

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ana SKRT

MUTAGENOST HETEROCIKLIČNIH AMINOV IZ RAZLIČNIH VRST
PEČENEGLA MESA IN NJIHOV VPLIV NA PROTEINSKI PROFIL CELIC
HUMANEGA HEPATOMA HepG2

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

MUTAGENICITY OF HETEROCYCLIC AMINES FROM VARIOUS
SORTS OF ROASTED MEAT AND THEIR EFFECT ON PROTEIN
EXPRESSION IN HUMAN HEPATOMA CELLS HepG2

GRADUATION THESIS
University Studies

LJUBLJANA, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za Genetsko toksikologijo in biologijo raka ter v laboratoriju za proteomiko, katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc.dr. Jerneja Ambrožič-Avguštin
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc.dr. Metka Filipič
Nacionalni inštitut za biologijo

Član: prof.dr. Gregor Anderluh
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 15. junij 2009

Podpisana Ana Skrt 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.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Skrt

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD	Dn
DK	579.61: 663.1(043.2)=163.6
KG	Heterociklični amini/mutagenost/dvo-dimenzionalna elektroforeza/izražanje proteinov
AV	SKRT, Ana
SA	FILIPIČ, Metka (mentorica) / ANDERLUH, Gregor (recenzent)
KZ	1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2009
IN	MUTAGENOST HETEROCIKLIČNIH AMINOV IZ RAZLIČNIH VRST PEČENEGA MESA IN NJIHOV VPLIV NA PROTEINSKI PROFIL CELIC HUMANEGA HEPATOMA HepG2
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 56 str., 18 pregl., 18 sl., 1 pril., 27 vir.
IJ	sl
IJ	sl /en
AI	<p>Heterociklični amini (HCA) so bakterijski mutageni in potencialni človeški karcinogeni, ki nastajajo med topotno pripravo z beljakovinami bogate hrane. Nastanejo s kondenzacijo kreatininskih in drugih aminokislinskih prekurzorjev, pri temperaturah višjih od 100°C, ki so običajne za normalno pripravo hrane. HCA podobno kot večina drugih kemijskih mutagenov tvorijo adukte na DNA, posledica so lahko poškodbe dednega materiala in napake pri podvojevanju celic, kar lahko vodi v nastanek rakavega obolenja.</p> <p>V diplomski nalogi smo preverili mutagenost HCA ekstraktov iz različnih vrst pečenega mesa; perutnine, svinjine in govedine, ter citotoksičnost in njihov vpliv na spremembe izražanja proteinov v metabolno aktivnih celicah humanega hepatoma (HepG2). Te celice smo izbrali, ker so jetra primarna tarča delovanja HCA pri ljudeh. Mutageno aktivnost ekstraktov HCA smo potrdili z Amesovim testom mutagenosti na bakteriji <i>Salmonella typhimurium</i> TA98. Z MTT testom citotoksičnosti za HepG2 celice nismo potrdili. V nadaljevanju smo z dvo-dimenzionalno elektroforezo (2-DE) naredili proteinske profile HepG2 celic tretiranih s HCA iz vseh treh vrst pečenega mesa. V vseh treh primerih smo ugotovili spremembe v izražanju proteinov. Največ sprememb je bilo pri HepG2 celicah tretiranih z ekstraktom HCA iz pečene perutnine.</p> <p>Rezultati bodo podlaga za nadaljnje raziskave v smeri identifikacije proteinov, pri katerih je prišlo do spremenjenega izražanja, kar bo doprineslo k novim spoznanjem o mehanizmih potencialnega karcinogenega delovanja HCA.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 579.61: 663.1(043.2)=163.6
CX Heterocyclic amines/mutagenicity/two-dimensional electrophoresis/protein expression
AU SKRT, Ana
AA FILIPIČ, Metka (supervisor) / ANDERLUH, Gregor (reviewer)
PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department for biology
PY 2009
TI MUTAGENICITY OF HETEROCYCLIC AMINES FROM DIFFERENT SORTS OF ROASTED MEAT AND THEIR EFFECT ON PROTEIN EXPRESSION IN HUMAN HEPATOMA CELLS HepG2
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 56 p., 18 tab., 18 fig., 1 ann., 27 ref.
LA sl
AL sl /en
AB Heterocyclic amines (HCA) are potent bacterial mutagens and possible human carcinogens that are formed during cooking of protein rich food. They are formed at temperatures above 100°C with condensation of creatinine and other aminoacid precursors. As the majority of other chemical mutagens they form DNA adducts that might result in damaging the DNA, disrupt the cell division processes and consequently lead to development of cancer.
We tested the mutagenic potential of HCA extracts from three kinds of roasted meat; poultry, pork, beef and cytotoxicity and their effect on protein expression in metabolically active human hepatoma cells (HepG2). These cells have been chosen because the liver is the primary target organ in humans for HCA. We confirmed the mutagenicity with Ames mutagenicity test in *Salmonella typhimurium TA98* bacterium. We did not confirm citotoxicity of HCA for HepG2. Further on we made protein expression profiles of HepG2 cells treated with HCA from roasted meat with two-dimensional electrophoresis (2-DE). We determined changes in protein expression in all three cases. The most changes occurred in HepG2 treated with HCA from roasted poultry.
These results will be the basis to the following research directing toward identification of the proteins with altered expression and will hopefully contribute to better understanding of the carcinogenic mechanisms of HCA.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD.....	1
2 NAMEN NALOGE	1
3 PREGLED OBJAV	2
3.1 RAK.....	2
3.1.1 Nastanek in biologija raka	2
3.1.2 Kemijski mutageni.....	3
3.2 HETEROCIKLIČNI AMINI.....	4
3.2.1 Mutagenost in karcinogenost HCA	7
3.2.1.1 Mutagenost in karcinogenost PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- b]piridin)	8
3.2.1.2 Mutagenost in karcinogenost MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- f]kinoksalin).....	8
3.3 METABOLIZEM HETEROCIKLIČNIH AMINOV PRI ČLOVEKU	9
3.4 VPLIV GENSKIH POLIMORFIZMOV V POPULACIJI NA TVEGANJE ZA NASTANEK RAKA ZARADI HCA.....	12
3.5 DNA POPRAVLJALNI MEHANIZMI.....	12
3.6 PROTEOMIKA V TOKSIKOLOGIJI - TOKSIKOPROTEOMIKA	13
4 MATERIALI IN METODE	15
4.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA	15
4.1.1 Kemikalije	15
4.1.2 Laboratorijska oprema.....	16
4.2 POTEK DELA.....	17

4.3 PRIPRAVA HCA EKSTRAKTOV	17
4.3.1 Analiza prisotnosti HCA v ekstraktih iz pečenega mesa.....	18
4.4 TESTIRANJE MUTAGENOSTI HCA Z AMESOVIM TESTOM	19
4.4.1 <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 in TA100	20
4.4.1.1 Gojenje <i>S. typhimurium</i>	21
4.4.1.2 Metabolna aktivacija s S9.....	21
4.4.2 Izbira koncentracij HCA.....	22
4.5 CITOTOKSIČNOST HCA IZ MESNIH EKSTRAKTOV ZA HepG2 CELICE	24
4.5.1 HepG2 celice	24
4.5.1.1 Gojenje HepG2 celic	24
4.5.2 Test citotoksičnosti MTT	24
4.6 ANALIZA SPREMEMB IZRAŽANJA PROTEINOV V HepG2 CELICAH ...	25
4.6.1 Izolacija proteinov iz HepG2 celic za 2-DE.....	25
4.6.2 Določanje koncentracije izoliranih proteinov z metodo Bradford	26
4.6.3 Dvo-dimenzionalna elektroforeza (2-DE)	28
4.6.3.1 Prvi korak 2-DE: Izoelektrično fokusiranje.....	29
4.6.3.2 Drugi korak 2-DE: Klasična SDS-elektroforeza	30
4.6.3.3 Barvanje gelov.....	33
4.6.3.4 Računalniška analiza podatkov	35
5 REZULTATI	36
5.1 REZULTATI AMESOVEGA TESTA.....	36
5.2 REZULTATI TESTA MTT	40
5.3 IZOLACIJA PROTEINOV	41
5.4 REZULTATI 2-DE	43
6 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
6.1 RAZPRAVA.....	48
6.1.1 Mutagenost HCA ekstraktov iz pečenega mesa	48
6.1.2 Citotoksičnost HCA ekstraktov iz pečenega mesa za HepG2 celice.....	49
6.1.3 Vpliv HCA ekstraktov iz pečenega mesa na izražanje proteinov v HepG2 celicah	49
6.2 SKLEPI.....	52
VIRI	53

ZAHVALA	57
PRILOGE	58

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Rezultati analize količine HCA v mesnih ekstraktih iz pečene govedine, svinjine in perutnine	19
Preglednica 2. Hranilni bujon.....	21
Preglednica 3. 10% S9 mešanica.....	22
Preglednica 4. Koncentracije HCA, ki smo jih testirali z Amesovim testom.	22
Preglednica 5. Minimalno glukozno gojišče (MGG)	23
Preglednica 6. Površinski agar.	23
Preglednica 7. Celični medij za celično kulturo HepG2.	24
Preglednica 8. Ekstrakcijski pufer.....	26
Preglednica 9. Rehidracijski pufer.....	30
Preglednica 10. Poliakrilamidni gel z 12% zamreženostjo.	31
Preglednica 11. Uravnotežni pufer – osnovni.	32
Preglednica 12. Priprava agaroze.	32
Preglednica 13. 1x SDS elektroforezni pufer.....	33
Preglednica 14. Fiksacijska raztopina.	34
Preglednica 15. Raztopina za razbarvanje.....	34
Preglednica 16. Koncentracija proteinov v vzorcih izoliranih iz dveh bioloških ponovitev HepG2 celičnih kultur po 24-urnem tretiranju s HCA ekstrakti za 2-DE.	42
Preglednica 17. Analiza proteoma HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene svinjine.	46
Preglednica 18. Povzetek rezultatov.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1. Kemijske strukture HCA, ki se najpogosteje tvorijo pri običajni topotni pripravi mesa.....	5
Slika 2. Poenostavljena shema metabolizma HCA pri človeku.....	10
Slika 3. HCA se v telesu biokemijsko transformacijo po več različnih poteh.....	11
Slika 4. Značilna slika 2-DE gela.....	28
Slika 5. Mutagenost heterocikličnega amina PhIP za sev <i>S. typhimurium</i> TA98.....	36
Slika 6. Mutagenost heterocikličnega amina MeIQx za sev <i>S. typhimurium</i> TA98.....	37
Slika 7. Mutagenost heterocikličnega amina IQ za sev <i>S. typhimurium</i> TA98.....	38
Slika 8. Mutagenost heterocikličnih aminov ekstrahiranih iz treh vrst mesa; govedine, svinjine in perutnine za sev <i>S. typhimurium</i> TA98.....	39
Slika 9. Test citotoksičnosti MTT po 24 urnem tretmaju s HCA ekstrakti iz pečene govedine, svinjine in perutnine na celicah humanega je hepatoma HepG2.....	40
Slika 10. Standardna krivulja z absorpcijskimi vrednostmi proteinskih vzorcev.....	41
Slika 11. Število proteinov s spremenjenim izražanjem.....	43
Slika 12. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene perutnine.....	44
Slika 13. Analiza proteoma HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene perutnine.....	44
Slika 14. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene govedine.....	45
Slika 15. Analiza proteoma HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene govedine.....	45
Slika 16. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene svinjine..	46
Slika 17. Proteinski profil HepG2 celic za kontrolo topila (1% DMSO).....	47
Slika 18. Rezultati analize prisotnosti HCA v ekstraktih iz pečene govedine, svinjine in perutnine.....	50

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BFM	bromfenol modro
2-DE	dvo-dimenzionalna elektroforeza
BSA	goveji serumski albumin
CYP	družina citohrom P450 monooksigenaz
ddH₂O	bidestilirana voda
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GSH	glutation
GST	glutation-S-transferaza
HA	hranilni bujon
HCA	heterociklični amini
HepG2	celice humanega hepatoma
His	histidin
IEF	izoelektrično fokusiranje
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinolon
It	izoelektrična točka
MeIQx	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinolksalin
MGG	minimalno glukozno gojišče
M_r	relativna molekulska masa
MTT	13-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NAT	N-acetiltransferaza
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin
ppb	delci na bilijon
S9	eksogen sesalski metabolni aktivacijski sistem
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-E	klasična SDS elektroforeza
SULT	glutation-S-transferaza
UGT	UDP-glukuronozil-transferaza

1 UVOD

Zanimanje za ciklične aromatske spojine v povezavi z rakom pri človeku sega v začetek 19. stoletja, ko so prvič potrdili povezavo med rakom na sečnem mehurju in aromatskimi spojinami. Prvi, ki jih je odkril v človeški prehrani, je bil profesor Sugimura (Weisburger, 2002). Zanimanje in obseg raziskav na področju toksikologije prehrane se od takrat povečujeta.

