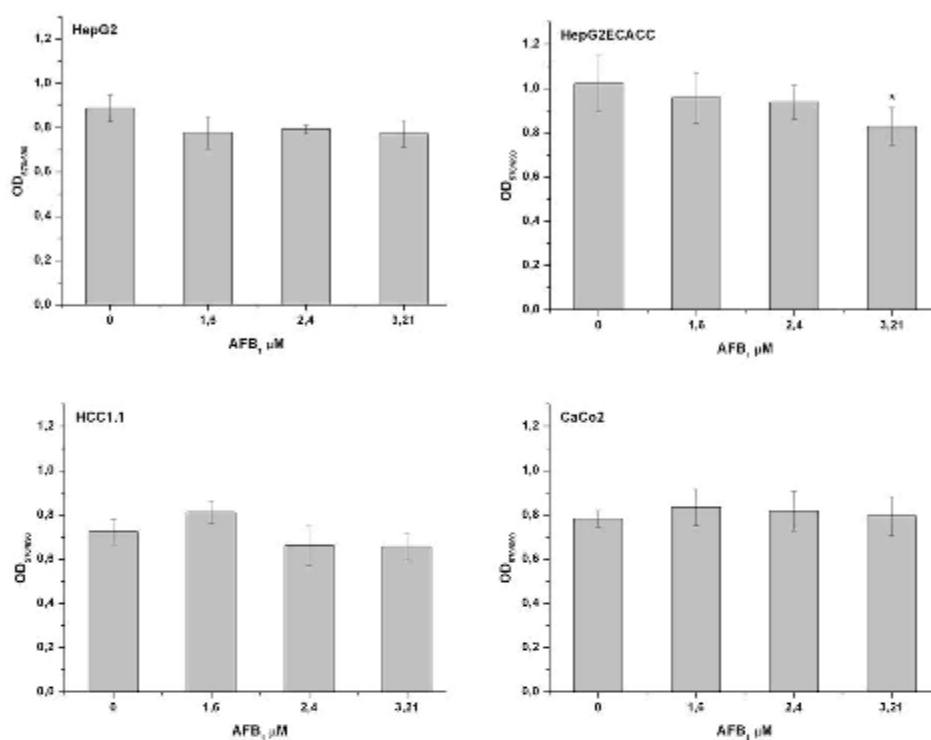


Slika 10: Vpliv različnih koncentracij B(a)P na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 50, 75 in 100 µM koncentraciji B(a)P in nato izvedli test MITT. Rezultati so podani kot % preživetja celic glede na kontrolo topila. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

4.1.6 Citotoksično delovanje AFB₁

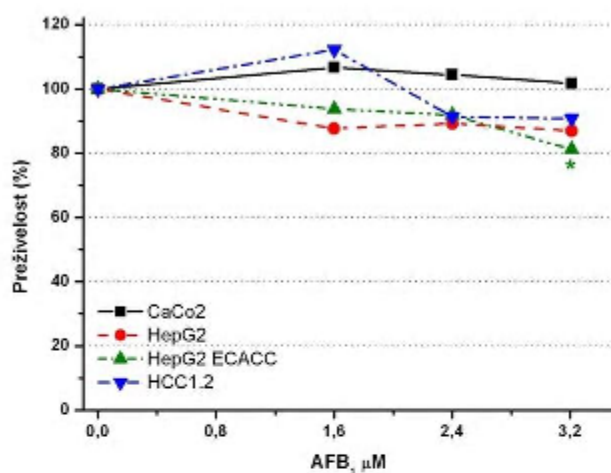
20 urna izpostavitve celic različnim koncentracijam AFB₁ je povzročila statistično signifikantno znižanje OD_{570/690} le pri HepG2ECACC celicah izpostavljenih 3,21 µM (1 µg/mL) AFB₁ (Slika 11).



Slika 11: Vpliv različnih koncentracij AFB₁ na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 1.6, 2.4 in 3.2 µM (0.5, 0.75 in 1 µg/mL) koncentraciji AFB₁ in nato izvedli test MTT. Tretiranja celic so bila izvedena v petih paralelah. Rezultate smo podali kot OD_{570nm} (± STD). * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, p<0.05).

Pri 3,5 µM (1 µg/ml) AFB₁ je statistično značilno vendar le za 19% glede na kontrolo topila zmanjšal preživetje celic HepG2ECACC. Na preživelost ostalih vrst celic ni vplival statistično značilno (Slika 12).

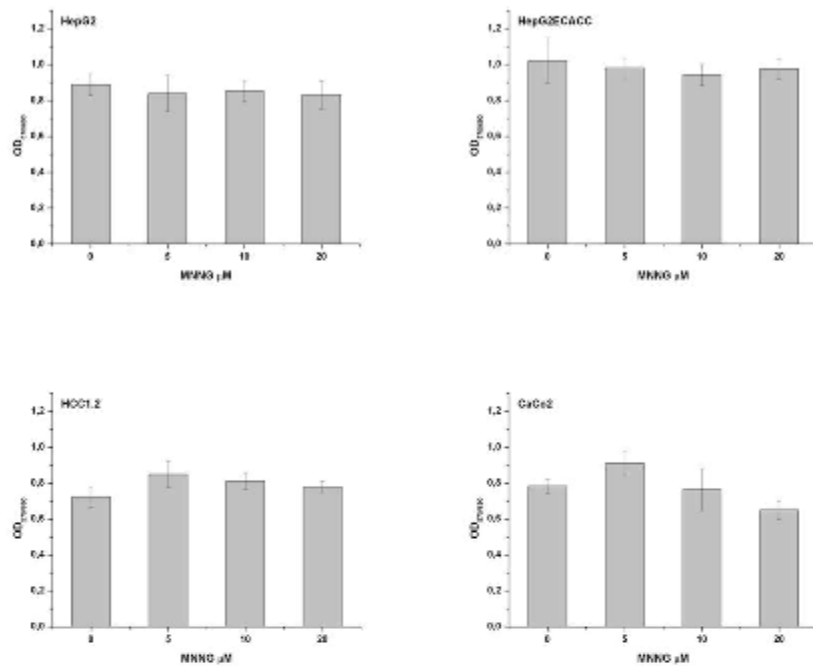


Slika 12: Vpliv različnih koncentracij AFB₁ na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, Caco2 in HCC-1.2.

Celice smo za 20 ur izpostavili 1,6, 2,4 in 3,2 µM (0,5, 0,75 in 1 µg/ml) koncentraciji AFB₁ in nato izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživetja celic glede na kontrolo topila. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0,05$).

4.1.7 Citotoksično delovanje MNNG

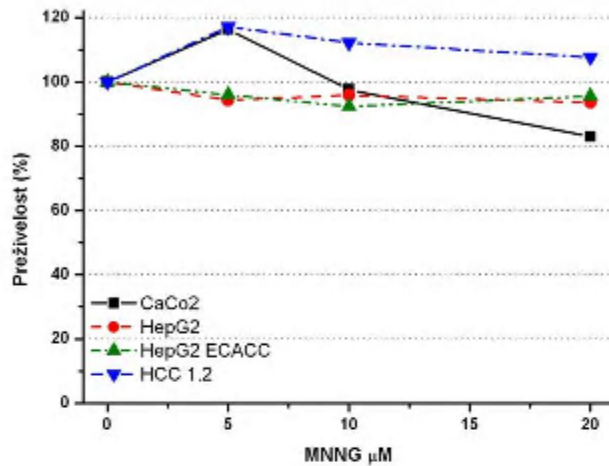
20 urna izpostavljenost celic 5 do 20 µM MNNG ni povzročila statistično signifikantnega znižanja OD₅₇₀₋₆₉₀ pri nobeni od štirih celičnih linij (Slika 13).



Slika 13: Vpliv različnih koncentracij MNNG na preživetje HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic.

Celice smo za 20 ur izpostavili 5, 10 in 20 µM koncentraciji MNNG in nato izvedli test MTT. Tretiranja celic so bila izvedena v petih paralelah. Rezultate smo podali kot OD_{570nm} (± STD). * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

Iz rezultatov je razvidno, da MNNG pri testiranih koncentracijah ni deloval citotoksično na nobeno od uporabljenih celičnih linij (Slika 14).



Slika 14: Vpliv različnih koncentracij MNNG na preživetje celic HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in CaCo2.

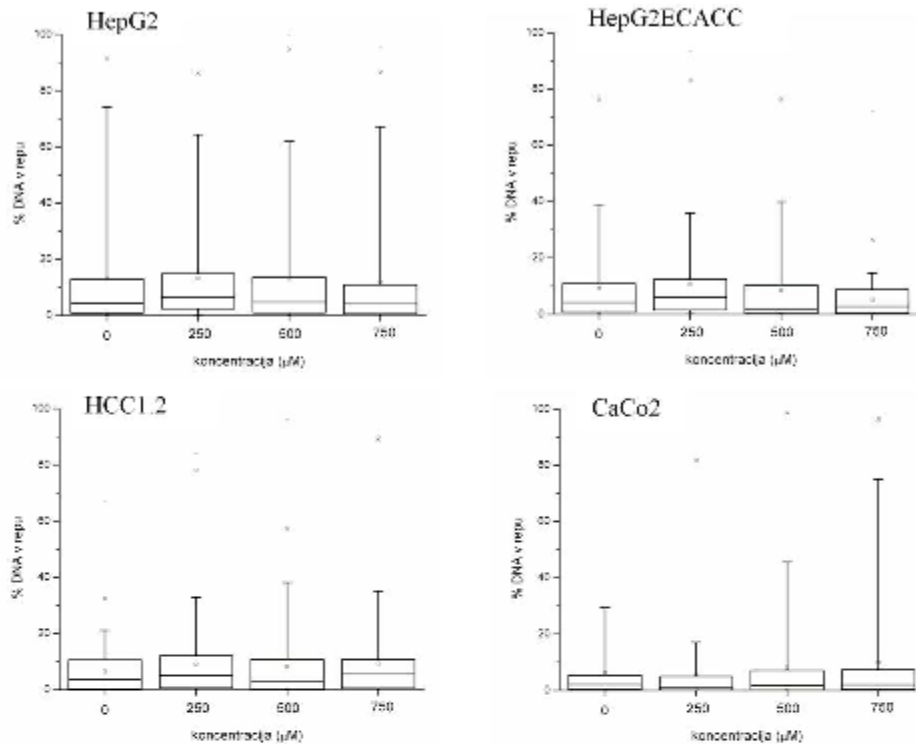
Celice smo za 20 ur izpostavili 5, 10 in 20 μM koncentraciji MNNG in nato izvedli test MTT. Rezultati so podani kot % preživetja celic glede na kontrolo topila. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Studentov-t test, $p < 0.05$).