Heterociklični amini (HCA) so bakterijski mutageni in potencialni karcinogeni, ki nastajajo med topotno pripravo hrane beljakovinskega izvora. Nastanejo s pirolizo ter s kondenzacijo keratinskih in drugih aminokislinkih prekurzorjev, pri temperaturah višjih od 100°C, ki so običajne za normalno pripravo hrane.

HCA, podobno kot večina drugih kemijskih mutagenov, tvorijo adukte na DNA, posledica so poškodbe dednega materiala in napake pri podvojevanju celic, kar lahko ob izpostavljenosti skozi daljše časovno obdobje vodi v nastanek rakavega obolenja. Zaradi dokazane mutagenosti za bakterije ter karcinogenosti za živali, Mednarodna agencija za raziskave na raku (International Agency for Research on Cancer) uvršča nekatere HCA na seznam možnih humanih rakotvornih snovi.

2 NAMEN NALOGE

Namen diplomske naloge je bil pokazati mutagenost HCA pri koncentracijah, ki se dejansko tvorijo pri pečenju različnih vrst mesa, pri bakterijah in njihov vpliv na spremembe izražanja proteinov pri metabolno aktivnih celicah humanega hepatoma (HepG2). HepG2 celice smo izbrali, ker imajo ohranjeno izražanje in aktivnost encimov potrebnih za metabolno aktivacijo HCA ter so hkrati tarča njihovega delovanja.

Proučevanje učinkov HCA na proteomskem nivoju je inovativen pristop, s katerim smo želeli dobiti osnovno predstavo o številu proteinov s spremenjenim izražanjem, ki je

posledica metabolne aktivacije HCA v HepG2 celicah, nastanka visoko reaktivnih vmesnih produktov biološke aktivacije in odziv na poškodbe DNA zaradi tvorbe aduktov HCA na DNA. Glede na podatke iz predhodno opravljene analize vsebnosti HCA v mesnih ekstraktih pečene perutnine, svinjine in govedine pričakujemo od količine HCA odvisne spremembe v proteinskem profilu HepG2 celic.

3 PREGLED OBJAV

3.1 RAK

3.1.1 Nastanek in biologija raka

Število celic, ki gradijo organe in tkiva odraslih živali, se v zdravem organizmu praviloma ohranja z vzdrževanjem ravnovesja med številom celičnih smrti in celičnih delitev. Diferencirane telesne celice imajo omejeno življenjsko dobo; ko celica propade, se njeni mesto nadomesti z novo, nastalo s celično delitvijo drugih celic. Celične delitve so reguliran proces. V nekaterih primerih lahko pride do nastanka rakavih celic. S serijo mutacij nekatere celice pridobijo lastnost neomejenih in nekontroliranih celičnih delitev ter nedovzetnosti za kontrolne regulatorne signale. Take celice so lahko začetniki celične linije, ki tvori tumor ali neoplazmo, ki jo imenujemo tudi rak. (Alberts in sod., 2003 in Kindt in sod., 2007)

Rak je genetska bolezen. Raziskave kažejo, da je njegov nastanek večstopenjski proces, pri katerem je akumulacija mutacij v celični DNA ključnega pomena. Dejavniki, kot so ionizirajoče sevanje in stik s kemijskim karcinogeni, povečujejo pogostost mutacij. V nukleotidnem zaporedju DNA inducirajo nastanek sprememb ali mutacij. Do razvoja raka lahko pride tudi v odsotnosti zunanjih mutagenov, saj mehanizmi podvojevanja DNA in celični popravljalni mehanizmi sami po sebi niso dovolj natančni, da bi lahko popravili vsako in kakršno koli napako, ki bi lahko nastala in preprečili nastanek rakavih celic. Koliko mutacij natančno je potrebnih za razvoj raka, ni razjasnjeno. Dejstvo je, da ne nastanejo vse hkrati, ampak postopno, običajno v obdobju več deset let. (Alberts in sod., 2003)

Različne populacijske študije skupaj z epidemiološkimi študijami o pojavnosti raka, življenjskega stila in navad so pripeljale do ugotovitve, da je več kot 80% smrti zaradi raka v zahodnih industrializiranih državah mogoče povezati z okoljskimi dejavniki, ki smo jim posamezniki dnevno izpostavljeni. Najbolj kritični okoljski dejavnik so tobak, alkohol, prehranske navade, infekcije in izpostavljenosti na delovnem mestu. 35% primerov raka v zahodnem svetu povezujejo s hrano, 30% pa s tobakom. Okoljski dejavniki pomembno pripomorejo k povečanju verjetnosti za nastanek mutacij, ki so predpogoji za nastanek raka, katerih nastanek pa je nemogoče napovedati v naprej. Pomemben faktor je tudi genetska predispozicija posameznika, ki je v kombinaciji z različnimi okoljskimi dejavniki verjetno ključna pri razvoju rakavih obolenj. (Luch, 2005)

3.1.2 Kemijski mutageni

Danes vemo, da lahko nekatere kemijske snovi in spojine povzročajo nastanek tumorjev – so tumorigene. Ena izmed pomembnih lastnosti kemijskih mutagenov je, da se kovalentno vežejo na DNA ali na celične proteine in druge celične komponente. Direktnih interakcij so sposobne samo visoko reaktivne elektrofilne oblike molekul. Znana je le peščica kemikalij s takšnim mutagenim delovanjem. Nukleofilne ali kemijsko inertne molekule, kamor poleg amino-azo barvil, policikličnih aromatskih ogljikovodikov ter drugih, uvrščamo tudi aromatske in HCA, predstavljajo večino znanih človeških mutagenih snovi. Te vrste molekul ne morejo direktno reagirati s celičnimi sestavinami. Mutageno delovanje pridobijo šele po encimsko katalizirani metabolni transformaciji. Biotransformacija mutagenih in karcinogenih snovi poteka preko vmesnih produktov, pri čemer lahko nastajajo visoko reaktivni elektrofilni vmesni produkti, ki se kovalentno vežejo na makromolekule v celici kot so proteini in DNA. Število molekul, ki se vežejo na DNA, je pomemben pokazazelj tveganja za nastanek raka. (Luch, 2005)

Na obseg DNA poškodb, karcinogeni potencial in posledično na posameznikovo tveganje za nastanek raka, med drugim vplivajo tudi razlike v aktivnosti encimov udeleženih v metabolno aktivacijo in popravljalne mehanizme poškodb DNA. Upoštevati moramo, da noben encim vključno z vsemi njegovimi fenotipskimi različicami, nima vedno samo

protumurigenega ali antitumorigenega učinka. Encimi, ki inaktivirajo eno vrsto molekul, lahko pripomorejo k toksičnosti drugih. Poleg tega smo ljudje običajno izpostavljeni mešanicam različnih snovi, ne pa zgolj eni sami karcinogeni snovi, kar je običajno v eksperimentalnih pogojih. Interakcije med posameznimi snovmi v mešanici imajo lahko aditivne, sinergistične ali antagonistične učinke, ki jih moramo upoštevati. Problematično je napovedovanje bioloških odzivov na karcinogene v izjemno nizkih koncentracijah, zlasti kadar imamo opravka z vrstno specifičnimi odzivi, ki bi jih radi ekstrapolirali na odzive višjih taksonomskeh kategorij, ki se nemalokrat izkaže za nepravilno. (Luch, 2005)

3.2 HETEROCIKLIČNI AMINI

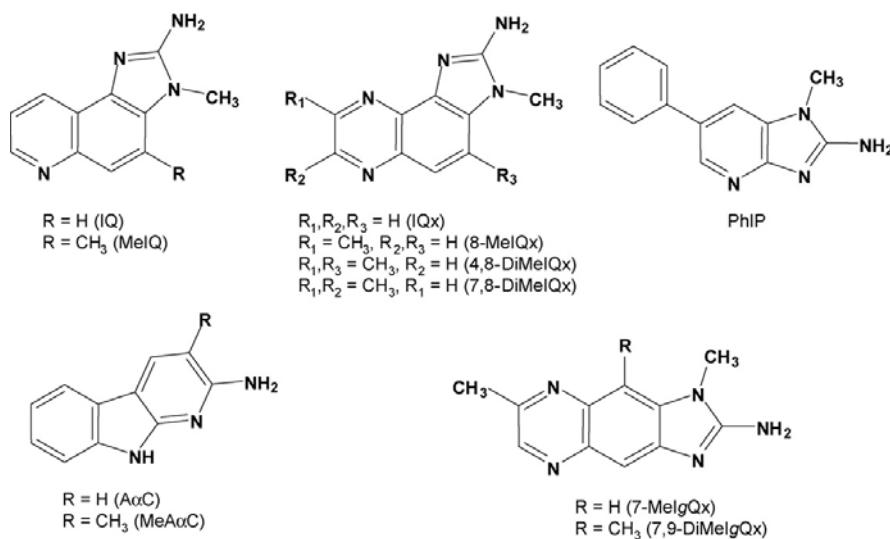
HCA so ena od skupin snovi z močno mutageno aktivnostjo in zato z visokim potencialom za nastanek raka (Ristic in sod., 2004). V hrani jih je, pred več kot 25 leti, odkril profesor Sugimura s sodelavci. Nastajajo med pečenjem rdečega mesa, rib in perutnine. Do danes so v topotno pripravljenem mesu identificirali že več kot 20 HCA (Turesky, 2007). Prisotni so tudi v tobačnem dimu, pivu, vinu in izpušnih plinih (Turesky, 2005). Mnogi izmed njih so karcinogeni in povzročajo razvoj tumorjev na različnih organih pri glodalcih (Turesky, 2007).

Po kemijski strukturi spadajo med policiklične aromatske spojine z vsaj enim aromatskim in enim heterocikličnim obročem. Nastanejo kot stranski produkti pri topotni pripravi hrane oz. pri kuhanju in pečenju. Največ jih nastane v proteinsko bogati hrani živalskega izvora, ki so vir kreatinina in drugih prekurzorjev kot so aminokisline, sladkorji in drugi aldehydi. (Cheng in sod., 2006)

Glede na temperaturo pri kateri nastanejo, jih delimo v dve skupini. HCA prve skupine nastanejo s kondenzacijo kreatinina s fragmenti heksoz in pirazinskih ali piridinskih derivatov pri temperaturi med 100 in 300°C (Turesky, 2005). Imenujemo jih termični HCA ali aminoimidazoazareni (Slika 1). Glede na derivat iz katerega nastanejo, jih delimo na tri podskupine: imidazopiridinske derivate, kamor spada PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]-piridin), imidazokinolinske derivate, kamor uvrščamo IQ (2-amino-3-

metil-imidazo[4,5-f]kinolin) in MeIQx (2-amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5-f]-kinolin) ter imidazokinoksalinske derivate, kamor spada DiMeIQx (2-amino-3,7,8-trimetil-imidazo[4,5-f]-kinoksalin) (Sanz Alaejos in sod., 2008). Večino mutagene aktivnosti v pečeni hrani, zlasti v prehrani zahodnih narodov, pripisujemo tej skupini HCA (Cheng in sod., 2006).

Druga skupina so pirolizni HCA ali karbolini. Nastanejo s termičnim razpadom aminokislin, kot je triptofan in proteinov pri temperaturah višjih od 300°C. Delimo jih na: β -karbole, γ -karbole, fenilpiridinske, piridoimidazolne, tetraazafluorantenske, benzimidazolne in karbazolne derivate (Sanz Alaejos in sod., 2008). V normalno pečenem mesu so le izjemoma prisotni, ker temperaturo nad 300°C, pri običajni topotni pripravi hrane, le redko dosežemo. V primerjavi s prvo skupino so iz istih razlogov slabše raziskani (Cheng in sod., 2006).



Slika 1. Kemijske strukture HCA, ki se najpogosteje tvorijo pri običajni topotni pripravi mesa.

Do sedaj je bilo v pečenem mesu identificiranih že več kot 20 HCA. PhIP in MeIQx sta največkrat in v najvišji koncentraciji prisotna v pečenem mesu.

IQ in MeIQx sta imidazokinolinska derivata, PhIP je imidazopiridinski derivat, DiMeIQx pa imidazoksalinski. Uvrščamo jih v skupino aminoimidazoazarenov. AαC in Me AαC sta fenilpiridinska

derivata in spadata v skupino karbolinov, ki so zaradi zelo visokih temperatur, pri katerih nastanejo, v običajno pečenem mesu le izjemoma prisotni. (Povzeto po: Turesky, 2007)

Legenda: 1R : radikal

Kot večina kemijskih mutagenov/karcinogenov, HCA tvorijo adukte na DNA. V Amesovem testu mutagenosti na bakterijskih sevih *Salmonella* so močni mutageni. 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-*f*]kinolin (MeIQ), MeIQx, PhIP, 2-amino-9H-dipirido[2,3-*b*]indol (AαC), 2-amino-3-metil-9H-dipirido[2,3-*b*]indol (MeAαC), 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-1), 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-1) in 2-amino-dipirido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazol (Glu-P-2) so bili s strani Mednarodne agencije za raziskave raka (International Agency for Research on Cancer) označeni kot možni in eden med njimi, IQ, kot verjeten človeški karcinogen (Cheng in sod., 2006). Adukte HCA na DNA so potrdili v več različnih človeških tkivih, kar dokazuje, da le-ti nastajajo, čeprav so prisotni v zelo nizkih koncentracijah, tudi v ne jetrnih tkivih, kjer lahko povzročijo poškodbe dednega materiala (Turesky, 2007).