4.2 TEST KOMET

S pomočjo alkalne različice testa komet smo preverjali genotoksičnost mutagenov na različne celične linije. S testom komet lahko zaznamo prelome verige DNA, alkalno labilna abazična mesta, pa tudi prelome, ki nastajajo zaradi popravljanja poškodb DNA. Celične linije smo inkubirali 20 ur z različnimi koncentracijami mutagenih agensov in nato izvedli test komet.

4.2.1 Genotoksično delovanje IQ

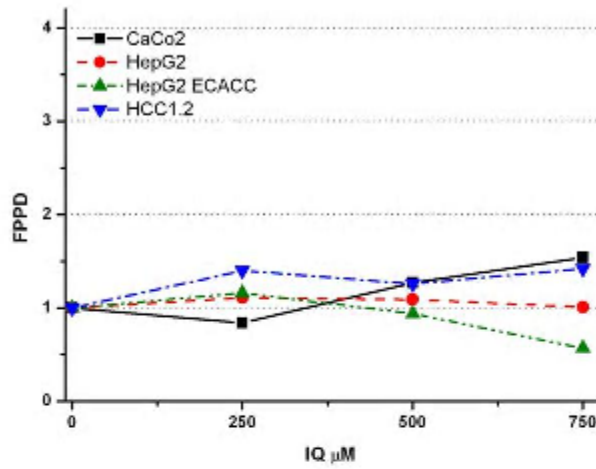
Po 20 urni izpostavitvi celic IQ (250, 500 in 750 μM) nismo opazili povečanja prelomov DNA v primerjavi s kontrolnimi celicami pri nobeni od uporabljenih celičnih linij (Slika 15).



Slika 15: Vpliv različnih koncentracij IQ na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.

Celice smo 20 ur inkubirali z različnimi koncentracijami IQ (250, 500 in 750 µM) in nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat, ter pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Dunnet test, $p < 0.001$).

Iz slike 16 je razvidno, da je poškodovanost DNA netretiranih celic različna pri različnih celičnih linijah. Največjo poškodovanost imajo HepG2 celice, najmanjšo pa CaCo2 celice. Da bi lahko primerjali odzivnost različnih celičnih linij rezultate podajamo tudi kot razmerje med srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov kontrolnih netretiranih celic (Slika 16). Iz slike 16 je razvidno, da se razmerje med srednjima vrednostima odstotka DNA v repu tretiranih celic in odstotka DNA v repu kontrolnih celic – (Faktor povečanja poškodb DNA – FPPD) blizu vrednosti 1.

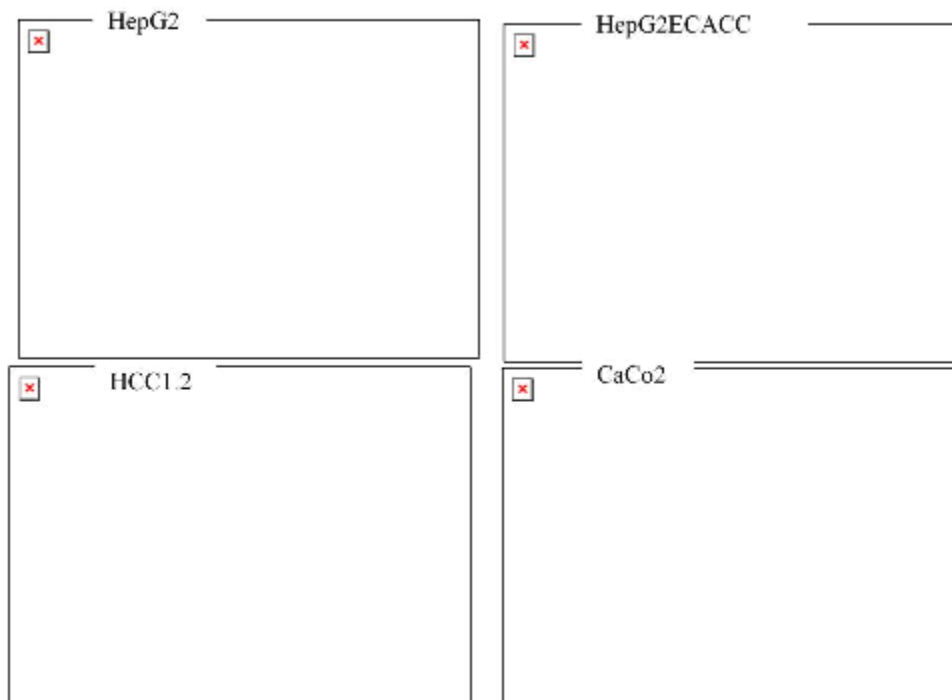


Slika 16: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic IQ.

FPPD je razmerje med srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA repu kometov kontrolnih celic.

4.2.2 Genotoksično delovanje PHIP

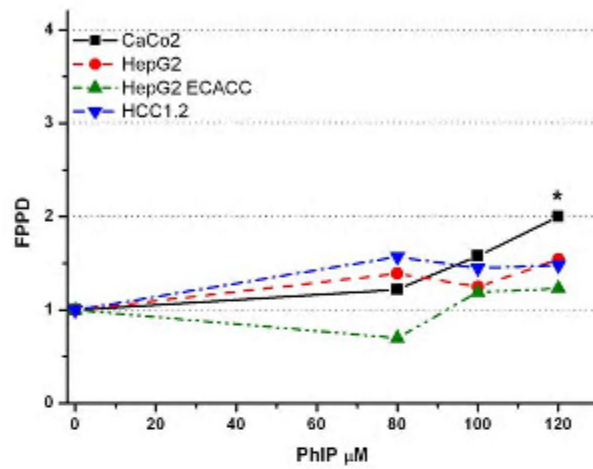
Genotoksičnost PHIP testirali pri koncentracijah 80, 100 in 120 μM . Pri hepatičnih celičnih linijah HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2 ni povzročil signifikantnega povečanja poškodb DNA pri nobeni koncentraciji. Pri CaCo2 celicah pa je v primerjavi s kontrolnimi celicami povzročil signifikantno povečanje odstotka DNA v repu kometa. (Slika 17).



Slika 17: Vpliv različnih koncentracij PhIP na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.

Celice smo 20 ur inkubirali z različnimi koncentracijami PhIP (80, 100 in 120 μ M) in nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat, ter pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Dunnet test, $p < 0.001$).

Iz Slike 18, kjer je prikazan FPPD, je razvidno, da je srednja vrednost odstotka DNA v repu kometov CaCo2 celic tretiranih z 120 mM PhIP še enkrat večja kot v kontrolnih celicah.

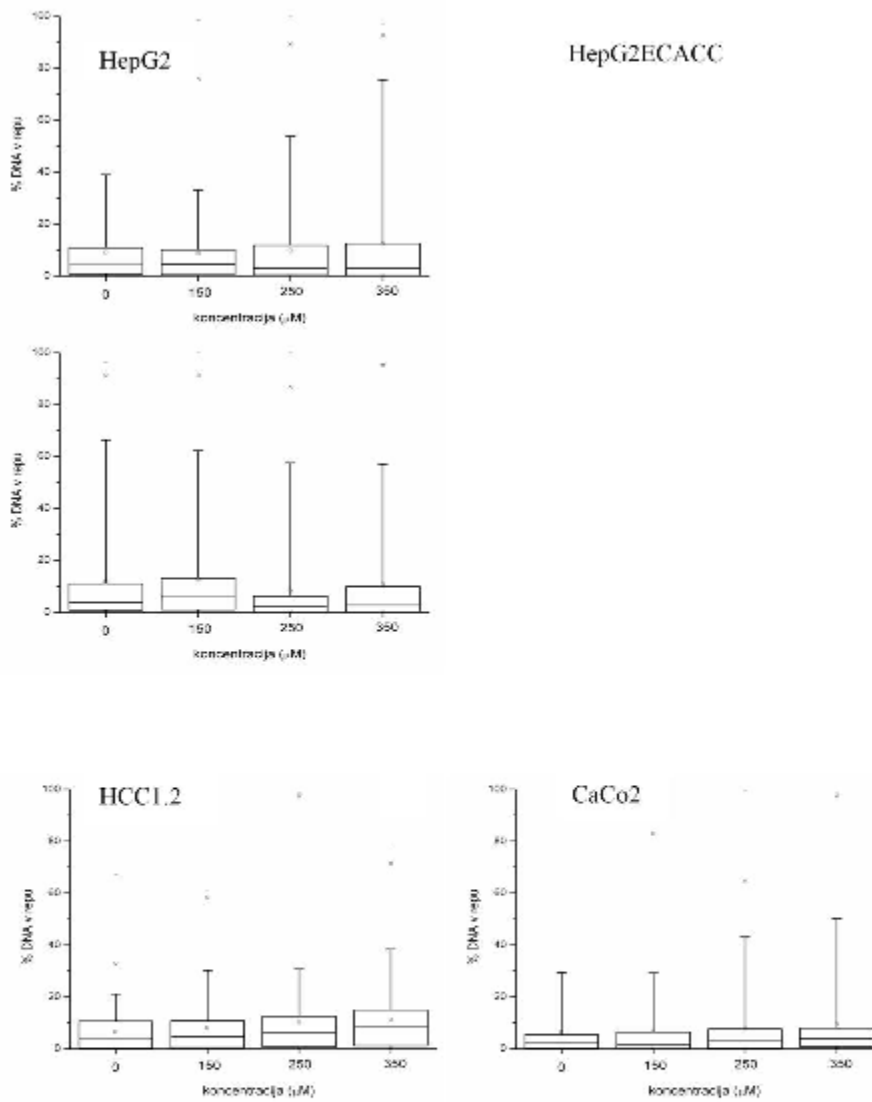


Slika 18: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic IQ.

FPPD je razmerje med srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA repu kometov kontrolnih celic.

4.2.3 Genotoksično delovanje AaC

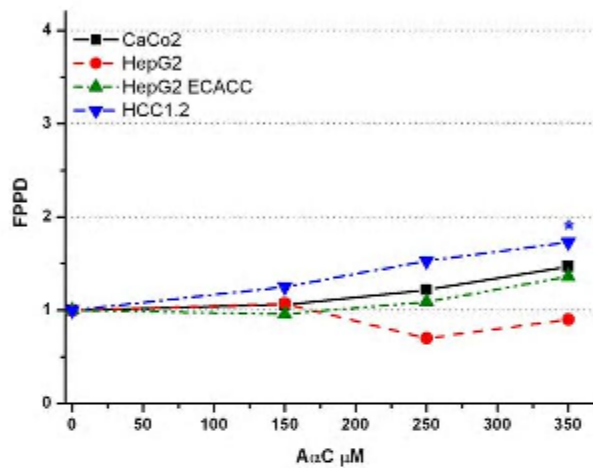
AaC (150, 250 in 350 μM) je povzročil signifikantno povečanje poškodb DNA le pri HCC1.2 celicah pri koncentraciji 350 μM (Slika 19).