Koncentracije HCA v pečenem mesu se gibljejo v razponu od nekaj deset do nekaj sto delcev na bilijon (ppb). V intenzivno prepečenem mesu dosežejo tudi 300 ali več ppb (Turesky, 2005). Količina HCA, ki se tvori v pečenem mesu je odvisna od temperature in dolžine časa topotne priprave hrane. Pečenje na žaru in dodatno opekanje povečata njihovo količino. Na povečanje tveganja, za nastanek raka zaradi HCA, vplivajo tudi vrsta mesa, pogostost uživanja mesa ter delež fizikalnih in kemijskih regulatorjev v prehrani, ki lahko do določene mere zmanjšajo njihov učinek (Cheng in sod., 2006; Bacon in sod., 2003). Kljub temu še vedno ni zadostnih znanstvenih dokazov, ki bi potrjevali hipotezo, da je tveganje za razvoj raka neposredno povezano z uživanjem HCA prisotnih v prehrani. Zelo pomemben dejavnik je tudi genetska predispozicija posameznika. Tveganje naj bi bilo odvisno od metabolnega fenotipa posameznika, od katerega sta odvisni biološka aktivacija in čas izločanja HCA iz organizma (Sanz Alaejos in sod., 2008). Točni podatki o količini HCA prisotni v pečenem mesu so ključni za ocenjevanje tveganja za nastanek raka pri ljudeh. Čeprav so iz preteklih raziskav objavljeni številni podatki o vsebnostih HCA v različnih vrstah kuhanje in pečene hrane, ostaja razvoj analitskih tehnik in standardizacije

postopkov priprave mesnih vzorcev, s katerimi bi dobili zanesljive podatke o vsebnosti in vrsti vsebovanih HCA, še vedno izziv (Ristic in sod., 2004).

V organizmu postanejo HCA biološko aktivni šele po metabolni aktivaciji v jetrih. Obseg katalitične aktivacije in izražanja ksenobiotičnih metabolnih encimov vključenih v bioaktivacijske in detoksifikacijske procese HCA, se med živalskimi vrstami razlikuje (Turesky, 2005). V nasprotju s številnimi živalskimi modeli, se pri ljudeh med posamezniki kaže visoka individualna variabilnost v izražanju teh encimov. Geni, ki pri človeku kodirajo nekatere ključnih encimov za metabolizem in biotransformacijo HCA, se v populaciji polimorfno izražajo, kar vpliva na njihovo stabilnost in katalitično aktivnost pri posamezniku, to pa posledično na hitrost, obseg biotransformacije toksikantov in na povečano tveganje za nastanek raka. (Turesky, 2005; Sanz Alaejos in sod., 2008)

3.2.1 Mutagenost in karcinogenost HCA

MeIQx, IQ in 8-MeIQx so eni najmočnejših mutagenov, ki so bili kdajkoli testirani z Amesovim testom mutagenosti za bakterije (Turesky, 2007). Potencial mutagenosti HCA je odvisen od njihove kemijske strukture in ali se med metabolno transformacijo N-oksidirajo, pri čemer nastanejo visoko reaktivniioni terciarnih aminov (NR_2^+). Genotoksični potencial, med različnimi HCA, se lahko v bakterijskih testih mutagenosti tudi do 1000-krat razlikuje. V sesalskih tkivnih kulturah so zaradi šibkejše biološke aktivacije razlike manjše. Neskladnost med različnimi *in vitro* testnimi sistemi je posledica različnih tipov eksogenih in endogenih metabolnih aktivacijskih sistemov, različne učinkovitosti DNA popravljalnih mehanizmov, različne gen-lokus občutljivosti za nastanek mutacij, različnih DNA zaporedij in vpliva sosednjih zaporedij na tvorbo HCA-DNA aduktov, kar skupaj vpliva na število mutacij, ki nastanejo. (Turesky, 2007)

Ocenjevanje mutagenosti pri kratkotrajnih izpostavitvah je bolj orientacijsko, kot pa da bi služilo dejanskemu ocenjevanju tveganja. O tveganju, zaradi uživanja HCA prisotnih v prehrani, običajno sklepamo in ga ocenujemo na podlagi učinka MeIQx in PhIP. Sodeč po rezultatih Amesovega testa z metabolno aktivacijo z eksogenim sesalskim metabolnim

aktivacijskim sistemom (S9 mešanico), je PhIP kljub metabolni aktivaciji z N-oksidacijo, približno 100-krat šibkejši mutagen kot MeIQx. (Turesky, 2007)

HCA imajo dokazan rakotvorni učinek pri glodalcih. Če so jim izpostavljeni daljše časovno obdobje, inducirajo nastanek tumorjev na več mestih v različnih organih, med drugim v ustni votlini, jetrih, želodcu, pljučih, debelem črevesu, prostati in mlečnih žlezah. IQ je močen jetrni karcinogen pri človeku podobnih opicah. Do nastanka tumorjev običajno pride šele po nekaj letni izpostavljenosti. (Turesky, 2007)

3.2.1.1 Mutagenost in karcinogenost PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridin)

PhIP je najpogosteji HCA v kuhanem, cvrtem ali na žaru pečenem mesu. Odvisno od načina priprave se tvori v količinah od 1-80 µg/kg kuhanega mesa. Dokazano karcinogen je za glodalce. Pri podganjih samcih, ki so jih hranili s PhIP, se je najpogosteje razvil rak na črevesju, pri podganjih samicah pa se je razvil rak v mlečnih žlezah. Znani so tudi encimi udeleženi v metabolno aktivacijo PhIP. Do mutagenih metabolnih produktov ga katalizirajo encimi iz družine citohrom P450 monooksigenaz. Mutagena oblika PhIP je N²-OH-PhIP, metabolizira pa se lahko tudi v nereaktivni produkt 4'-OH-PhIP. Vsi vmesni produkti se lahko vežejo z glukuronsko kislino, glutationom ali sulfatom in se v neaktivni obliki izločijo iz organizma. (Strickland in sod., 2002)

3.2.1.2 Mutagenost in karcinogenost MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-*f*]kinoksalin)

MeIQx pri bakterijah in v sesalskih celicah povzroča mutacije ter je dokazano karcinogen pri glodalcih. Mehанизem delovanja še ni povsem razjasnjen (Kang in sod., 2007). Med metabolizmom nastajajo elektrofilni vmesni produkti, ki se lahko kovalentno vežejo na ogljik 8 deoksigvanina v DNA in tvorijo adukte. Posledica nastanka aduktov je lahko sprememba konformacije DNA v kritičnih fazah podvojevalnega procesa, kar vodi v nastanek mutacij in je lahko začetek karcinogenega procesa (Gauvin in sod., 2001).

3.3 METABOLIZEM HETEROCIKLIČNIH AMINOV PRI ČLOVEKU

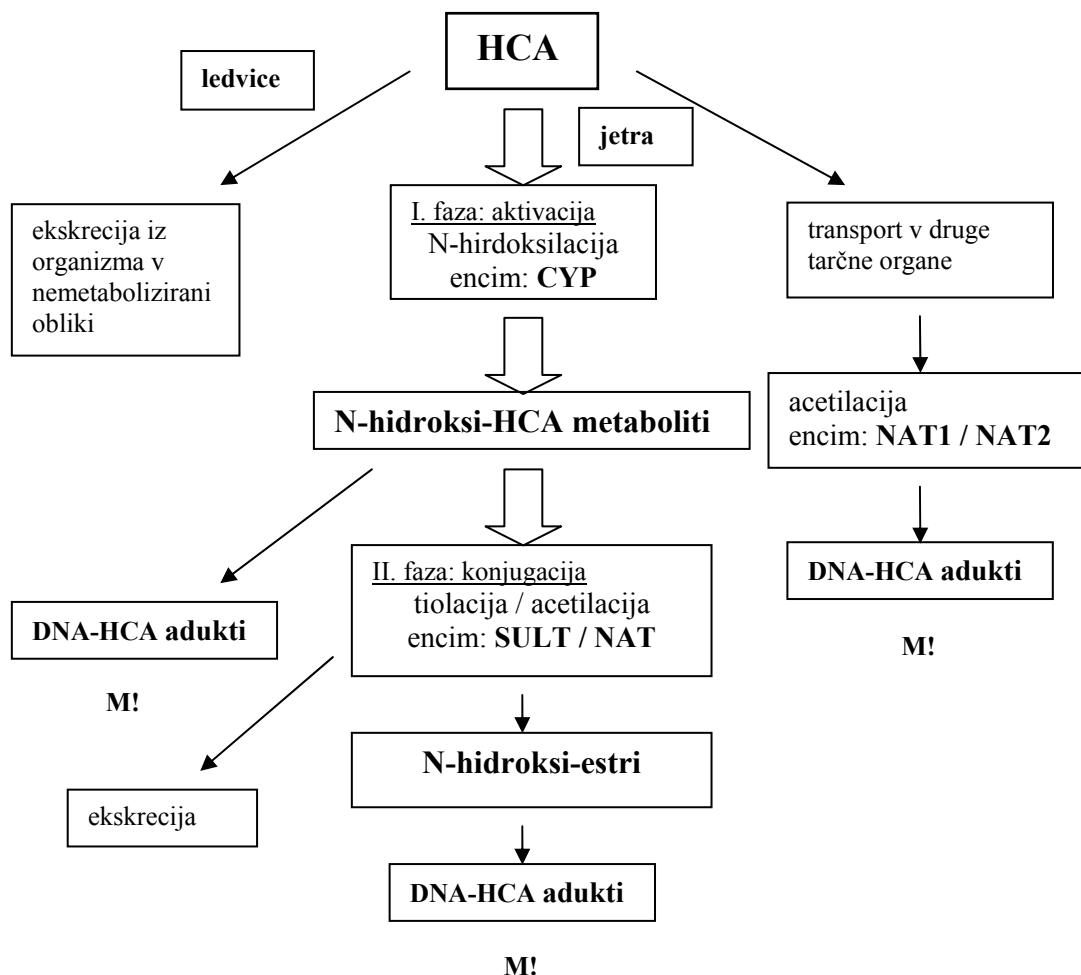
Metabolizem HCA pri ljudeh še vedno ni povsem razjasnjen in nekateri koraki so še vedno vprašljivi (Sanz Alaejos in sod., 2008). Poenostavljena shema metabolnih poti HCA v človeku je prikazana na Slika 2.

Osrednja pot metabolne aktivacije HCA poteka v jetrih, vanjo pa so udeleženi encimi I. in II. faze metabolne transformacije: citohromi P450 (CYP), sulfotransferaze (SULT), UDP-glukuronoziltransferaze (UGT), N-acetiltransferaze (NAT) in glutation S-trasferaze (GST). CYP so osrednji encimi I. faze in katalizirajo oksidacijo aromatskega ogrodja HCA ter amino skupin vezanih nanj. Produkt oksidacije so genotoksični N-hidroksi-HCA metaboliti, ki se vežejo na DNA in tvorijo adukte ali pa jih naprej transformirajo encimi II. faze, npr. NAT in SULT. Produceti transformacije so reaktivni

N-hidroksi estri, ki se vežejo na ogljik 8 in N² atome deoksigvanina v DNA (Slika 3) (Turesky in sod., 2005). Namen konjugacije je vezava škodljivih reaktivnih produktov na specifične molekule, npr. glukoronsko kislino, glutation in sulfat. Produceti, ki nastanejo, so stabilnejši, neškodljivi za celice in se enostavno izločijo iz organizma (Sanz Alaejos in sod., 2008).

Nekateri od elektrofilnih N-hidroksi-HCA metabolitov in N-hidroksi estrov se po alternativnih biokemijskih poteh reducirajo nazaj do izvornih aminov z vezavo na glutation (GSH) in GST, verjetno preko formiranja nestabilnih GSH konjugatov kot intermediatov. Drugi možni encimi udeleženi v detoksifikaciji HCA so NADPH-odvisna reduktaza, peroksidaze in prostaglandin H sintaze v tkivu dojk. (Turesky in sod., 2005)

IQ in MeIQx se lahko s konjugacijo eksocikličnih amino skupin, ki jo katalizira SLUT, direktno pretvorita v stabilne sulfamate (derivate sulfamične kisline; H₂NSO₃N), ki so pomembni detoksifikacijski produceti pri glodalcih, človeku podobnih opicah in človeku (Turesky in sod., 2005). Pomembna alternativna metabolna pot, pri številnih živalskih vrstah in človeku, je glukuronizacija HCA in N-hidroksil-HCA metabolitov z UGT. (Turesky in sod., 2005)



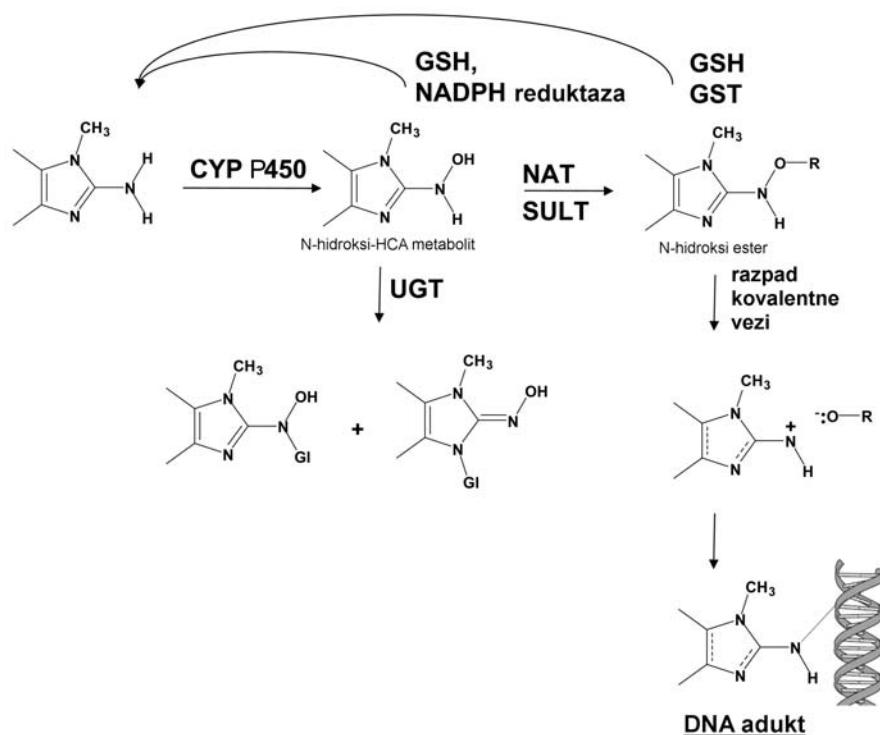
Slika 2. Poenostavljena shema metabolizma HCA pri človeku.

Osrednja pot biološke aktivacije in detoksifikacije HCA poteka v jetri, v manjšem delu pa v drugih tarčnih organih. Aktivirani N-hidroksi estri HCA imajo elektrofilen značaj in se lahko vežejo na DNA, celične proteine ali druge celične komponente. Vmesni metabolni produkti, ki nastajajo, so pogosto nestabilni in spontano razpadajo na produkte, ki se z urinom izločijo iz organizma. Vsak nastal adukt aktiviranega HCA z DNA poveča možnost nastanka mutacij, ki so ključne za povečanje verjetnosti nastanka raka.

Legenda: ¹CYP: citohrom P450 monooksigenaza. ²NAT: N-acetyltransferaza. ³SULT: sulfotransferaza.

⁴ M!: povečana verjetnost nastanka mutacij. (Povzeto po: Felton in sod., 2007 in Sanz Alaejos in sod., 2008)

Manjši del HCA se iz jeter transportira v druge tarčne organe, kjer se N-acetilirajo in tvorijo adukte na DNA v celicah tarčnih organov in lahko povzročijo nastanek raka. V nemetabolizirani obliki se iz organizma preko ledvic izloči le manjši delež HCA. Vsak nastali adukt na DNA poveča možnost nastanka mutacij. (Sanz Alaejos in sod., 2008)



Slika 3. HCA se v telesu biokemijsko transformacijo po več različnih poteh.

Z vidika karcinogeneze je najbolj kritičen nastanek genotoksičnih N-hidroksi-HCA metabolitov in N-hidroksi estrov, saj tvorijo adukte na DNA, ki so ključni za površjanje tveganja za razvoj raka.

Legenda: ¹CYP P450: citohrom P450 monoooksigenaza; ²NAT: N-acetyl transferaza; ³SULT: sulfotransferaza; ⁴UGT: UDP-glukuronozil transferaza; ⁵GSH: glutation; ⁶GST: glutation-S-transferaza. (Povzeto po: Turesky in sod., 2005)

3.4 VPLIV GENSKIH POLIMORFIZMOV V POPULACIJI NA TVEGANJE ZA NASTANEK RAKA ZARADI HCA

Večina genov, ki kodirajo encime udeležene v metabolno aktivacijo HCA, kot sta so citohromi, N-acetil-transferaza in drugi, so v človeški populaciji polimorfno razporejeni, kar pomembno vpliva na posameznikovo dovzetnost za tveganje nastanka rakavega obolenja. Genetska predispozicija pa nikakor ni edini faktor. (Sanz Alaejos in sod., 2008) Za gene, ki kodirajo citohrom P450 1A2 je bilo opisanih več polimorfizmov, na njihovo aktivnost vplivajo okoljski dejavniki vključno s prehrano. V populaciji sta različici citohrom P450 1A2 s hitrim in počasnim metabolnim fenotipom. Dokazali so, da uživanje mesa z visoko vsebnostjo HCA in nizko vsebnostjo policikličnih aromatskih ogljikovodikov pri človeku inducira aktivnost citohroma P450 1A2. Genski polimorfizem je prisoten tudi pri sulfotransferazah. Sulfotransferaze lahko aktivirajo HCA, policiklične aromatske ogljikovodike in aromatske amine, da tvorijo adukte z DNA. Tudi pri sulfotrasferazah se v populaciji ločijo hitri in počasni metabolni fenotipi. Na njihovo aktivnost pa zaviralo delujejo mnoge sestavine v sadju in zelenjavi. Obstajata tudi dva tipa N-acetyltransferaz; NAT1 in NAT2, ki sta visoko genetsko polimorfna. V populaciji so počasni, srednji in hitri acetilatorji. NAT2 se konstantno izraža, njena aktivnost pa je neodvisna od okoljskih dejavnikov. NAT1 genotip ima visoko aktivnost encima. (Sanz Alaejos in sod., 2008)

3.5 DNA POPRAVLJALNI MEHANIZMI

Človeške celice imajo za popravljanje poškodb, ki jih na DNA povzročijo endogeni dejavniki in kemikalije iz okolja, na voljo zelo širok spekter DNA popravljalnih mehanizmov. Večina poškodb, ki nastanejo na DNA, se popravlja po več kot samo eni poti. Rezultat je zelo malo število DNA poškodb, ki bi se lahko izmaznile vsem popravljalnim mehanizmov in bi bile prisotne v času podvojevanja DNA pred celično delitvijo, kar bi vodilo v nastanek mutacij. Akumulacija mutacij v dednem materialu je eden pomembnejših predpogojev za nastanek rakavih celic. (Loeb in Harris, 2008)

Sposobnost popravila škode, nastale z nastankom prvotnega HCA adukta na DNA, je pomemben pokazatelj mutagenega potenciala. Pri HCA izgleda, da je najpomembnejši korak izrezovanje in popravljanje nukleotidov na 3' koncu. Na učinkovitost popravljanja pa vpliva tudi mesto nastanka adukta, ali je ta v malem ali velikem jarku DNA. (Felton in sod., 2007)

3.6 PROTEOMIKA V TOKSIKOLOGIJI - TOKSIKOPROTEOMIKA

Tehnologije s končnico »omika«, kamor med drugim spada proteomika, so povečale možnosti odkrivanja celično in tkivno specifičnih sprememb ter odgovorov na različne snovi in dražljaje iz okolja, z izjemno občutljivostjo. Omogočajo sočasno analizo tisočih genov, proteinov ali metabolitov, torej analizo že na nivoju transkripcije in translacije (npr. toksikogenomika, toksikoproteomika in metabolomika). »Omike« se kažejo kot dobra orodja za predklinične raziskave, saj lahko že v zgodnjih fazah testiranja, na podlagi sprememb izražanja genov, proteinov ali metabolnih vzorcev, sklepamo o morebitnem toksičnem ali karcinogenem delovanju preizkušanih snovi. (Kroeger, 2006)

S terminom proteom opišemo celoten nabor proteinov vključenih v nek celični proces, nabor proteinov v celičnem organelu, celici, tkivu, organu in nenazadnje v organizmu. Proteomika je veda, ki se ukvarja z raziskavami proteomov, kakor tudi z obsežnimi raziskavami zgradbe in funkcije posameznih proteinov proteoma ter njihove medsebojne povezanosti. Najpogosteje uporabljana metoda v proteomiki je dvo-dimenzionalna elektroforeza (2-DE), s katero ločimo proteom v dveh dimenzijah. V prvi dimenziji ločimo proteine glede na njihov naboj, v drugi pa glede na njihovo relativno molekulsko maso (M_r). 2-DE sledi identifikacija proteinov, običajno z masno sprekrometrijo, določanje funkcije prepoznavanih proteinov in njihovo umeščanje v celične procese (Bandara, 2002). Kaže, da se bo s temi pristopi mogoče dokopati do informacij, ki bodo razložile do sedaj še nejasne povezave med mehanizmi toksičnega delovanja ter njihovimi morfološkimi in kliničnimi posledicami. Znano je, da genotoksične in karcinogene snovi že po kratkotrajni izpostavitvi, značilno spremenijo profil genskega in proteinskega izražanja v tarčnih celicah. Pomemben cilj »omik« je iskanje potencialnih biomarkerjev, ki bi olajšali zgodnje

odkrivanje in diagnosticiranje različnih vrst raka. Njihova prednost je tudi v zmanjševanju števila testnih živali v predkliničnih poizkusih in časa potrebnega za običajne postopke testiranja učinkovin v različnih živalskih modelih. (Kroeger, 2006).

Tesno povezana s toksikoproteomiko je toksikogenomika, ki odkriva interakcije med geni in okoljem. To novo interdisciplinarno področje okoljske toksikologije je orodje za neposredno proučevanje najzgodnejših faz toksikoloških odgovorov. Vse več dokazov kaže, da se učinek kemikalij s podobnimi toksičnimi lastnostmi, pokaže v značilnem profilu izražanja genov ali proteinov. Na tak način lahko odkrijemo tarčne gene in proteine na način, ki ga tradicionalne toksikološke metode ne omogočajo. Hkrati lahko iščemo tudi vzporednice, med odgovori na toksičnost različnih vrst organizmov (Santos in sod., 2009). Analize proteoma so bolj zapletene od genomskeh, npr. določanje nukleotidnega zaporedja. Posamezen gen običajno producira več različnih oblik proteina, odvisno od rezanja prepisov DNA in post-translacijskih modifikacij, ki so bistvene za funkcijo proteina. Genom se v primerjavi s proteomom v življenskem ciklu celice načeloma ne spreminja, medtem ko se proteom dramatično spreminja v odvisnosti od številnih notranjih in zunanjih dražljajev. (Wery, 2007)

Proteomiko se v toksikologiji uporablja predvsem z namenom pojasnjevanja in ugotavljanja nastanka sprememb na nivoju izražanja proteinov, ki je posledica delovanja toksičnih snovi. V kombinaciji s konvencionalnimi toksikološkimi metodami, proteomika omogoča odkrivanje novih mehanizmov, značilnosti toksičnega delovanja in odgovorov tarčnih celic. S hkratnim prepoznavanjem specifičnih vzorcev odgovorov tarčnih celic na ravni genoma ali proteoma, si znastveniki obetajo izdelavo orodij, za natančnejše in enostavnejše napovedovanje toksičnost preiskovanih snovi za ljudi, že v zgodnjih fazah predkliničnih testov. Raziskave potekajo v smeri iskanja specifičnih biomarkerjev, ki bi omogočili razvoj enostavnih presejalnih testov pri preizkušanju novih učinkovin z morebitnimi genotoksičnimi in mutagenimi učinki. Ker proteomika omogoča testiranje zelo nizkih koncentracij preizkusnih snovi, se s tem bistveno poveča občutljivost zaznave in zmanjša število živali pri predkliničnih poizkusih, zato so dolgoročno tudi ekonomsko ugodnejše. (Bandara in Kenedy, 2002)

4 MATERIALI IN METODE

4.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA

4.1.1 Kemikalije

kemikalija	proizvajalec
Agaroza	BRL
Ampicilin	Sigma
BFM	Sigma
Bradford reagent (Bio Rad protein assay dye reagent concentrate)	Bio Rad
BSA	Gibco BRL
CHAPS	GE
DMSO	Sigma Peptide Institute
FBS	EuroClone
glicerol	Sigma
glicin	Merck
Glukoza	Fluka
Glukoza-6-fosfat	Sigma
IPG pufer	GE
IQ	
KCl	Fluka
L-glutamin	EuroClone
MeIQx	
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Fluka
MTT	Sigma
NaCl	Merck
NADPH	Merck

NaHPO ₄	Fluka
Nutrient Broth N°2 Oxoid	Oxoid
PBS	Gibco
Penicilin/ Streptomycin	Sigma
PhIP	
S9	Moltox
tiourea	Sigma
Tris-baza	Sigma
UREA	Sigma

4.1.2 Laboratorijska oprema

Laboratorijska centrifuga
Brezprašna komora
Hladilnik
IEF plošča
Inkubator za bakterijske kulture
Inkubator za celične kulture
Invertni svetlobni mikroskop
Laminarij za celične kulture
Magnetni mešalnik
Mikrovalovna pečica
SDS elektroforezni sistem
Spektrofotometer
Stresalna miza
Ultrazvočna kopel
Vortex mešalo
Zmrzovalna skrinja (-20°C)

Zmrzovalna skrinja (-70°C)

4.2 POTEK DELA

- Z Amesovim testom smo preverili mutagenost IQ, PhIP, MeIQx v obliki kemikalij in HCA ekstraktov iz pečene govedine, svinjine in perutnine na bakteriji *Salmonella typhimurium* TA98 in TA100.
- S testom citotoksičnosti MTT smo preverili citotoksičnost štirih koncentracij mesnih ekstraktov HCA vseh treh vrst mesa za celice humanega hepatoma HepG2.
- Z 2-DE smo določili spremembe v izražanju proteinov. Celice HepG2 smo 24 ur tretirali s 100-kratnimi redčitvami HCA iz ekstraktov pečene govedine, svinjine in perutnine ter iz njih izolirali celične proteine.