Slika 19: Vpliv različnih koncentracij AuC na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.

Celice smo 20 ur inkubirali z različnimi koncentracijami AuC (150, 250 in 350 µM) in nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat, ter pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repto in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enostransko analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Dunnet test, $p < 0.001$).

Iz Slike 20, je razvidno, da je srednja vrednost odstotka DNA v repu kometov HCC1.2 celic tretiranih z 350 μM AaC 1.8 krat večja kot pri kontrolnih celicah.

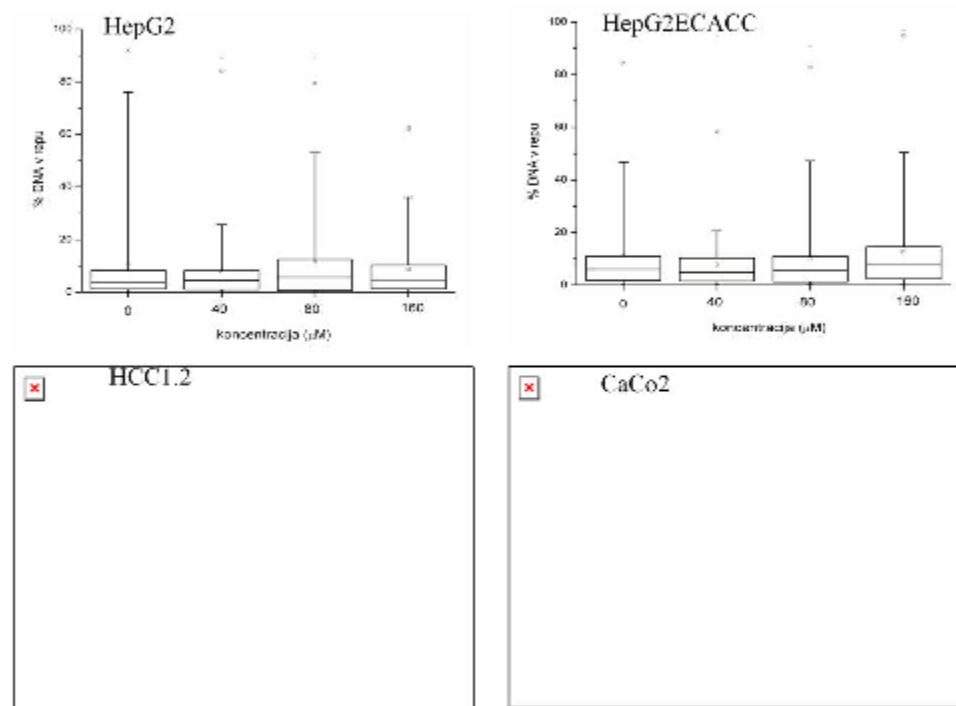


Slika 20: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic IQ.

FPPD je razmerje med srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA repu kometov kontrolnih celic.

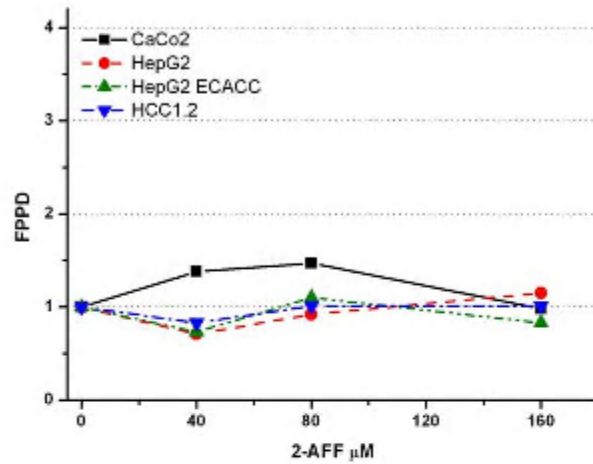
4.2.4 Genotoksično delovanje 2-AAF

2-AAF (40, 80 in 160 μM) ni povzročil poškodb DNA pri nobeni od uporabljenih celičnih linij (Slika 21 in 22).



Slika 21: Vpliv različnih koncentracij 2-AAF na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.

Celice smo 20 ur inkubirali z različnimi koncentracijami 2-AAF (40, 80 in 160 μM) in nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat, ter pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enostransko analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Dunnet test, $p < 0.001$).

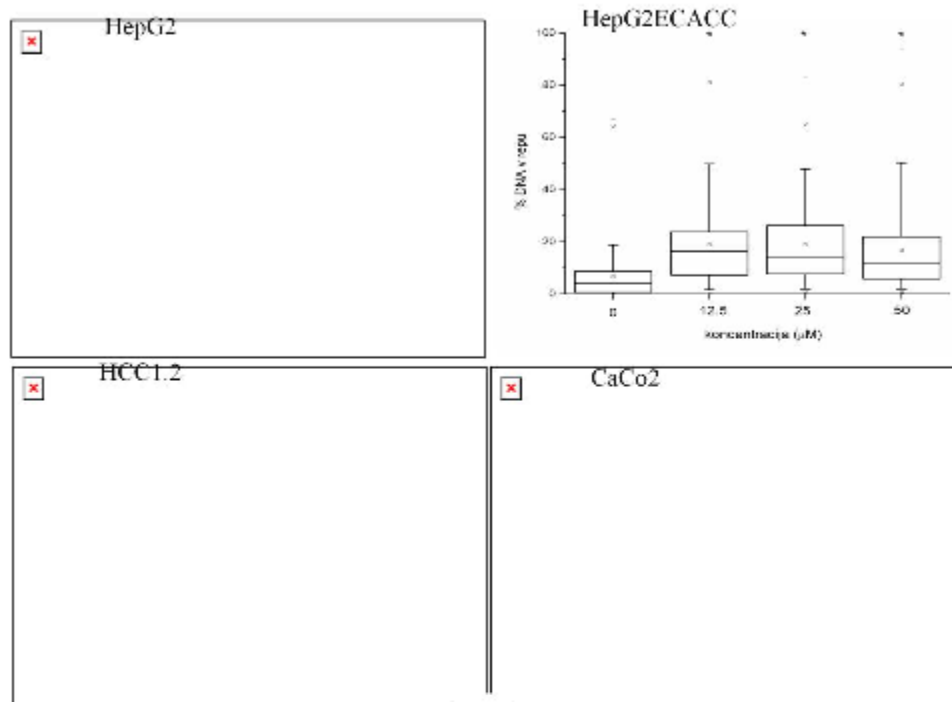


Slika 22: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic 2-AFF.

FPPD je razmerje med srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA repu kometov kontrolnih celic.

4.2.5 Genotoksično delovanje B(a)P

20 urno tretiranje celic z 12.5, 25 in 50 μM B(a)P je povzročilo poškodbe DNA pri vseh štirih celičnih linijah. Pri hepatičnih celičnih linijah HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2 smo zaznali statistično značilno povišanje odstotka DNA v repu kometov pri vseh treh koncentracijah, pri CaCo2 celicah pa pri višjih dveh (25 in 50 mM) (Slika 23).

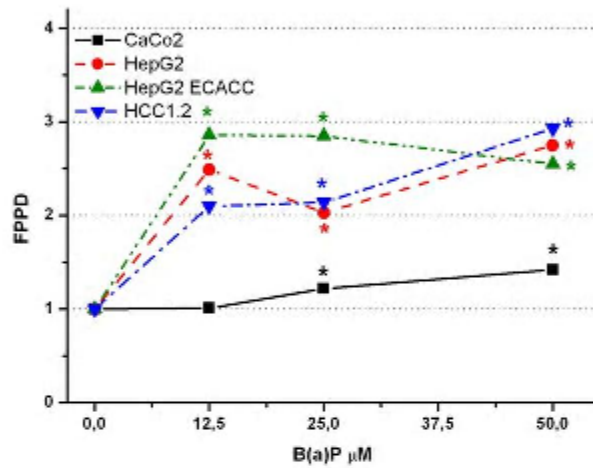


Slika 23: Vpliv različnih koncentracij B(a)P na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.

Celice smo 20 ur inkubirali z različnimi koncentracijami B(a)P (12.5, 25 in 50 µM) in nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat, ter pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Dunnet test, $p < 0.001$).

Vse tri jetrne linije so pokazale podoben odziv na genotoksično delovanje B(a)P. Že pri najnižji koncentraciji 12,5 µM je B(a)P povzročil skoraj trikratno povečanje poškodb DNA v primerjavi z netretiranimi celicami, vendar se z večanjem koncentracije poškodovanost DNA ni bistveno povečala. Genotoksična aktivnost B(a)P odvisna od metabolične aktivacije in verjetna razlaga za to, da poškodovanost DNA ni bila povečana pri višjih koncentracijah B(a)P je v omejeni sposobnosti celic, da presnovijo B(a)P v nukleofilno obliko. Pri CaCo2 celicah je B(a)P sicer induciral signifikantno povečanje

poškodb DNA pri 25 in 50 mM, vendar je bilo povečanje le 1,5 kratno. Manjša občutljivost CaCo2 celic je verjetno posledica manjše metabolične aktivnosti teh celic v primerjavi z jetrnimi celicami (Slika 24).

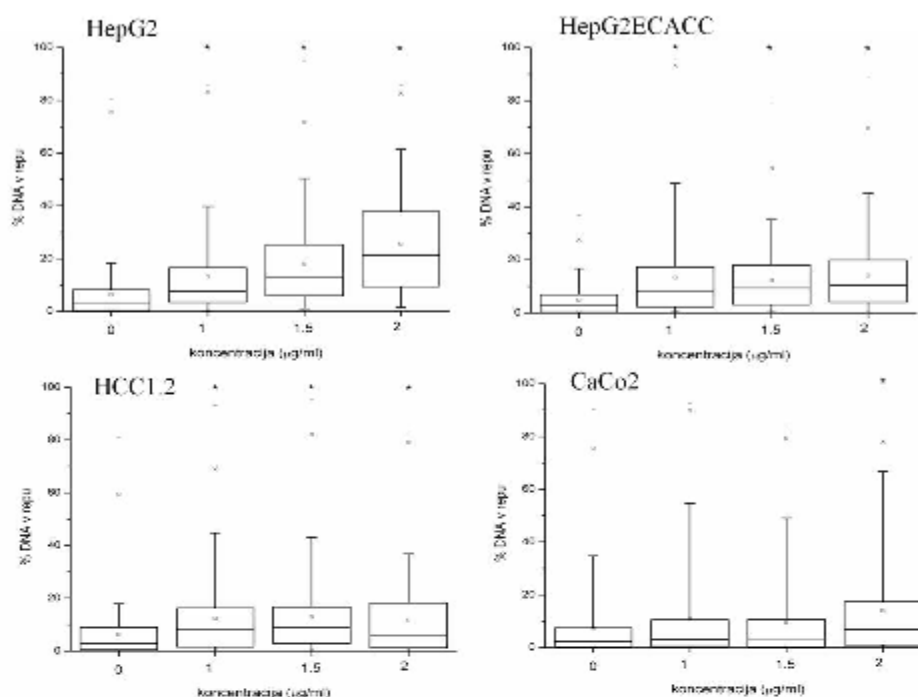


Slika 24: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic B(a)P.

FPPD je razmerje med srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA repu kometov kontrolnih celic.

4.2.6 Genotoksično delovanje AFB₁

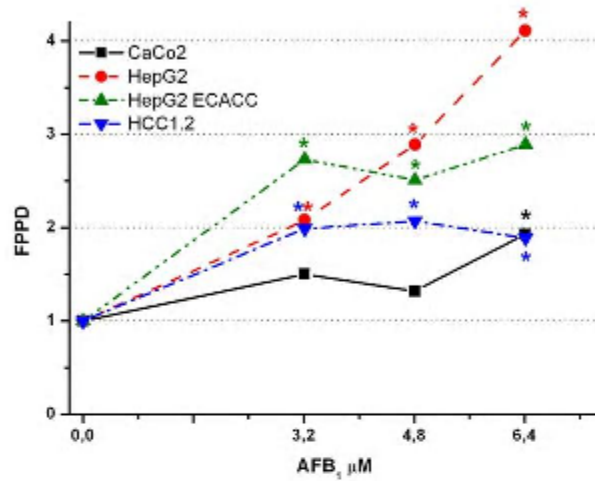
Statistično značilen vpliv AFB₁ na povečanje % DNA v repu smo zaznali pri jetrnih celicah HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2 pri vseh koncentracijah (1, 1.5 in 2 $\mu\text{g/ml}$), pri CaCo2 celicah pa le pri najvišji koncentraciji (Slika 25).



Slika 25: Vpliv različnih koncentracij AFB₁ na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.

Celice smo 20 ur inkubirali z različnimi koncentracijami AFB₁ (1, 1.5 in 2 µg/ml) in nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalim testom comet. Poskus smo ponovili trikrat, ter pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Dunnet test, $p < 0.001$).

Iz Slike 26 je razvidno, da so na genotoksično delovanje AFB₁ najobčutljivejše HepG2 celice. Pri HepG2 celicah je AFB₁ povzročil od doze odvisno povečanje poškodb DNA. Pri najvišji koncentraciji 6,4 µM je bila poškodovanost DNA štirikrat večja kot pri netretiranih celicah. Pri HepG2ECACC celicah je AFB₁ povzročil skoraj trikratno povečano poškodovanost DNA že pri najnižji koncentraciji (3,2 µM), ki pa pri višjih koncentracijah AFB₁ ni narasla. Podobno se vendar le dvakratno povečanje poškodb DNA je AFB₁ povzročil pri HCC1.2 celicah. Pri CaCo2 celicah smo zaznali signifikantno, dvakratno povečanje poškodb DNA le pri najvišji koncentraciji AFB₁.

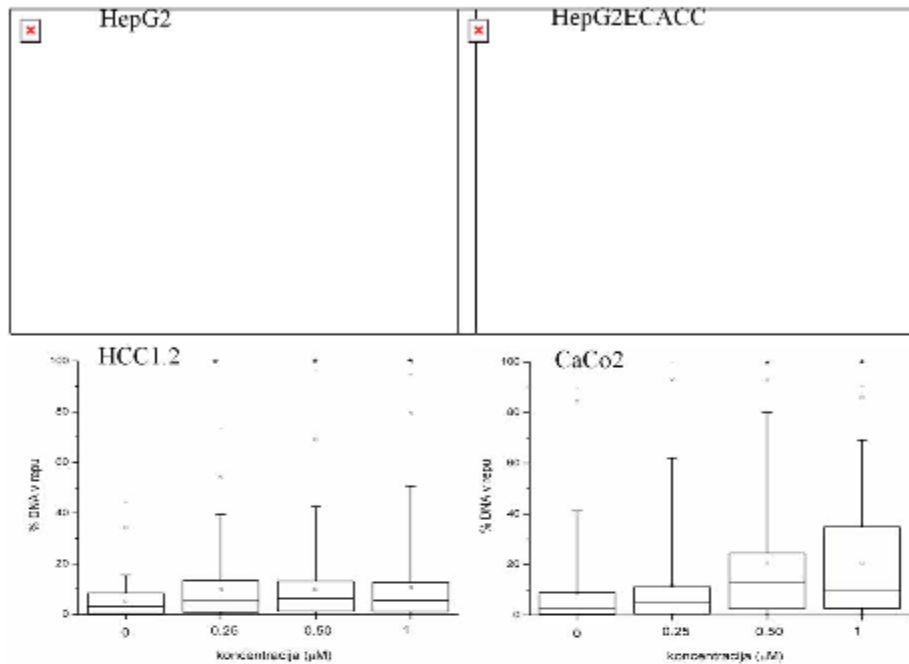


Slika 26: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic AFB₁.

FPPD je razmerje med srednjo vrednostjo odstotkom DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA repu kometov kontrolnih celic.

4.2.7 Genotoksično delovanje MNNG

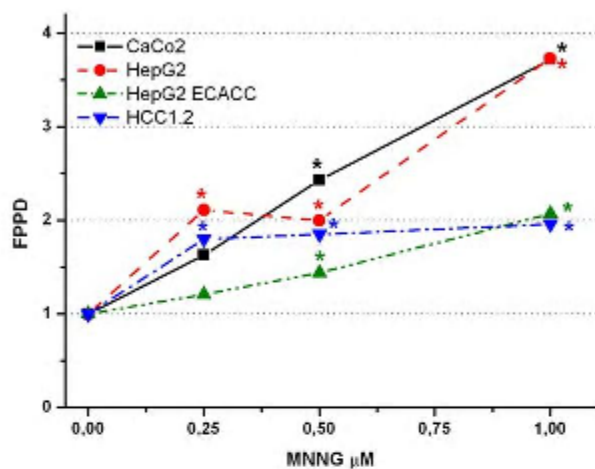
MNNG (0,25, 0,5 in 1 µM) je pri HepG2 in CaCo2 celicah povzročil statistično značilno povečanje odstotka DNA v repu kometov v primerjavi z netretiranimi celicami pri vseh treh koncentracijah, pri HepG2ECACC in HCC1.2 celicah pa pri 0,5 in 1 µM (Slika 27).



Slika 27: Vpliv različnih koncentracij MNNG na nastanek poškodb DNA pri HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celicah.

Celice smo 20 ur inkubirali z različnimi koncentracijami MNNG (0,25, 0,5 in 1 µM) in nato ovrednotili poškodbe DNA z alkalnim testom komet. Poskus smo ponovili trikrat, ter pri vsakem analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot kvartilni box ploti. Z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kuskal-Wallis) smo analizirali razlike med celicami tretiranimi z določeno koncentracijo mutagena in kontrolnimi celicami. * statistično značilna razlika glede na kontrolo (Dunnet test, $p < 0,001$).

HepG2 in CaCo2 celice so na genotoksično delovanje MNNG občutljivejše od HepG2ECACC in HCC1.2. Pri najvišji koncentraciji je MNNG pri HepG2 in CaCo2 celicah povzročil skoraj štirikratno povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolo, medtem, ko je pri HepG2ECACC in HCC1.2 celicah povzročil dvakratno povečanje poškodovanosti DNA (Slika 28).



Slika 28: Faktor povečanja poškodb DNA (FPPD) po izpostavitvi HepG2, HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic MNNG.

FPPD je razmerje med srednjo vrednostjo odstotka DNA v repu kometov tretiranih celic in srednjo vrednostjo odstotka DNA repu kometov kontrolnih celic.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okolju in hrani so prisotne različne nevarne snovi, ki vplivajo na zdravje človeka. Veliko teh snovi je genotoksičnih, kar pomeni da povzročajo poškodbe DNA, in prek teh tudi nastanek raka (Yu in sod., 2006). Posledice ponavljajočega se genotoksičnega stresa so večja verjetnost nastanka mutacij, pospešeno staranje celic, neučinkovito prilagajanje na spremembe življenjskih pogojev, zmanjšanje plodnosti in v najhujšem primeru kancerogeneza in smrt (Petković, 2006). Veliko mutagenov, ki so prisotni v okolju in hrani so prokarcinogeni kar pomeni, da potrebujejo metabolno aktivacijo. Pri tem nastanejo metaboliti, ki se lahko vežejo na DNA. Prav bioaktivacija prokarcinogenov in nastanek aduktov na DNA naj bi bili odgovorni za genotoksične in citotoksične lastnosti teh agensov. Pomembna pomajkljivost standardnih *in vitro* testnih sistemov za ugotavljanje in raziskovanje mehanizmov delovanja potencialnih genotoksičnih karcinogenov je odsotnost presnovnih encimov. Bakterije (*S. typhimurium* in *E. coli*, ki se uporabljata v Amesovem test) presnovnih encimov I in II faze presnove nimajo, večina sesalskih celice pa v *in vitro* pogojih te aktivnosti zgubi. Zaradi tega so raziskave zadnjih let usmerjene v iskanje celičnih linij, ki imajo v *in vitro* pogojih ohranjeno aktivost presnovnega sistema. Jetra so organ, ki najbolj aktivno sodelujejo v metabolizmu telesu tujih snovi in s tem tudi pri aktivaciji indirektnih karcinogenov. Zaradi tega se za raziskave genotoksičnih vplivov ksenobiotikov, ki potrebujejo metabolno aktivacijo, najpogosteje uporabljajo jetrne celice (Plazar in sod., 2007a).

V naši raziskavi smo primerjali občutljivost štirih celičnih linij človeškega izvora, ki imajo delno ohranjeno aktivnost presnovnih encimov, za zaznavanje citotoksičnih in genotoksičnih učinkov izbranih znanih genotoksičnih karcinogenov. Celični liniji HepG2 in HepG2ECACC izvirata iz primarnega hepatoblastoma, celična linija HCC1.2 je bila nedavno izolirana iz primarnega jetrnega karcinoma, celična linija CaCo2 pa izvira iz črevesnega adenokarcinoma. Izbrali smo karcinogene, ki za svoje genotoksično delovanje potrebujejo metabolno aktivacijo: predstavnike heterocikličnih aminove IQ, PhIP in AαC, 2-AAF, ki se uporablja kot modelna snov za raziskave karcinogenosti aromatskih aminov,

predstavnik poliaromatskih ogljikovodikov B(a)P ter mikotoksin AFB₁, ki je eden najmočnejših jetrnih karcinogenov. Testirali smo tudi občutljivost na MNNG, ki pa je direkten mutagen in za genotoksično delovanje ne potrebuje metabolične aktivacije.