4.3 PRIPRAVA HCA EKSTRAKTOV

HCA ekstrakte iz pečene govedine, svinjine in perutnine je pripravil dr. Tomaž Polak s katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Zrezke debeline 15 mm so termično obdelali na dvoploščnem žaru pri temperaturi 230°C, do središčne temperature 80°C. HCA so ekstrahirali iz 2 mm zapečene mesne skorje in iz sredice posameznega zrezka. Vzorce so najprej razklopili z 1 M NaOH. Prvo ekstrakcijo so izvedli na diatoméjski zemlji Extrelut NT z etilacetatom in ekstrakt koncentrirali na rotavaporju pri temperaturi 40°C in pritisku 350 mbar. Sledila sta ekstrakcija s trdno fazo (SPE) na kolonicah Oasis MCX (Waters) in evaporacija topila v toku dušika.

Rezultati kromatografske ločitve mesnih ekstraktov so pokazali prisotnost 3 HCA v vseh treh vrstah pečenega mesa: PhIP, MeIQx in DiMeIQx (Preglednica 1). Analiza ekstraktov

iz mesnih sredic, kjer temperatura ni presegla 80°C, ni pokazala prisotnosti HCA. V vseh nadaljnjih eksperimentih in testih smo te vzorce uporabljali kot negativne kontrole.

Mesne ekstrakte HCA smo raztopili v 1 mL 100% DMSO, da smo dobili ekvivalente celokupne izolirane količine HCA v 2500 g mesa posamezne vrste (Preglednica 1). Tako raztopljene HCA ekstrakte smo hranili v zamrzovalni omari na -20°C. Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv HCA, ki nastanejo med pečenjem vrst mesa, ki jih v naši družbi najbolj pogosto jemo; v perutnini, govedini in svinjini. Koncentracije smo izbirali v okvirjih količin HCA, ki jih potencialno zaužijemo z mesnim obrokom. Za Amesov test smo jih 10, 20 in 40-krat redčili v DMSO ter se tako obdržali v mejah koncentracij, ki so na podlagi podatkov iz literature in podatkov pridobljenih iz predhodne analize prisotnosti HCA v mesnih ekstraktih, običajno prisotne v pečenem mesu.

4.3.1 Analiza prisotnosti HCA v ekstraktih iz pečenega mesa

Analiza prisotnosti HCA v ekstraktih iz pečenega mesa govedine, svinjine in perutnine, je pokazala prisotnost PhIP, MeIQx in DiMeIQx v vseh treh vrstah pečenega mesa. Največ HCA je bilo v perutnini in približno dvakrat manj v govedini in svinjini, in sicer 10549 ng/2500g mesa v perutnini in približno polovico manj v govedini in svinjini (Preglednica 1), pri čemer je v svinjini približno 1,7-krat več MeIQx in približno 1,7-krat manj PhIP kot v govedini.

Na prisotnost HCA so testirali tudi mesne sredice istih kosov pečenega mesa, v katerih središčna temperatura, med pripravo na dvo-ploščnem žaru, ni presegla 80°C. V njih HCA niso bili prisotni. Ekstrakte mesnih sredic smo v vseh testih uporabljali kot negativne kontrole.

Preglednica 1. Rezultati analize količine HCA v mesnih ekstraktih iz pečene govedine, svinjine in perutnine.

vrsta mesa	HCA	količina HCA v ekstraktu (ng/2500 g mesa)
govedina	PhIP	2682
	MeIQx	2342
	DiMeIQx	210
svinjina	PhIP	4565
	MeIQx	1350
	DiMeIQx	132
perutnina	PhIP	6461
	MeIQx	3751
	DiMeIQx	338

(Vir in pripravil: dr. Tomaž Polak)

4.4 TESTIRANJE MUTAGENOSTI HCA Z AMESOVIM TESTOM

Amesov test, je široko uporabljana metoda za določanje snovi, ki povzročajo mutacije. Mutagenost potencialnih mutagenih snovi se lahko preverja na različnih od histidina odvisnih sevih bakterije *S. typhimurium* oziroma od triptofana odvisnih sevih *Escherichia coli*, mi smo uporabili prve (v nadaljevanju samo *S. typhimurium*). Zaradi mutacij na različnih genih na histidinskem operonu, bakterije ne morejo sintetizirati aminokisline histidin (His^-) in ne morejo rasti ter tvoriti kolonij v odsotnosti His v gojišču. Nove mutacije na mestih teh predhodnih mutacij ali v njihovi bližini, lahko ponovno vzpostavijo normalno stanje t.i. divji tip in na ta način omogočijo bakterijam sintezo His. Bakterije se tako lahko delijo v odsotnosti dodanega His v gojišču, kar je opazimo z rastjo kolonij (His^+). Bolj kot je neka snov mutagen, več mutacij nastane, kar posledično opazimo s povečanjem števila zraslih revertantnih kolonij.

Vsi HCA so mutageni za *S. typhimurium*, z mutagenim potencialom velikostnega reda 10^3 . *S. typhimurium* TA98, ki je občutljiv za premike bralnega okvirja, kaže večjo

občutljivost za HCA kot *S. thymurium* TA100, ki je občutljiv za zamenjave baznih parov. (Sugimura in sod., 2004)

Mutagenost PhIP, IQ, MeIQx in HCA ekstraktov iz pečene svinjine, govedine in perutnine, smo preverili z Amesovim testom povratnih mutacij na sevih *S. thymurium* TA98 in TA100.

4.4.1 *Salmonella thymurium* TA98 in TA100

Specifična tarčna sekvenca *S. thymurium* TA98 je *hisD3052*. S tem sevom se ugotavljajo mutacije, kjer pride do -1 premika bralnega okvirja blizu ponavljajočega se zaporedja -C-G-C-G-C-G-C-G-. Če mutacija povzroči delecijo baznega para, se ponovno vzpostavi pravilno bralno zaporedje za sintezo histidina (His) in bakterija lahko rastne na minimalnem glukoznem gojišču (MGG; Preglednica 5) brez His.

Tarčno zaporedje seva TA100 je *hisG46*. S tem sevom se ugotavljajo mutacije, kjer pride do zamenjav GC baznih parov. Kodon za aminokislino leucin (GAG/CTC) postane kodon za prolin (GGG/CCC). Premiki bralnega okvirja in zamenjave baznih parov se pojavljajo v ponavljajočih se sekvenkah ali vročih točkah, ki vsebujejo GC bazne pare.

Seva se poleg tipa mutacij, ki jih zaznavata, razlikujeta tudi v času inkubacije; pri sevu TA98 rezultate odčitamo po 2 dneh inkubacije, pri TA100 pa po 3 dneh. Seva se razlikujeta tudi v številu spontani revertant; kolonij, pri katerih pride do spontanih mutacij, ki jim omogočajo rast na gojišču brez His in niso posledica mutagenega delovanja testne snovi. Pri TA98 se število spontanih revertant giblje med 20-50, pri TA100 pa med 75-100. Da je rezultat Amesovega testa pozitiven, mora biti število revertant pri testni snovi vsaj 2-krat večje kot število spontanih revertant pri negativni kontroli.

4.4.1.1 Gojenje *S. thyphimurium*

Bakterije *S. thyphimurium* smo, pred izvedbo Amesovega testa, prehodno nagojili. V sterilno centrifugirko, s 15 mL hranilnega bujona (Preglednica 2) z dodanimi 3,25 µL 5 mM ampicilina, smo inokulirali 50 µL bakterijske kulture *S. thyphimurium* TA98 ali TA100, vzete z -80°C ter odtaljene na sobni temperaturi. Bakterijsko kulturo smo pustili čez noč na 37°C v centrifugirki z odvitim pokrovčkom. Pred uporabo bakterijske kulture, smo jo 1,5 ure stresali na stresalniku pri 600 obratih/min na 37°C, da je dosegla logaritemsko fazo rasti.

Preglednica 2. Hranilni bujon.

za 500 mL:	
Nutrient Broth N°2 Oxoid	12,5 g
dH ₂ O	500 mL

4.4.1.2 Metabolna aktivacija s S9

Aromatski amini so biološko neaktivni dokler niso metabolizirani v aktivno obliko. Pri ljudeh in živalih metabolni oksidacijski sistem citohrom P450, ki se nahaja večinoma v jetrih in do določene mere v pljučih in ledvicah, metabolizira številne kemikalije v elektrofilne oblike, ki so reaktivne z DNA. Bakterije nimajo takšnega metabolnega sistema, zato biološka aktivacija brez dodatka ustreznih metabolnih encimov, ni mogoča. V testu smo zato, skupaj s HCA in bakterijsko kulturo, dodali eksogen sesalski metabolni aktivacijski sistem (S9), glodalskega izvora.

S9 je mikrosomalna frakcija pridobljena iz podganjih jeter, v kateri so ohranjeni encimi potrebni za metabolno aktivacijo. Živali tretirajo z Aroklor 1254 ali polikloriniranim bifenilom, da povečajo raven metabolizirajočih encimov. Podgane po 5 dneh ubijejo, jetra homogenizirajo in pulverizirajo. Tako pripravljeno frakcijo S9 se hrani v skrinji na -20°C in jo je pred uporabo potrebno raztopiti v sterilni vodi.

Po priporočilu proizvajalca smo uporabili 10% S9 mešanico (Preglednica 3), ki smo jo pred izvedbo Amesovega testa vedno pripravili sveže in jo imeli ves čas postavljen na led. Pripravljeno raztopino soli smo pred dodatkom v sterilni vodi raztopljele frakcije S9, sterilizirali s filtriranjem skozi 0,22 µm membranski filter.

Preglednica 3. 10% S9 mešanica.

za 1 mL:	
1M KCl	33 µL
0,2M MgCl ₂ x 6H ₂ O	32 µL
0,2M glukoza-6-fosfat	25 µL
0,2M NADPH	20 µL
0,2M NaHPO ₄	500 µL
sterilna H ₂ O	290 µL
10% raztopina S9 v sterilni H ₂ O	100 µL

4.4.2 Izbira koncentracij HCA

Koncentracije PhIP, MeIQx in IQ smo izbrali na podlagi podatkov iz literature tako, da bi se čim bolj približali koncentracijam HCA, ki so realno prisotne v toplotno pripravljenem mesu in jih potencialno zaužijemo z vsakim mesnim obrokom (Preglednica 4). (Pfau in sod., 1999)

Preglednica 4. Koncentracije HCA, ki smo jih testirali z Amesovim testom.

HCA	koncentracija (nM)
PhIP	50
	100
	200
MeIQx	25
	50
	100
IQ	0,25
	0,5
	1

HCA ekstrakte iz pečene perutnine, svinjine in govedine smo redčili 10, 20 in 40-krat. Tako čiste HCA, kot tudi HCA ekstrakte smo predhodno raztopili v DMSO.

Amesov test smo izvedli po standardnem postopku vgradnje v ploščo v 3 paralelkah za vsako koncentracijo posameznega HCA in dveh ponovitvah celotnega testa. Uporabili smo plošče z minimalnim glukoznim gojiščem (MGG) (Preglednica 5), ki vsebuje aminokislino His le v sledovih, ki omogoči omejeno število delitev bakterij brez mutacij. Ko je His v gojišču izčrpan, rastejo le še bakterije z mutacijami, ki lahko same sintetizirajo aminokislino His.