5.1.1 Citotoksično delovanje mutagenov na različne celične linije

V naši raziskavi smo citotoksičen vpliv mutagenov na različne celične linije preverjali z MTT tetstom. Pri tem testu mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze metabolno aktivnih celic reducirajo MTT v vijoličaste nevodotopne kristale formazana. Razmerje med količino kristalov in številom živih celic je linearno in zaradi razlik v metabolizmu za posamezne celične linije specifično. Ker smo testirali citotoksičen vpliv indirektnih in direktnih mutagenov smo v poskusih izbrali 20 urni izpostavitveni čas, saj smo želeli da pride do metabolne aktivacije posredno delujočih mutagenov.

Med heterocikličnimi aromatskimi amini prehranskega izvora (HAA), ki smo jih testirali smo ugotovili da je IQ najmanj citotoksičen. Pri koncentracijah pri najvišji koncentraciji 750 μ M je zmanjšal preživelost jetrnih celičnih linij HepG2ECACC in HCC1.2 za okrog 40%, celične linije HepG2 za 20%, na preživelost CaCo2 celic pa ni vplival (Slika 2). Da IQ pri 24 urni izpostavitvi istim koncentracijam IQ ni citotoksičen za HepG2 celice so poročali tudi Plazar in sod. (2007a). PhIP in A α C sta bila bolj citotoksična od IQ saj sta zmanjšala preživelost vseh celičnih linij pri nižjih koncentracijah kot IQ. Podobno citotoksično aktivnost sta pokazala pri HCC1.2 in HepG2ECACC celicah pri vseh testiranih koncentracijah, medtem, ko so bile na citotoksično delovanje PhIP najmanj občutljive HepG2 (Slika 4), na A α C pa CaCo2 celice (Slika 6). Pri najvišji koncentraciji 500 μ M sta PhIP in A α C zmanjšala preživelost HCC1.2 celic za okrog 80%, HepG2ECACC celic pa za 70 oziroma 62%. Pri nižjih koncentracijah: 125 in 250 μ M PhIP ni bil citotoksičen za HepG2 celice, A α C pa za CaCo2 celice.

Literaturnih podatkov o *in vitro* citotoksičnosti HAA za sesalske celične linije je malo in so si pogosto tudi nasprotujoči. Razlog je najverjetneje ta, da so v večini študij uporabljali metabolno neaktivne celice v kombinaciji z različnimi načini eksogene aktivacije. V

nedavni raziskavi so Gooderham in sod. (2007) po 24 urni izpostavitvi ko-kulture MCF10A celic (humani epiteljski adenokarcinom dojke) in človeških limfoblastoidnih celic MCL-5 (ki izražajo metabolne encime) ugotovili, da je PhIP povzročil opazno dozno odvisno inhibicijo rasti celic, ki so jo merili z metodo celične izločitve tripan modrega. Pri 100 μM koncentraciji skoraj za 50% glede na kontrolo. Z metodo določanja sposobnosti tvorbe klonov pa so ugotovili znižanje preživelosti glede na kontrolo za okrog 70%, kar pomeni, da PhIP povzroča dolgotrajne poškodbe celic. Ti rezultati se ujemajo z našimi rezultati o citotoksičnem vplivu PhIP. Poleg tega so Gooderham in sod. (2007) tudi pokazali, da v odsotnosti metabolno aktivnih MCL-5 celic PhIP ni citotoksičen za MCF10A celice, kar potrjuje ključno vlogo metabolične aktivacije pri citotoksičnem delovanju PhIP.

2-AAF, ki je predstavnik karcinogenih aromatskih aminov, smo testirali v koncentracijah od 2.5 do 160 μM . Močan citotoksičen učinek je pokazal le pri najvišji koncentraciji pri HepG2, HepG2ECACC in Caco2 celicah, saj znižal njihovo preživelost za več kot 80% (Slika 8). Na preživelost HCC1.2 celic pa 2-AFF ni imel signifikantnega vpliva. Valentin-Severin in sod (2003) so testirali citotoksičnost 2-AFF s celicami HepG2ECACC z metodo merjenja inhibicije sinteze RNA. Koncentracija 2-AFF, ki je za 50% zmanjšala sintezo RNA (IC_{50}) je bila 112 μM , kar se ujema z našim rezultatom. Podobne rezultate so dobili tudi Sparfel in sod (2002), ki so pokazali, da 2-AFF za 50% zmanjša preživelost podganjih epitelnih jetrnih celic F258 pri koncentraciji 153 μM ter nadalje pokazali, da pri koncentracijah 2-AFF nad 100 μM pride do ustavitve celičnega cikla v G_0/G_1 fazi.

Dobro poznan indirektni mutagen B(a)P je v naši raziskavi pri koncentracijah od 50 do 100 μM šibko citotoksično vplival le na HepG2ECACC celice (Slika 10). Sugihara in sod. (2007) so ugotovili, da B(a)P pri koncentraciji 50 μM in 72 urnem tretiranju ni zmanjšal preživelosti Caco2 celic. To se ujema z našimi rezultati, saj je največja testirana koncentracija 100 μM B(a)P ni signifikantno znižala preživelosti CaCo2 celic. Podoben vpliv smo opazili tudi pri ostalih celičnih linijah. B(a)P je pokazal statistično značilno znižanje preživelosti HepG2ECACC celic pri 75 in 100 μM vendar le za 20 oziroma 24%. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Plazar in sod. (2007a). Citotoksičnost B(a)P so

testirali na rezinah podganjih jeter in ravno tako ugotovili, da pri koncentracijah od 1 do 80 μM B(a)P ne vpliva na celično viabilnost.

Bioaktivacija AFB₁ poteče preko CYP 1A2 in 3A4, pri čemer nastane 8,9-epoksidni metabolit, ki je odgovoren za njegovo toksičnost. V naši raziskavi je AFB₁ pri koncentraciji 3.2 μM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) za okrog 20% zmanjšal le preživelost HepG2ECACC celic, medtem, ko na ostale celične linije ni deloval citotoksično (Slika 12). Guillouzo in sod. (2007) so z MTT testom ugotovili, da za HepG2ECACC celice AFB₁ ni bil citotoksičen pri koncentracijah do 100 μM in izpostavitvi 96 ur. Za razliko od Guillouza in sod. (2007) so McKean in sod. (2006) v svoji raziskavi ugotovili, da je 1 μM AFB₁ (3.2 μM) po 24 urni izpostavitvi zmanjšal preživelost celic HepG2 za 50% glede na kontrolo (IC_{50} 1.0 μM AFB₁).

Edini direktni mutagen, ki smo testirali je bil MNNG. MNNG za svojo aktivnost ne potrebuje metabolne aktivacije, ampak metilira vse kisikove in večino dušikovih atomov na DNA. MNNG pri testiranih koncentracijah (5 do 20 μM) na nobeno testirano celično linijo ni imel citotoksičnega vpliva (Slika 14). Rezultat je pričakovan, saj MNNG spada v skupino tako imenovanih S_N1alkilirajočih dejavnikov. Značilno za S_N1 alkilirajoče dejavnike v primerjavi z S_N2 je, da alkilirajo relativno več O⁶ atomov gvanina, ki so zelo mutagene vendar necitotoksičen poškodbe in zato pri nizki citotoksičnosti izražajo visoko genotoksično aktivnost.

5.1.2 Genotoksično delovanje mutagenov na različne celične linije

Genotoksičnost mutagenih agensov na celične linije HepG2, HepG2ECACC, HCC-1.2 in Caco2, smo preverjali z alkalno različico testa komet. 20 urni izpostavitveni čas smo izbrali, ker smo ugotovljali smo želeli, da pride do metabolne aktivacije indirektnih mutagenov. V tem času lahko pride do poškodb genetskega materiala, ki se bodo ohranile in lahko privedejo do mutacij. Po drugi strani, pa je ta čas dovolj dolg, da lahko pride tudi do popraviljanja nastalih poškodb. Zaradi tega je slabost uporabe tako dolgega časa

izpostavitve, da nam test ne omogoča zaznavanja kratkoživečih poškodb, ki se v času izpostavitvenosti popravijo (Petković, 2006).

Heterociklični amini IQ, PhIP in AαC pri necitotoksičnih koncentracijah niso povzročili prelomov DNA pri nobeni celični liniji. Pri CaCo2 celicah smo zaznali signifikantno povečanje poškodb DNA pri koncentraciji 120 μM PhIP (Slika 18) pri kateri pa je bila preživelost zmanjšana za 40%, pri HCC1.2 pa je AαC inducirala signifikantno povečanje poškodb DNA pri 350 μM (Slika 20), pri kateri je bila preživelost zmanjšana za okrog 50%. Zaradi tega v teh dveh primerih ne moremo z zanesivostjo trditi, da gre za neposreden genotoksični učinek, saj so prelomi DNA lahko tudi posledica nekrotskih ali apoptotskih procesov. Plazar in sod. (2007a) so celice HepG2 za 24 ur izpostavili IQ (500-2000 μM) in ugotovili dozno odvisne poškodbe DNA, vendar pri koncentracijah nad 1000 μM. Pri enako tretiranih svežih rezinah podganjih in človeških jeter, ki imajo visoko metabolno aktivnost, smo ugotovili genotoksičen odziv pri nižji koncentraciji IQ (500 μM), pa tudi obseg poškodovanosti je bil bistveno večji kot pri HepG2 celicah. Nasprotno pa so Uhl in sod. (2000) po 24 urni izpostavitvi HepG2 celic IQ zaznali poškodbe DNA že pri koncentraciji 300 μM, vendar so namesto % DNA v repu kot parameter za oceno poškodovanosti DNA uporabili dolžino repa. IQ in PhIP nista povzročila prelomov DNA pri človeških črevesnih epitelih celicah, metem ko je PhIP povzročil poškodbe DNA pri podganjih črevesnih epitelih celicah (Pool-Zobel in sod., 1997). Predvidevali so, da do odziva ni prišlo, ker imajo človeške črevesne epitelne celice zelo nizko aktivnost CYP1A encimov. Več raziskav je pokazalo, da so HAA razmeroma slabi povzročitelji prelomov DNA in veliko aktivnejši povzročitelji tvorbe mikronukleusov. Dokazali so da PhIP pri HepG2 celicah inducira tvorbo mikronukleusov po 24 urni izpostavitvi, pri koncentraciji $\geq 25 \mu\text{M}$. Pfau in sod. (1999) so pri metabolno aktivnih humanih limfoblastoidnih celicah MCL-5 celicah izpostavljenih IQ, PhIP, AαC in tudi drugim HAA zaznali tvorbo mikronukleusov že pri nanomolarnih koncentracijah, medtem, ko so tvorbo prelomov DNA zaznali pri mikromolarnih koncentracijah.