Preglednica 5. Minimalno glukozno gojišče (MGG).

za 1000 mL:	
Agar	15 g
dH ₂ O	930 mL
50x VB sol (Vogel-Bonner medij)	20 mL
40% glukoza	50 mL

Plošče z MGG gojiščem smo prelili z 2 mL površinskega agarja (Preglednica 6) segretega na 42°C v termo bloku, v katerega smo odpipetirali 100 µL ustreznega redčenega HCA ali ekstrakta HCA iz pečenega mesa (Preglednica 4) v DMSO, 100 µL bakterijske kulture *S. typhimurium* TA98 ali TA100 in 500 µL 10% mešanice S9 (poglavlje 4.4.1.2). Plošče smo inkubirali na 37°C, 2 dni (TA98) in 3 dni (TA100). Po končani inkubaciji smo prešteli število revertantnih kolonij in upoštevali povprečno število kolonij iz paralel.

Preglednica 6. Površinski agar.

za 500 mL:	
Agar	3 g
NaCl	2,5 g
dH ₂ O	500 mL

4.5 CITOTOKSIČNOST HCA IZ MESNIH EKSTRAKTOV ZA HepG2 CELICE

4.5.1 HepG2 celice

Celice humanega hepatoma (HepG2) smo izbrali, ker imajo ohranjene encime I. in II. faze metabolne aktivacije, ki so bistveni pri aktivaciji/detoksifikaciji genotoksičnih prokarcinogenov in odražajo metabolizem takšnih snovi *in vivo* bolje, kot eksperimentalni modeli z metabolno nekompetentnimi celicami in eksogenimi aktivacijskimi mešanicami. (Knasmüller in sod., 1997)

4.5.1.1 Gojenje HepG2 celic

Celice humanega hepatoma HepG2 za MTT test in za izolacijo proteinov za 2-DE smo gojili v celičnem mediju za celično kulturo HepG2 (Preglednica 7) v inkubatorju na 37°C, dokler niso dosegle 70-80% gostote rasti na plošči. Vse poizkuse smo izvedli pri tej gostoti rasti.

Preglednica 7. Celični medij za celično kulturo HepG2.

za 50 mL:	
15% FBS	7,5 mL
2% L-glutamin	1 mL
1% penicilin/streptomycin	0,5 mL
Williams celični medij	41 mL

4.5.2 Test citotoksičnosti MTT

Citotoksičnost ekstraktov HCA iz pečenega mesa za HepG2 celice smo preverili s testom MTT. Test MTT je pogosto uporabljana metoda za ugotavljanje citotoksičnosti testnih snovi. 13-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT) je rumena vodotopna snov, ki jo mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic

reducira v vijoličaste nevodotopne kristale formazana. Kristali formazana so topni v DMSO, izopropanolu in podobnih organskih topilih. Razmerje med količino nastalega formazana in številom živih celic je linearno.

HepG2 celice smo nasadili na mikrotitrskе plošče s 96-timi vdolbinicami ("96-well plates") za tkivne kulture. V vsako vdolbinico smo nasadili 5000 celic/200 μL celičnega medija s 4 zaporednimi redčitvami HCA iz ekstraktov pečene govedine, svinjine in perutnine. Za vsako koncentracijo smo naredili 5 paralel. Testirali smo 100, 200, 400 in 800-kratne redčitve HCA, pri čemer smo ostali pri 1% koncentraciji DMSO. Ploščo smo inkubirali 24 ur na 37 °C. Naslednji dan smo celični medij s HCA nadomestili s svežim Williams celičnim medijem za HepG2 brez HCA in inkubacijo podaljšali za dodatnih 24 ur na 37°C. S takšnim pristopom smo poleg citotoksičnosti HCA preverili tudi, če HCA vplivajo na ustavitev celičnih delitev. Po inkubaciji smo s plošč odstranili celični medij in nastale kristale formazana raztopili v 200 μL DMSO in izmerili absorbanco s spektrofotometrom pri valovni dolžini 570 nm in z referenčnim filtrom pri 690 nm.

Redčitve HCA iz mesnih ekstraktov raztopljenih v DMSO, smo pripravili v 200 μL celičnega medija na vdolbinico. DMSO je v koncentracijah višjih od 2% dokazano citotoksičen za HepG2 celice. Pri MTT testu smo zato ostali pri meji 1% DMSO v celičnem mediju; koncentraciji, ki po predhodnih rezultatih iz istega laboratorija ni citotoksična za HepG2 celice. 1% DMSO meja je dopuščala najvišje 100-kratno redčenje HCA ekstraktov.

4.6 ANALIZA SPREMENB IZRAŽANJA PROTEINOV V HepG2 CELICAH

4.6.1 Izolacija proteinov iz HepG2 celic za 2-DE

Celice HepG2 smo gojili na ploščah za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm^2 (T25). Nasadili smo 750000 celic HepG2 na ploščo. Po 24 urah, ko so se celice pritrdile na podlogo, smo celični medij nadomestili s svežim celičnim medijem s 100-krat redčenimi

ekstrakti HCA iz pečene govedine, svinjine in perutnine. Plošče smo inkubirali 24 ur na 37°C. Naredili smo 2 biološki ponovitvi.

Po inkubaciji smo iz plošč odstranili celični medij s HCA in jih sprali z 10 mL pufra PBS. Celice smo nato s pomočjo strgala ločili od plošče in jih prenesli v centrifugirke. Centrifugirali smo jih 5 min, pri 1000 G in 4°C. Supernatant smo zavrgli, peletu pa smo dodali 60 mL ledeno mrzlega ekstrakcijskega pufra (Preglednica 8). Centrifugirke smo imeli celoten čas postopka na ledu. Celične membrane smo lizirali z ultrazvokom v ultrazvočni kopeli, in sicer 3-krat po 10 sekund z 1 minutnim premorom med vsako izpostavitvijo ultrazvočnim valovom. Po lizi smo celice centrifugirali 20 minut pri 20 000 g na 4°C. Supernatant s celičnimi proteini v ekstrakcijskem pufru, smo shranili v eppendorfovih epruvetah po 50 µL na -80°C do prve dimenzije 2-DE.

Preglednica 8. Ekstrakcijski pufer.

za 25 mL:		končna koncentracija
UREA	10,5 g	7 M
TIOUREA	3,8 g	2 M
CHAPS	1 g	4% (w/v)
IPG pufer	500 µL	2% (w/v)
Inhibitor proteaz	1 tableta	
DTT	0,25 g	1% (w/v)
ddH ₂ O	do 25 mL	

4.6.2 Določanje koncentracije izoliranih proteinov z metodo Bradford

Koncentracijo izoliranih proteinov smo izmerili z metodo Bradford za mikrotitrsko ploščo. Metoda Bradford je enostavna in natančna metoda za merjenje koncentracije raztopljenih proteinov. Raztopini proteinov se doda kislo barvilo Coomassie®Brilliant Blue G-250, ki se veže na bazične in aromatske aminokislinske ostanke, še posebej na arginin, pri čemer se raztopina odvisno od koncentracije proteinov različno intenzivnoobarva. Absorbancijo se izmeri s spektrofotometrom pri valovni dolžini 595 nm. Koncentracijo proteinov se odčita

s prekrivanjem vrednosti absorbanc proteinskega standarda, ki ga predhodno pripravimo, z vrednostmi vzorca z neznano koncentracijo proteinov.

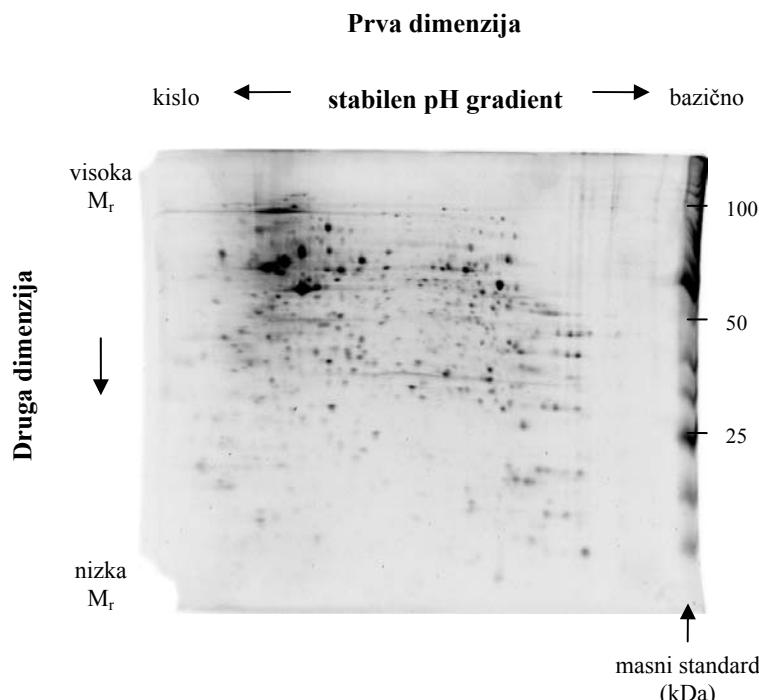
Za proteinski standard smo uporabili lestvico zaporednih redčitev govejega serumskega albumina (BSA) v dH₂O. Pripravili smo 3 paralelne 10 zaporednih redčitev BSA od 0 do 900 µg BSA/mL na mikrotitrski plošči. V vsako luknjico s standardom smo dodali 200 µL 5-krat redčenega Bradford reagenta. S spektrofotometrom smo odčitali vrednosti optične gostote pri 595 nm in narisali standardno krivuljo.

Proteinske vzorce smo 20-krat redčili in jih v treh paralelah za vsako koncentracijo HCA in vrsto mesa nanesli po 10 µL v luknjico in dodali 200 µL 5-krat redčenega Bradford reagenta. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

Povprečne vrednosti paralel standarda in vzorcev smo vnesli v graf in odčitali koncentracijo proteinov v našem vzorcu.

4.6.3 Dvo-dimenzionalna elektroforeza (2-DE)

2-DE je široko uporabljena metoda za analizo kompleksnih proteinskih izolatov iz celic, tkiv in drugih bioloških vzorcev. Proteine ločujemo po dveh neodvisni lastnostih, v dveh ločenih, a povezanih korakih (Slika 4). Prvi korak ali prva dimenzija je izoelektrično fokusiranje (IEF), kjer ločimo proteine glede na njihovo izoelektrično točko (It). Druga dimenzija je klasična SDS-elektroforeza (SDS-E), ki loči proteine glede na njihovo relativno molekulsko maso (M_r).



Slika 4. Značilna slika 2-DE gela.

Proteine v prvi dimenziji ločimo glede na njihov naboj z IEF. V drugi dimenziji pa po njihovi relativni molekulski masi (M_r)s klasično SDS-E. Geli se nato obdelajo s fiksacijskim sredstvom in pobarvajo z ustreznim proteinskim barvilom. Gele osvetljene s primerno svetlobo, izbrano glede na uporabljenno barvilo, se nato fotografira. Rezultat je slika proteinskega profila. Prednost 2-DE metode pred klasičnimi elektroforetskimi metodami je v ločevanju proteinov z enako M_r , ki se razlikujejo v It. (Bandara in Kennedy, 2002)

Metoda poteka v 7 korakih:

- Priprava proteinskih vzorcev
- Rehidracija trakov in nanos proteinskih vzorcev
- IEF
- Uravnoteženje trakov
- SDS-E
- Barvanje gelov
- Analiza rezultatov

4.6.3.1 Prvi korak 2-DE: Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje je elektroforetska metoda, ki ločuje proteine glede na njihovo pI . Proteini so amorfne molekule, ki lahko imajo odvisno od pH okolja pozitiven, negativen ali nevtralen naboj. Neto naboj proteina je seštevek vseh negativnih in pozitivnih nabojev amino ($-NH_3^+$) in karboksilnih ($-COOH^-$) funkcionalnih skupin posameznega proteina. pI je specifična pH vrednost, pri kateri je naboj proteina enak nič, t.j. ko je protein v obliki »zwitter iona«. V raztopini, ki ima pH pod pI , so proteini pozitivno nabiti, nad njo pa negativno. Spreminjanje naboja proteinov v pH gradientu omogoča potovanje v usmerjenem električnem polju.

Pred IEF je potrebno trakove z nanešenim poliakrilamidnim gelom rehidrirati, hkrati pa ob tem v gel vstopijo proteini. Trakove dolžine 13 cm in s pH gradientom 3-10 smo vzeli iz skrinje z $-20^{\circ}C$. Uporabili smo podstavek z rezami in pokrovom, v katerega smo odpipetirali $250 \mu L$ rehidracijskega pufra (Preglednica 9) z dodanimi izoliranimi proteini iz HepG2 celic s končno koncentracijo $150 \mu g$ proteinov v $250 \mu L$ končnega volumna rehidracijskega pufra. Rehidracija je potekala na sobni temperaturi preko noči.