2-AAF, ki se sicer veliko uporablja kot pozitivna kontrola pri raziskavah karcinogenosti in mutagenosti aromatskih aminov ni povzročil poškodb DNA pri nobeni celični liniji (Slika

22). Valentin-Severin in sod. (2003) so prišli do enakih rezultatov, ko so 20 ur tretirali celice HepG2 z 2-AFF (10-125 μM). Enako so ugotovili tudi Yusuf in sod. (2000) po 24 urnem tretiranju, metem, ko so po 72 urni izpostavljenosti zaznali signifikantno povečanje poškodovanosti DNA. V nasprotju s testom komet pa 2-AAF v mikronukleus testu kaže zelo visoko aktivnost (Valentin-Severin in sod. 2003). Negativni rezultati pri testu komet so tako v primeru HAA, kot tudi 2-AFF lahko posledica dejstva, da se reaktivni metaboliti vežejo z DNA in tvorijo adukte, ki jih s komet testom ne zasledimo ali pa da lahko celice te adukte popravijo v tako dolgem izpostavitvenem času (Valentin-Severin in sod. 2003). Za ugotavljanje celične sposobnosti popravljanja poškodb DNA se uporablja USD test (angl. The unscheduled DNA synthesis test). Valentin-Severin in sod. (2004) so ta test uporabili za preverjanje sposobnosti popravljanja poškodb DNA pri HepG2 celicah. Ugotovili so da 2-AAF povzroča signifikantno DNA-popravljalno aktivnost pri koncentracijah od 0,1 do 1 μM . Rezultati kažejo, da komet test verjetno ni primerna metoda za zaznavanje in raziskave genotoksičnosti HAA in aromatskih aminov med katere spada 2-AFF.

Pri uporabi celic HepG2 v različnih študijah genotoksičnosti so pri testu komet B(a)P pogosto uporabili kot pozitivno kontrolo (Volčič, 2006). Tudi v naši raziskavi je ta mutagen povzročil poškodbe DNA pri vseh celičnih linijah. Celične linije jetrnega izvora: HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2 so bile bisveno bolj občutljive kot črevesne celice CaCo2 (Slika 24). B(a)P je prokarcinogen, ki ga aktivirajo predvsem CYP1A1 in/ali CYP3A4, pa tudi mikrosomske epoksidne hidrolaze. Naša raziskava kaže, da imajo jetrne celične linije bolj aktivne encime I in II faze kot črevesne CaCo2 celice, zaradi česar bolje metabolizirajo B(a)P. Pri tem nastajajo metaboliti, ki tvorijo adukte na DNA in tako povzročijo poškodbe. Dozno odvisni vpliv na povečanje poškodb DNA po 20 urni izpostavitvi HepG2 celic 1-25 μM B(a)P so ugotovili tudi Valentin-Severin in sod. (2003). Do podobnih rezultatov pa so prišli v svoji raziskavi tudi Plazar in sod. (2007a), ki so celice HepG2 24 ur tretirali z B(a)P od 10 do 100 μM .

Naši rezultati so pokazali, da je toksin AFB₁ pri vseh celičnih linijah povzročil povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolnimi celicami (Slika 26). Podobno, kot pri B(a)P so bile tudi pri AFB₁ jetrne celične linije občutljivejše od črevesnih CaCo2 celic. Pri jetrnih

celičnih linijah je AFB₁ povzročil statistično signifikantno povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolnimi celicami pri vseh koncentracijah, pri CaCo2 pa le pri najvišji koncentraciji (2 µg/ml = 6,4 µM). Največje povečanje poškodb DNA je povzročil pri HepG2 celicah, medtem, ko sta bili celični liniji HCC-1.2 in HepG2ECACC nekoliko manj odzivni pri višjih koncentracijah AFB₁ (Slika 26). Iz tega lahko sklepamo, da imajo jetrne celične linije dobro aktivne tiste encime, ki sodelujejo pri metaboli aktivaciji AFB₁. Glavni encimi, ki sodelujejo pri metabolizmu AFB₁ pri človeku so CYP1A2, 3A4, 3A5, 3A7 in GSTM1 encimi, sodelujejo pa tudi drugi (Aflatoxins (Group 1)..., 2002). Tudi Majer in sod. (2004) so z mikronukleus testom ugotovili da ima AFB₁ dozno-odvisni učinek na celice HepG2. Po 24 urni izpostavitvi celic je imel pri koncentracijah 0.5 in 10 µM signifikanten učinek.

Kot mutagen, ki ne potrebuje metabolne aktivacije smo v naši raziskavi uporabili MNNG. Ta spada med monofunkcionalne S_N1 alkilirajoče agense, ki primarno ne povzročajo verižnih prelomov DNA. Te spojine alkilirajo več pozicij na bazah DNA. Alkilacija povzroči modifikacijo baz in oslabi N-glikozidno vez, ki vodi do depurinacije/depurimidacije in nastanka alkalno labilnih abazičnih mest. AP endonukleaze odstranijo ta mesta, kar prelomi verigo DNA in nastanejo enoverižni prelomi DNA (Horváthová in sod., 1998). Zaradi narave poškodb, ki jih povzroča MNNG je test komet dovolj občutljiva in dobra metoda za preverjanje genotoksičnosti tega mutagena. MNNG je pri testiranih koncentracijah (0.5 do 1 µM) pri vseh celičnih linijah povzročil signifikantno povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolnimi celicami. CaCo2 in HepG2 celice so bile občutljivejše od HepG2ECCAC in HCC1.2 celic (Slika 28). Horvatova in sod. (1998) so ugotovili, da 1 in 2 µg/ml MNNG povzroča povečanje poškodb DNA pri CaCo2 celicah, ter 0.5, 1 in 2 µg/ml MNNG pri V79 celicah (angl. Chinese hamster lung fibroblasts). To se ujema z rezultati dobljenimi v naši *in vitro* raziskavi.

Naša raziskava kaže, da se testirane celične linije razlikujejo v njihovi občutljivosti na citotoksične in genotoksične učinke mutagenov, kar je deloma posledica različnega izražanja presnovnih encimov, potrebnih za njihovo aktivacijo. Jetrni celični liniji HepG2 in HepG2ECACC sta pokazali primerljivo občutljivost za zaznavanje posredno delujočih

mutagenov, kar ni presentljivo saj gre le za različna kloni celic istega izvora. Nedavno izolirana jetrna celična linija HCC1.2, ki naj bi imela nekatere prednost pred HepG2 celicami predvsem glede stabilnosti genoma, se je pokazala kot nekoliko manj občutljiva. Najmanj občutljive pa so bile Caco2 celice.

Alkalna različica testa komet je občutljiva metoda za določanje genotoksičnosti kemikalij. Poškodbe DNA, ki jih lahko zaznamo z alkalno različico testa komet so dvojni in enojni prelomi DNA, ter alkalno labilna mesta, ko pa so lahko le prehodno prisotne. Vsi ti prelomi lahko nastanejo tudi kot posledica celičnih DNA popravilnih mehanizmov kot sta nukleotidno (NER) in bazno (BER) izražovanje (Collins in sod., 1997, cit. po Volčič, 2006). Mutageni agensi večinoma povzročajo nastanek aduktov na DNA in če na tem mestu ni prišlo do preloma DNA verige bodisi zaradi prekinitve sinteze DNA ali pa kot vmesna stopnja pri popravljanju poškodbe, takšne poškodbe s testom komet ne zaznamo. Poleg tega je pri komet tesu izredno pomembno, po kašnem času izpostavljenosti analiziramo poškodovanost jeder, saj se lahko kratkoživeče poškodbe, kot so na primer enoveržni prelomi in oksidativne poškodbe izrečno hitro popravijo in jih pri daljši izpostavljenosti ne zaznamo, medtem, ko se druge vrste poškodbe, kot so na primer veliki adukti, ki se počasi popravljajo, izrazijo kot prelomi DNA šele po daljšem času. V naši raziskavi z nobeno celično linijo nismo zaznali genotoksične aktivnosti HAA in 2-AFF, čeprav pozitivni rezultati dobljeni z B(a)P in AFB₁ kažejo, da so vsaj jetrne celice metabolno aktivne. Zaradi tega sklepamo, da komet test ni primeren za detekcijo genotoksičnosti tovrstnih spojin. Morda bi lahko zaznali genotoksičnost teh snovi, če bi spremenili čas tretiranja ali pa z različico komet testa z inhibitorji DNA reparacije. Vendar, kot kažejo raziskave drugih avtorjev je za detekcijo genotoksičnosti HAA, pa tudi nekaterih drugih spojin mikronukleus test občutlivejša metoda (Přau in sod., 1999, Valentin-Severin in sod., 2003). Torej, da bi ugotovili ali so te celice primerne za zaznavanje genotoksičnosti HAA bi bilo potrebno to raziskavo nadgraditi še z mikronukleus testom.

5.2 SKLEPI

- ◆ Po 20 urni izpostavitvi HepG2; HepG2ECACC, HCC1.2 in CaCo2 celic različnim koncentracijam HAA smo z MTT testom ugotovili, da je najmanj citotoksičen IQ, PhIP in A α C pa sta pokazala podobno citotoksično aktivnost. CaCo2 celice so bile manj občutljive na citotoksično delovanje IQ in A α C, kot jetrne celične linije.
- ◆ Po 20 urni izpostavitvi celic različnim koncentracijam aromatskega amina 2-AFF smo ugotovili njegovo citotoksično delovanje le pri najvišji koncentraciji (160 μ M) pri HepG2, HepG2ECACC in Caco2 celicah.
- ◆ Poliaromatski ogljikovodik B(a)P in mikotoksin AFB₁ sta delovala šibko citotoksično le na HepG2ECACC celice.
- ◆ Edini direkten mutagen MNNG ni imel citotoksičnega vpliva na nobeno celično linijo.
- ◆ Z testom komet smo po 20 urni izpostavitvi celic različnim koncentracijam HAA ter 2-AFF ugotovili, da pri necitotoksičnih koncentracijah nobeden ni povzročil povečanja poškodb DNA pri nobeni celični liniji.
- ◆ B(a)P je pri vseh testiranih koncentracijah (12,5 do 50 μ M) povzročil statistično signifikantno skoraj trikratno povečanje poškodb DNA pri jetrnih celicah HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2. Pri črevesnih celicah CaCo2 je pri najvišji koncentraciji povzročil le 1.5 kratno povečano poškodovanost DNA v primerjavi s kontrolnimi celicami.
- ◆ AFB₁ (1, 1.5, 2 μ g/ml) je pri vseh celicah povečal poškodovanost DNA glede na kontrolo. Največji, dozno-odvisni učinek smo opazili pri HepG2 celicah. Pri HepG2ECACC in HCC-1.2 celicah so vse koncentracije povzročile približno enako povečanje poškodb DNA glede na kontrolo, vendar je bil to večje pri HepG2ECACC celicah.
- ◆ MNNG (5, 10, 20 μ M) je imel genotoksičen vpliv na vse celice, vendar je bilo povečanje poškodb DNA pri HepG2 in CaCo2 celicah pri najvišji koncentraciji še enkrat večje kot pa pri HepG2ECACC in HCC-1.2 celicah.
- ◆ S komet testom lahko z vsemi tremi celičnimi linijami jetrnega izvora: HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2 zaznamo genotoksično delovanje indirektnih mutagenov

B(a)P in AFB₁ in so primerne za zaznavanje in raziskovanje mehanizmov delovanja tovrstnih kemikalij .