Preglednica 9. Rehidracijski pufer.

za 5 mL:	količina	končna koncentracija
UREA	2,102 g	7 mol/L
tiourea	0,7608 g	2 mol/L
CHAPS	200 mg	2% (w/v)
IPG-pufer pH 3-10	500 µL	2% (w/v)
BFM	1 kristalček	
*DTT	5 mg	65 mmol/L
dd H ₂ O	dopolnilno do 5 mL	

*DDT dodamo sveže tik pred uporabo pufra.

Po končani rehidraciji smo trakove previdno sprali z dd H₂O, jih osušili na filter papirju in jih prenesli na ploščo za IEF. Konce trakov smo prekrili z omočenim elektrodnim trakom in čez enj namestili elektrode ter vse skupaj prelimi s približno 150 mL mineralnega olja. Mineralno olje preprečuje nastanek kristalov UREA-e, ki bi lahko motili potek ločevanja proteinov.

IEF je potekalo pri konstantni temperaturi 20°C in sledečih pogojih:

čas	električna napetost
1 min	do 300 V
1 h	300 V
1 h 30 min	do 3500 V
5 h	3500 V

Po končanem IEF smo trakove zavarili v plastično mapo in jih shranili na -80°C do izvedbe druge dimenzije.

4.6.3.2 Drugi korak 2-DE: Klasična SDS-elektroforeza

SDS-E je elektroforetska metoda za ločevanje polipeptidov po njihovi M_r. Poteka na poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje natrijev dodecil sulfat (SDS). SDS je anionski detergent,

ki v vodnih raztopinah tvori kroglaste micele, sestavljene iz 70-80 molekul. SDS in proteini tvorijo komplekse podobne verižici, kjer se SDS miceli razporedijo vzdolž polipeptidne verige. SDS »prekrije« dejanski naboj proteinov tako, da postanejo vsi negativno nabiti, kar omogoča potovanje proteinov v smeri od negativno nabite katode proti pozitivno nabiti anodi. Zamreženost gela določa hitrost potovanja proteinov odvisno od M_r proteina, manjši potujejo hitreje večji pa počasneje.

En dan pred SDS-E smo pripravili in vlili 12% (w/v) poliakrilamidni gel (gel v nadaljevanju), ki omogoča ločevanje proteinov z M_r od 10 do 200 kDa (Preglednica 10).

Preglednica 10. Poliakrilamidni gel z 12% zamreženostjo.

za 2 gela:	
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30% / 0,8%)*	15,7 mL
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8*	9,8 mL
10% (w/v) raztopina SDS*	0,4 mL
ddH ₂ O*	13 mL
10% (w/v) raztopina APS	195 µL
TEMED	26 µL

*Raztopino akrilamid/bisakrilamid, Tris-HCl, SDS in ddH₂O smo pred dodatkom APS in TEMED, razplinili v ultrazvočni kopeli, 10 min.

Gel smo vlili v kalup za pripravo ločilnega gela debeline 1 mm in ga prelili s plastjo ddH₂O, ki preprečuje stik s kisikom in omogoča enakomerno polimerizacijo.

Naslednji dan smo vzeli z IEF ločene elektroforetske trakove z -80°C in jih pred SDS-E uravnotežili v uravnotežnem pufru (Preglednica 11), ki poteka v dveh korakih.

Preglednica 11. Uravnotežni pufer – osnovni.

za 50 mL (za 2 trakova):	količina	končna koncentracija
Tris HCl, pH 8,8	2,5 mL	75 mmol/L
UREA	18 g	6 mol/L
Glicerol	15 mL	30% (w/v)
SDS	1g	2% (w/v)
Bromfenol modro	0,001 g	0,001% (w/v)
dd H ₂ O	dopolnimo do 50 mL	
*DTT		65 mM
**JAA		260 mM

* Pufer za prvi korak.

** Pufer za drugi korak.

V prvem koraku smo v uravnotežni pufer dodali 0,2 g DTT/20 mL osnovnega pufra in tako pripravljen pufer porazdelili med epruveti po 10 mL. Število epruvet je odvisno od števila trakov, s katerimi istočasno delamo. Epruvete z vstavljenimi trakovi smo 15 min stresali na stresalni mizi. Nato smo jih prestavili v epruvete z na enak način porazdeljenim pufrom kot za prvi korak, v katerega smo dali 0,96 g jodacetamida (JAA)/20 mL osnovnega pufra in jih ponovno dali na stresalno mizo, spet za 15 min.

Medtem ko so se trakovi uravnotežali, smo iz kalupov z geli odlili ddH₂O in površino do suhega osušili s fenom. Dobro osušen gel smo nato prelili s tekočo agarozo, segreto na 80°C (Preglednica 12) in v kalup previdno vstavili osušene in uravnotežene trakove ter jih potopili v tekočo agarozo, da so se usedli na gel. Pri vzorcih svinjine in perutnine smo pred prelitjem z agarozo vstavili filter papirček prepojen z raztopino proteinov znanih molekulskih mas (Invitrogen).

Preglednica 12. Priprava agaroze.

agaroza	0,5 g
1x SDS elektroforezni pufer	100 mL
BFM	1 kristalček

Ko se je agarozu po približno 10 min na sobni temperaturi spet strdila, smo kalupe potopili v elektroforezne posode napolnjene z 1 x SDS elektroforeznim puferom (Preglednica 13), s katerim smo do oznake z vrha prelili tudi kalupe nameščene v elektroforetski posodi.

SDS-E je potekala pri pogojih:

čas	električni tok
15 min	20 mA/gel
dokler indikatorska črta	40 mA/gel
BFM ne doseže konca	
gela (pribl. 1h 15 min)	

Preglednica 13. 1x SDS elektroforezni pufer.

za 1000 mL:	količina	končna koncentracija
Tris-baza	3 g	25 mM
Glicin	14,4 g	192 mM
SDS	1 g	0,1 %
ddH ₂ O	dopolnilo do 1000 mL	

4.6.3.3 Barvanje gelov

Gele smo barvali z barvilo SYPRO® Ruby Protein Gel Stain, ki je kelatno barvilo z rutenijem (Ru) kot centralnim kovinskim ionom. Veže se na širok nabor proteinov in proteinskih spojin: glikoproteine, proteine, ki vežejo kalcij, lipoproteine, fibrilarne proteine idr. Na proteine se ne veže kovalentno, ampak tvori komplekse s primarnimi amini, ki so v ionski obliki (-NH₃⁺). Najmočnejše interakcije tvori z lizinskimi, argininskimi in histidinskimi aminokislinskimi ostanki, šibkejše pa s tirozinskimi in triptofanskimi.

Barvanje gelov poteka v štirih korakih: fiksacija, barvanje, razbarvanje, izpiranje.

Barvali smo po 2 gela hkrati v isti posodici in za to uporabljali 300 mL ustrezne raztopine po spodaj navedenem protokolu.

1. **fiksacija:** fiksacijska raztopina 2 x 30 min
(Preglednica 14)

2. **barvanje:** barvilo SYPRO Ruby čez noč

3. **razbarvanje:** raztopina za razbarvanje 2 x 30 min
(Preglednica 15)

4. **izpiranje:** ddH₂O 3 x 5 min

Preglednica 14. Fiksacijska raztopina.

za 1000 mL:	
100% (v/v) metanol	500 mL
100% (v/v) ocetna kislina	70 mL
ddH ₂ O	dopolnimo do 1000 mL

Preglednica 15. Raztopina za razbarvanje.

za 1000 mL:	
100% (v/v) metanol	100 mL
100% (v/v) ocetna kislina	70 mL
ddH ₂ O	dopolnimo do 1000 mL

Vizualizacija s SYPRO Ruby barvanih proteinov, poteka v komori z virom UV svetlobe. Gele smo fotografirali z digitalno kamero (G:BOX-HR) z uporabo GeneSnap računalniškega programa.

4.6.3.4 Računalniška analiza podatkov

2-DE gele smo analizirali z računalniškim programom »2D Dymension« in z vizualno primerjavo 2-D elektroforetskih lis (lise v nadaljevanju). Program omogoča prekrivanje vzorčnih gelov s kontrolnimi, določi lego ujemajočih se lis in jih primerja med sabo. Program meri intenziteto lis in jo pretvori v normaliziran volumen po spodaj navedeni formuli. Nato izračuna razmerje normaliziranih volumnov lis na vzorčnem gelu z relativnimi vrednostmi ujemajočih se lis na kontrolnem gelu (*I*). Kot relevantne smo vzeli tiste lise, katerih razmerje se je od kontrole razlikovalo vsaj za faktor 2 v pozitivno ali negativno smer ($R > 2$ ali $R < -2$).

$$\text{Intenziteta} = V_{\text{normaliziran}} = V_{\text{lise}} / \sum V_{\text{lise}} \quad \dots(1)$$

Legenda: V : volumen.

Primerjali smo proteinske profile vzorcev tretiranih s HCA ekstrakti glede na pripadajoče negativne kontrole (Poglavlje 4.3.1). Profil kontrole topila (1% DMSO) smo primerjali z geli vseh treh negativnih kontrol ter tako izločili lise, ki so se verjetno spremenile zaradi učinka DMSO.

Rezultati so predstavljeni kot negativi originalnih fotografij vseh gelov z računalniško prilagojenim kontrastom. Vse lise smo pregledali z upoštevanjem originalnega posnetka gela in so na njem tudi dejansko vidne.

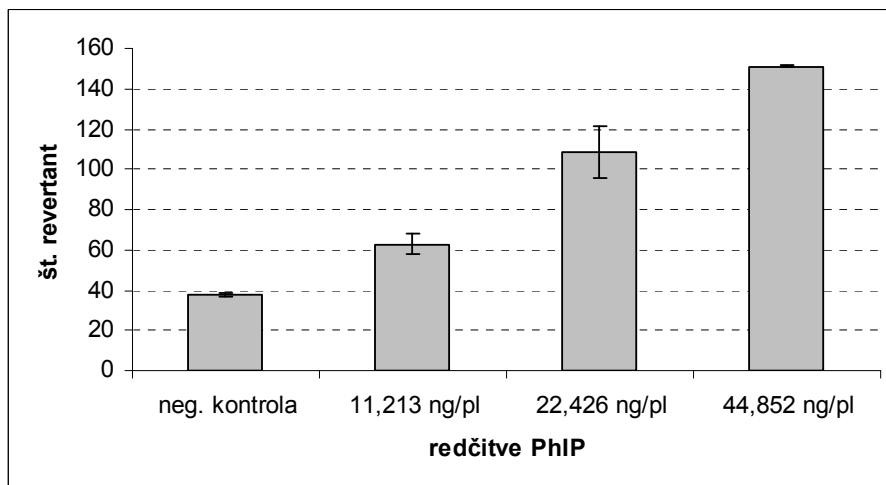
5 REZULTATI

5.1 REZULTATI AMESOVEGA TESTA

Rezultati Amesovega testa se vrednotijo glede na število revertantnih kolonij ali revertant zraslih v prisotnosti testnih snovi v primerjavi z negativno kontrolo. Za pozitiven rezultat mora biti število revertant najmanj enkrat večje od števila spontanih revertant pri negativni kontroli. Število spontanih revertant je relativno konstantno in se pri sevu *S. typhimurium* TA98 giblje okrog 20-30 spontanih revertant na ploščo, pri TA100 pa 75-100.

Vsi testirani HCA v obliki kemikalij (PhIP, MeIQx, IQ) ter HCA ekstrakti iz mesa so povzročili od koncentracije odvisno povečanje števila revertant pri sevu TA98, ki zazna mutacije nastale s premikom bralnega okvirja. Sev TA100, ki zazna mutacije zamenjav baznih parov, ni bil občutljiv, zato rezultati niso prikazani.

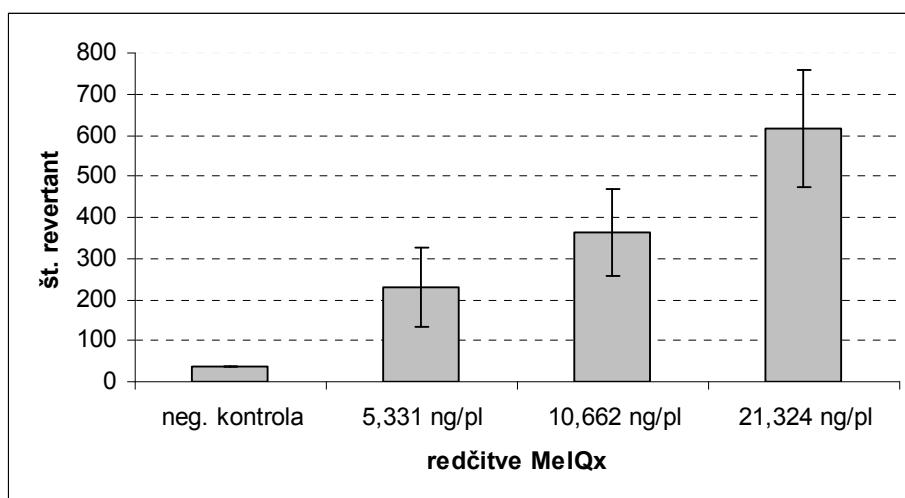
Pri PhIP (kemikalija) se je naraščanje števila revertant v odvisnosti od koncentracije jasno pokazalo (Slika 5).