- ◆ CaCo2 celice niso pokazale dovolj občutljivosti za zaznavanje genotoksičnih učinkov indirektnih mutagenov B(a)P in AFB₁, najverjetneje zaradi manjše metabolične aktivnosti..
- ◆ S komet testmo nismo z nobeno celično linijo nismo zaznali genotoksičnega delovanja indirektnih mutagenov HAA in 2-AFF. Vendar pa je možno, da poškodbe DNA (nastanek aduktov na DNA molekuli), ki jih povzročajo te snovi ne vodijo v nastanek prelomov DNA in zato komet test ni primerna metoda za zaznavanje genotoksičnosti teh spojin.
- ◆ Pri raziskavi genotoksičnega vpliva mutagenov na celične linije bi bilo smiselno poleg testa komet uporabiti še kakšno drugo metodo (npr. mikronukleus test).

6 POVZETEK

Veliko epidemioloških študij je pokazalo, da ima prehrana in onesnaženost okolja velik vpliv pri etiologiji raka ljudi, zaradi pogoste prisotnosti snovi, ki povzročajo poškodbe DNA. Zaradi škodljivih vplivov teh snovi na človeka je pomembno, da tovrstne snovi pravočasno zaznamo, za kar so potrebni ustrezni testni sistemi. V tej nalogi smo proučevali občutljivost različnih, metabolno aktivnih jetrnih celičnih linij, (HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2) in črevesne (CaCo2) celične linije za citotoksičnost in genotoksičnost znanih genotoksičnih karcinogenov. Testirali smo heterociklične amine prehranskega izvora IQ, PhIP, AαC, aromatski amin 2-AAF, poliaromatski ogljikovodik B(a)P, mikotoksin AFB₁ in alkilirajoči mutagen MNNG. Vsi testirani mutageni razen MNNG potrebujejo za izražanje svojih citotoksičnih in genotoksičnih lastnosti metabolno aktivacijo. Njihovo aktivacijo povzročijo encimi kot so citokromi P450 (CYP), glutation-S-transferaze (GST), sulfottransferaze (SULT), N-acetiltransferaze (NAT) in UDP-glukuronosiltransferaze (UGT). Pri metabolni aktivaciji nastanejo metaboliti, ki tvorijo aukte na DNA in jo s tem poškodujejo. Ti mutageni tako lahko vplivajo le na tiste celice, pri katerih so ti encimi prisotni.

Citotoksičnost mutagenov smo določali z testom MTT. S to metodo posredno zaznavamo žive celice prek merjenja pretvorbe MTT soli v formazan, ki jo katalizira mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza živih celic. Pri statistični obdelavi rezultatov smo uporabili studentov-t test. $p < 0,05$ smo določili za statistično značilno razliko skupin celic tretiranih z določenim mutagenom glede na kontrolno skupino celic. Za določanje genotoksičnosti mutagenov smo uporabili alkalni test komet, ki je občutljiva metoda ki omogoča zaznavanje verižnih prelomov DNA in alkalno labilnih mest na ravni posamezne celice. Za statistično analizo razlik med poškodovanostjo DNA (% DNA v repu komete) celic tretiranih z mutageni in kontrolnih celic smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis), za primerjavo median odstotka DNA v repu pa smo uporabili test Dunnett, pri čemer smo $p < 0,001$ določili kot statistično značilno razliko.

Citotoksičnost smo ugotavljali z MTT testom po 20 urni izpostavitvi različnim koncentracijam mutagenov. Rezultati so pokazali, da je izmed HAA najmanj citotoksičen IQ, ki je pri najvišji koncentraciji (750 μM) zmanjšal preživelost jetrnih celičnih linij za okrog 35%, na preživelost CaCo2 celic pa ni vplival. PhIP in A α C sta pokazala podobno citotoksično aktivnost. Pri najvišji koncentraciji (500 μM) sta PhIP in A α C zmanjšala preživelost jetrnih celic za 60 do 80%. Preživelost CaCo2 celic je PhIP zmanjšal za 70%, A α C pa za 32%. 2-AAF je deloval citotoksično le pri najvišji (160 μM) koncentraciji. Za 80% je zmanjšal preživelost HepG2, HepG2ECACC in Caco2 celic, na preživelost HCC1.2 celic pa ni vplival. B(a)P in AFB₁ sta delovala šibko citotoksično le na HepG2ECACC celice; pri najvišji koncentraciji 100 μM oz 1 $\mu\text{g/ml}$ sta znižala njihovo preživelost za 20%. MNNG ni imel citotoksičnega vpliva na nobeno celično linijo.

S komet testom smo ugotovili, da 20 urna izpostavljenost celic HAA (IQ, PhIP in A α C) in aromatskemu aminu 2-AAF ni povzročila genotoksičnih učinkov. Signifikantno povečanje poškodb DNA smo zaznali pri najvišji koncentraciji PhIP (120 μM) pri CaCo2 celicah in pri najvišji koncentraciji A α C (350 μM) pri HCC1.2 celicah, vendar so bile te koncentracije tudi citotoksične. B(a)P je pokazal izrazito genotoksično delovanje pri vseh koncentracijah (12,5 do 50 μM) pri HepG2, HepG2ECACC in HCC1.2 celicah. Pri Caco2 celicah pa je le rahlo povečal poškodovanost DNA pri višjih dveh koncentracijah. Tudi AFB₁ je pri vseh celicah povečal nastanek poškodb DNA glede na kontrolo. Dozno-odvisni učinek smo opazili pri vseh testiranih koncentracijah (0,5, 0,75, 1 $\mu\text{g/ml}$) pri HepG2 celicah. Pri HepG2ECACC in HCC-1.2 celicah so vse koncentracije povzročile približno enako povečanje poškodb DNA glede na kontrolo, vendar je bilo to večje pri HepG2ECACC celicah. MNNG (5, 10, 20 μM) je imel genotoksičen vpliv na vse celice pri čemer je bila poškodovanost DNA najbolj povečana pri CaCo2 in HepG2 celicah.

Raziskava je pokazala, da se celične linije razlikujejo glede občutljivosti na citotoksične in genotoksične učinke različnih mutagenov, kar je deloma posledica različnega izražanja presnovnih encimov, potrebnih za njihovo aktivacijo. Jetrni celični liniji HepG2 in HepG2ECACC sta pokazali primerljivo občutljivost za zaznavanje posredno delujočih mutagenov B(a)P in AFB₁, kar ni presentljivo saj gre le za različna kloni celic istega

izvora. Nedavno izolirana jetrna celična linija HCC1.2, ki naj bi imela nekatere prednost pred HepG2 celicami predvsem glede stabilnosti genoma, se je pokazala kot nekoliko manj občutljiva. Najmanj občutljive pa so bile Caco2 celice.

Alkalna različica testa komet je občutljiva metoda za določanje genotoksičnosti kemikalij. Vendar je naša raziskava je pokazala, da z nobeno celično linijo nismo zaznali genotoksične aktivnosti HAA in 2-AFF, čeprav pozitivni rezultati dobljeni z B(a)P in AFB₁ kažejo, da so vsaj jetrne celice metabolno aktivne. Zaradi tega sklepamo, da komet test ni primeren za detekcijo genotoksičnosti tovrstnih spojin. Morda bi lahko zaznali genotoksičnost teh snovi, če bi spremenili čas tretiranja ali pa z različico komet testa z inhibitorji DNA reparacije. Vendar, kot kažejo raziskave drugih avtorjev je za detekcijo genotoksičnosti HAA, pa tudi nekaterih drugih spojin mikronukleus test občutlivejša metoda. Da bi ugotovili ali so te celice primerne za zaznavanje genotoksičnosti HAA bi bilo potrebno to raziskavo nadgraditi še z mikronukleus testom. Rezultati, ki smo jih dobili v naši *in vitro* raziskavi predstavljajo pomemben doprinos k razvoju alternativnih *in vitro* testnih sistemov, ki naj bi pripomogli k zmanjšanju uporabe živali v toksikologiji.

7 VIRI

- AFLATOXINS. 1998. JECFA, The forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. International programme on chemical safety world health organization, safety evaluation of certain food additives and contaminants, WHO food additives series 40.
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je16.htm> (6.10.2006)
- AFLATOXINS (Group 1). 2002. IPCS INCHEM (International Programme on Chemical Safety).
<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol82/82-04.html> (6.10.2006)
- ASARE G. A., Bronz M., Naidoo V., Kew M.C. 2007. Interactions between aflatoxin B₁ in dietary iron overload in hepatic mutagenesis. *Toxicology*, 234: 157-166.
- ASHBY J. 1980. Significance and interpretation of in vitro mutagenicity results. In: *Short Term Tests for Detecting Carcinogens*. Norpoth K.H., Garner R.C. (Eds). Springer, Berlin: 74-93.
- A- α -C (2-AMINO-9H-PYRIDO[2,3-*b*]INDOLE). 1998. IPCS INCHEM (International Programme on Chemical Safety).
<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol40/a-alpha-c.html> (6.10.2006)
- BENZO[*a*]PYRENE. 1998. IPCS INCHEM (International Programme on Chemical Safety).
[http://www.inchem.org/documents/iarc/vol32/benzo\[a\]pyrene.html](http://www.inchem.org/documents/iarc/vol32/benzo[a]pyrene.html) (6.10.2006)
- BIGGER C.A.H., Tomaszewski J.E., Dipple A., Lake R.S. 1980. Limitations of metabolic activation systems used with in vitro tests for carcinogens. *Science*, 209: 503-505.
- BOS R.P., Neis J.M., van Gemert P.J.L., Henderson P.T. 1983. Mutagenicity testing with the *Salmonella* hepatocyte and *Salmonella* microsome assays: a comparative study with some known genotoxic compounds. *Mutation Research*, 124: 103-112.
- BRAMBILLA G., Martelli A. 1990. Human hepatocytes in genotoxicity assays. *Pharmacol. Res.*, 22: 381-392.
- BUTTERWORTH B.E., Smith Oliver T., Earle L., Lowry D.L., White R.D., Doolittle D.L., Working P.K., Cattley R.C., Jirtle R., Michalopoulos, Strom S. 1989. Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies. *Cancer Research*, 49: 1075-1084.
- CHENG K.-W., Chen F., Wang M. 2006. Heterocyclic amines: Chemistry and health. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50: 1150-1170.
- CHEPANOSKE C. L., Brown K., Turteltaub K. W., Dingley K. H. 2004. Characterization

of a peptide adduct formed by N-acetoxy-2-amino-1-methyl-6- phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), a reactive intermediate of the food carcinogen PhIP. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1367-1372.

CRESPI C.L. 1995. Use of genetically altered cells for genetic toxicology. In: Phillips D.H., Venitt S. (Eds). *Environ. Mutagen*: 233–260.

DEAN R., Bynum G.L., Jacobson-Kram D., Hadley E. 1983. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Reuber H4IIE hepatoma cells: an in vitro system for the induction of SCEs. *Mutation Research*, 111: 419-427.

DEAN R., Bynum G.L., Kram D., Schneider E. 1980. Sister chromatid exchange induction by carcinogens in Reuber H4IIE hepatoma cells: an in vitro system which does not require the addition of activating factors. *Mutation Research*, 74: 477-483.

DURLING L.J.K. in Abramsson-Zetterberg L. (2005). A comparison of genotoxicity between three common heterocyclic amines and acrylamide. *Mutation research*, 580: 103-110.

ECACC (European Collection of Cell Cultures)
<http://www.ecacc.org.uk/> (27.09.2006)

FREDERIKSEN H. in Frandsen H. 2004. Excretion of metabolites in urine and faeces from rats dosed with the heterocyclic amine, 2-amino-9H-pyridol[2,3-b]indole (AαC). *Food and Chemical Toxicology*, 42: 879-885.

GALLAGHER E. P., Kunze K. L., Stapleton P. L., Eaton D. L. 1996. The Kinetics of Aflatoxin B1 Oxidation by Human cDNA-Expressed and Human Liver Microsomal Cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141 (2): 595-606.

GOODERHAM N. J., Creton S., Lauber S. N., Zhu H. 2007. Mechanisms of action of the carcinogenic heterocyclic amine PhIP. *Toxicology letters*, 168: 269-277.

GUGUEN-GUILLOUZO C., Guillouzo A. 1983. Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem*: 53-54, 35–56.

GUILLOUZO A., Corlu A. m Aninat C., Glaise D., Morel F., Guguen-Guillouzo C. 2007. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 168: 66-73.

HAZARDOUS SUBSTANCE DATABASE (HSBD). 2000. National Library of Medicine.
<http://toxnet.nlm.nih.gov/sis/htmlgen?HSDB>

- HORVÁTHOVÁ E., Slameňova D., Hlinčíkova L., Mandal T.K., Gábelova A., Collins A.R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research*, 409: 163-171.
- IQ (2-AMINO-3-METHYLIMIDAZO[4,5-f]QUINOLINE), (Group 2A). 1997. IPCS INCHEM (International Programme on Chemical Safety). <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol56/05-iq.html> (6.10.2007)
- KNASMÜLLER S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W.W., Hoelzl C., Bichler J., Majer B.J. 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198 (1-3) 315-328.
- KNIZE M.G., Salmon C.P., Hopmans E.C, Felton J.S. 1997. Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 763 (1-2): 179-185.
- LARSEN J.C. BENZO[*a*]PYRENE. WHO Food Additives Series 28. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je18.htm> (6.10.2006)
- MAJER B.J., Mersch-Sundermann V., Darroudi F., Laky B., Wit K., Knasmüller S. 2004. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogenesis in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutation Research*, 551: 153-166.
- MANABE S., Wada O., Kanai Y. 1990. Simultaneous determination of amino- α -carbolines and amino- γ -carbolines in cigarette smoke condensate by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 529: 125-133.
- MASLANSKY C.J., Williams G.M. 1982. Primary cultures and the levels of cytochrome P450 in hepatocytes from mouse, rat, hamster and rabbit liver. *In Vitro*, 18: 683-693.
- MATSUMOTO T., Yoshida D., Tomita H. 1981. Determination of mutagens, amino- α -carbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate. *Cancer Lett.*, 12: 105-110.
- MCKEAN C., Tang L., Tang M., Billam M., Wang Z., Theodorakis C.W., Kendall R.J., Wang J.-S. 2006. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and fumosin B₁ in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 868-876.
- MOSMANN T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2): 55-63.
- MULLER-TEGGETHOFF K., Kasper P., Muller L. 1995. Evaluation studies on the in

vitro hepatocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, 335: 293–307.

NEUMANN H.-G., Bitsch A., Klöhn P.-C. 1997. The dual role of 2-acetylfluorene in hepatocarcinogenesis: Specific targets for initiation and promotion. *Mutation Research*, 376: 169-176.

OZTURK M., Bressac B., Puisieux A., Kew M., Volkmann M., Bozcall S., Mura J.B., Monte S., Carlson R., Blum H., Wands J., Takahashi H., Weizsacker F., Galun E., Kar S., Carr B.I., Schroder C.H., Erken E., Varinli S., Rustgi V.K., Prat J., Toda G., Koch H.K., Liang X.H., Tang Z.-Y., Shouval D., Lee H.-S., Vyas G.N., Sarosi I. 1991. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *The Lancet*, 38 (8779): 1356-1359.

PETKOVIĆ J. 2006. Citotoksično in genotoksično delovanje naravnih in mineralnih vod na celice HepG2. Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

PhIP (2-AMINO-1-METHYL-6-PHENYLMIDAZO[4,5-*b*]PYRIDINE), (Group 2B). 1997. IPCS INCHEM (International Programme on Chemical Safety). <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol56/08-philp.html> (6.10.2006)

PLAZAR J., Hreljac I., Pirih P., Filipič M., Groothuis G.M.M. 2007a. Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human and rat precision-cut liver slices. *Toxicology in Vitro*, doi:10.1016/j.tiv.2007.02.12

PLAZAR J., Žegura B., Lah T.T., Filipič M. 2007b. Protective effects of Xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, doi:10.1016/j.mrgentox.2007.03.013.

ROBICHOVÁ S. in Slameňová D. 2002. Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induced by N-nitroso compounds, N-nitrosomorpholine and N-methyl-N'-nitrosoguanidine in Caco2 and V79 cells. *Cancer Letters*, 182: 11-18.

ROSCHE E., Wiebel F.J. 1988. Mutagenicity, clastogenicity and cytotoxicity of procarcinogens in a rat hepatoma cell line competent for xenobiotic metabolism. *Mutagenesis*, 3: 269–276.

RUEFF J., Chiapella C., Chipman K.J., Darroudi F., Duarte Silva I., Duverger van Bogaert M., Fonti E., Glatt H.R., Isern P., Laires A., Leonard A., Llangostera M., Mossesso P., Natarajan A.T., Palitti F., Rodrigues A.S., Schinoppi A., Turchi G., Wehrle-Schneider G. 1996. Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short term assays. *Mutation Research*, 353: 151-176.

SALVIA R., DeMeschini R., Fiore M., Palitti F., Caruccio M.A., Turchi G. 1988. Induction of SCEs by procarcinogens in metabolically competent Chinese hamster epithelial cells. *Mutation Research*, 207: 69-74.

- SCHUT H. A. J., Snyderwine G. 1999. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20 (3): 353-368.
- SELKIRK J.K. 1977. Divergence of metabolic activation systems for short term mutagenicity assays. *Nature*, 270: 604- 607.
- SHIBUTANI S., Suzuki N., Grollman A.P. 1998. Mutagenic specificity of (Acetylamino)fluorene-derived DNA adducts in mammalian cells. *Biochemistry*, 37: 12034-12041.
- SKOG K. in Solyakov A. 2002. Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1213-1221.
- SKOG K.I., Johansson M.A., Jagerstad M.I. 1998. Carcenogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.*, 36: 879-896.
- SUGIHARA N., Toyama K., Okamoto T., Kadowaki M., Terao K., Furuno K. 2007. Effects of benzo(a)pyrene on P-glycoprotein-mediated transport in Caco-2 cell monolayer: A comparative approach. *Toxicology in Vitro*, 21: 837-834.
- TENNANT R.W., Margolin B.H., Shelby M.D., Zeiger E., Haseman J.K., Spalding J., Caspary W., Resnick M., Stasiewicz S., Anderson B., Minor R. 1987. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science*, 236: 933-941.
- TONG C., Telang S., Williams G.M. 1984. Differences in responses of four adult rat liver cell lines to a spectrum of chemical carcinogens. *Mutation Research*, 130: 53-61.
- TONG C., VerBrat S., Williams G.M. 1981. Sister chromatid exchange induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in an intact cell system of adult rat liver epithelial cells. *Mutation Research*, 91: 467-473.
- TURESKY R.J. 2005. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assesment. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 101-117.
- TURESKY R.J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168: 219-227.
- TURESKY R.J., Vouros P. 2004. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography B*, 802 (1): 155-166.
- VALENTIN-SEVERIN I., Le Hegarat L., Lhuguenot J.-C., Le Bon A.-M., Chagnon M.-C. 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative

investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*, 536: 79-90.

VALENTIN-SEVERIN I., Thybaud V., Le Bon A.-M., Lhuguenot J.-C., Chagnon M.-C. 2004. The autoradiographic test for unscheduled DNA synthesis: a sensitive assay for the detection of DNA repair in the HepG2 cell line. *Mutation Research*, 559: 211-217.

VOLČIČ M. 2006. Vpliv mikrocistina-LR na različne celične linije. Diplomski naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

YEH F.-S., Yu M. C., Mo C.-C., Luo S., Tong M. J., Henderson B. E. 1990. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. *Health Policy*, 14 (2): 157.

YU Y., Zhu W., Diao H., Zhou C., Chen F.F., Yang J. 2006. A comparative study of using comet assay and γ H2AX foci formation in the detection of N-methyl-N-nitrosoguanidine-induced DNA damage. *Toxicology in Vitro*, 20: 959-965.

ŽEGURA B. 2002. Mikrocistini povzročajo oksidativne poškodbe DNK jetrnih celic (HepG2) in poškodbe DNA celic različnih organov belih laboratorijskih podgan. Magistrski naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.