Slika 5. Mutagenost heterocikličnega amina PhIP za sev *S. typhimurium* TA98.

Rezultati kažejo od koncentracije odvisno povišanje števila revertant. Mutagenost nakazuje že najnižja izbrana koncentracija PhIP, ki je bila 11,213 ng/ploščo (50 nM). Koncentracije, ki smo jih testirali so bile 50, 100, 200 nM, kar ustrezata 11,213; 22,426 in 44,852 ng/ploščo.

MeIQx (kemikalija) je po količini v mesnih ekstraktih na drugem mestu (Preglednica 1). Pokazal se je kot močnejši mutagen kot PhIP. Pri najnižjih koncentraciji (25 nM) je v povprečju povzročil nekaj več kot 200 revertant na ploščo, medtem ko je PhIP povzročil podobno število revertant pri 8-krat višji koncentraciji t.j. 200 nM, ki je bila najvišja testirana koncentracija (Slika 6). Primerjava števila revertant pri isti koncentraciji MeIQx in PhIP (50 nM) kaže, da je MeIQx približno 6-krat močnejši mutagen kot PhIP, saj pri isti koncentraciji v povprečju inducira 6-krat več mutacij, o čemer priča v povprečju 6-krat večje število revertant. Rezultati potrjujejo znane izsledke predhodnih raziskav (Sugimura in sod., 2004).

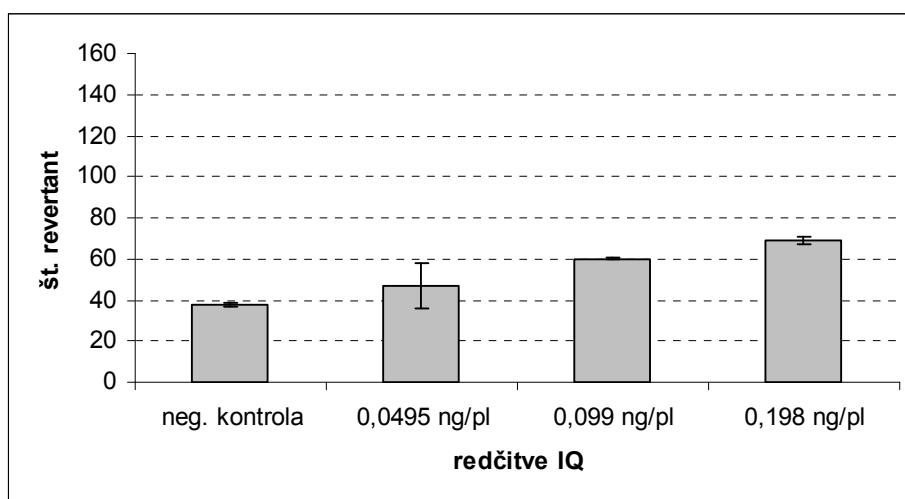


Slika 6. Mutagenost heterocikličnega amina MeIQx za sev *S. typhimurium* TA98.

Rezultati kažejo od koncentracije odvisno povišanje števila revertant. Mutagena je že najnižja izbrana koncentracija MeIQx, in sicer 5,331 ng/ploščo (25 nM). Koncentracije, ki smo jih testirali so bile 25, 50 in 100 nM, kar ustreza 5,331; 10,662 in 21,324 ng/ploščo.

Poleg PhIP in MeIQx smo z Amesovim testom preverili tudi mutagenost heterocikličnega amina IQ (kemikalija), katerega prisotnost analiza ekstraktov iz pečenega mesa ni pokazala. Po podatkih iz literature se v pečenem mesu tvori v zelo nizkih koncentracijah. Predvidevajo, da metode za detekcijo tako nizkih koncentracij še niso dovolj občutljive, da bi lahko nedvoumno potrdili njegovo prisotnost v pečenem mesu (Toribio in sod., 2007).

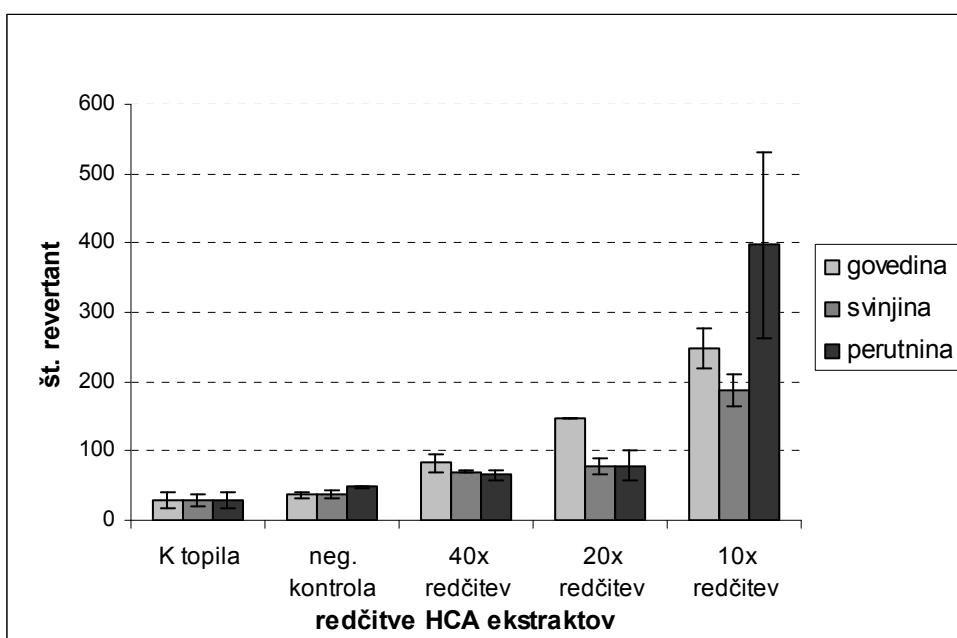
IQ v izbranih koncentracijah ni dal pozitivnega rezultata Amesovega testa. Opazimo lahko nakazan trend povečanja števila revertant z naraščajočo koncentracijo IQ (Slika 7).



Slika 7. Mutagenost heterocikličnega amina IQ za sev *S. typhimurium* TA98.

Rezultati ne kažejo od koncentracije odvisno povišanje števila revertant pri testiranih koncentracijah, kljub temu je opaziti trend naraščanja, od koncentracije odvisnega, števila revertant. Koncentracije IQ, ki smo jih testirali so bile 0,25; 0,5 in 1 nM, kar ustreza 0,0495; 0,099 in 0,1982 ng/ploščo.

Rezultati Amesovega testa HCA ekstraktov kažejo od koncentracije odvisno povišanje števila revertant pri 10- in 20-kratni redčitvi pri ekstraktih vseh treh vrst mesa (Slika 8). Nekoliko bolj mutagen kot ostali ekstrakti je ekstrakt iz perutnine. V povprečju je povzročil 400 povratnih mutacij pri 10-kratni redčitvi in 80 pri 20-kratni redčitvi. Na drugem mestu je govedina. HCA ekstrakt iz svinjine, pa je bil med izbranimi vrstami mesa, najmanj mutagen. Negativne kontrole, iz sredice mesa, kjer temperatura med pripravo mesa ni presegla 80°C, niso pokazale povišanja števila revertant in mutagenosti.



Slika 8. Mutagenost heterocikličnih aminov ekstrahiranih iz treh vrst mesa; govedine, svinjine in perutnine za sev *S. typhimurium* TA98.

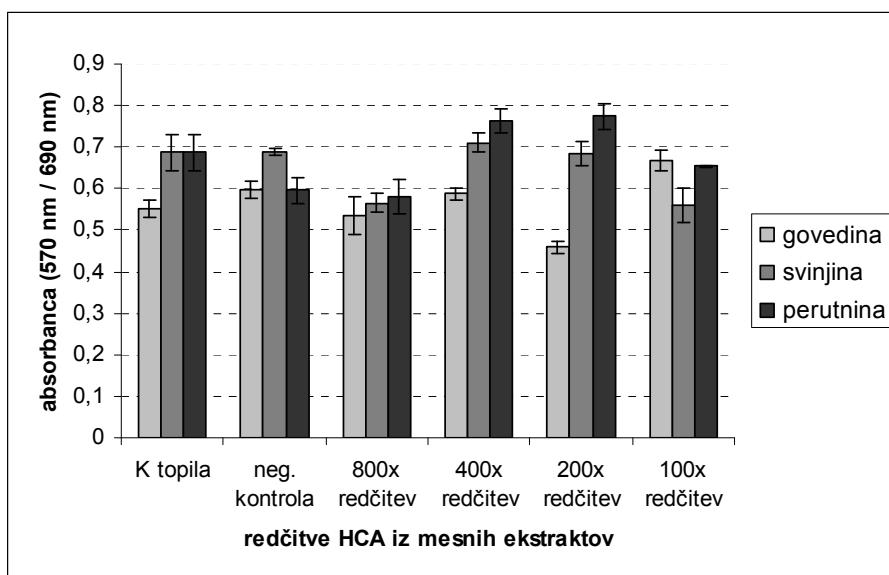
Povečanjem koncentracije HCA, je povzročilo povišanja števila revertant. HCA ekstrakt iz perutnine je v primerjavi s HCA ekstraktom iz govedine povzročil skoraj 2-krat več revertant. Ekstrakti iz mesnih sredic niso bili mutageni.

Legenda: ¹K topila: kontrola topila - 10% DMSO, ²neg. kontrola: negativna kontrola - 10-kratno redčenje ekstrakta iz mesnih sredic, kjer analiza ni pokazala prisotnosti HCA.

5.2 REZULTATI TESTA MTT

HCA ekstrakti pri izbranih koncentracijah niso bili citotoksični za HepG2 celice.

Po 24 urah inkubacije v celičnem mediju s HCA ekstrakti iz pečenega mesa, smo celični medij s HCA nadomestili s celičnim medijem brez HCA in inkubacijo podaljšali za dodatnih 24 ur, da so se celice lahko ponovno delile. Delitveni čas HepG2 je približno 24 ur. S tem pristopom smo želeli preveriti, ali HCA ustavijo celične delitve. Rezultati ne kažejo vpliva HCA na ustavitev celičnih delitev (Slika 9).



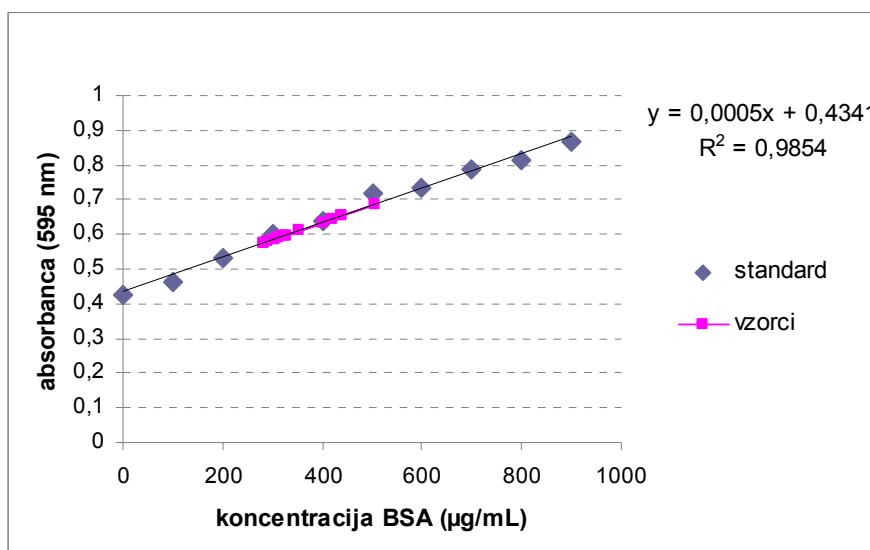
Slika 9. Test citotoksičnosti MTT po 24 urnem tretmaju s HCA ekstrakti iz pečene govedine, svinjine in perutnine na celicah humanega je hepatoma HepG2.

Rezultati niso pokazali citotoksičnosti HCA ekstrahiranih iz pečenega mesa za HepG2 celice.

Legenda: ¹K topila – kontrola topila: 1% DMSO, ²neg. kontrola – negativna kontrola: 100-kratna redčitev ekstraktov iz mesnih sredic, kjer analiza ni pokazala prisotnosti HCA.

5.3 IZOLACIJA PROTEINOV

Na osnovi standardne krivulje znanih koncentracij BSA, smo določili koncentracijo izoliranih proteinov v naših vzorcih (Slika 10).



Slika 10. Standardna krivulja z absorpcijskimi vrednostmi proteinovih vzorcev.

Absorpcijske vrednosti proteinov v vzorcih so sovpadale s srednjim delom standardne krivulje, kar pomeni, da je bilo redčenje vzorcev dobro izbrano.

Minimalna zahtevana koncentracija proteinov v vzorcu za 2-DE je 700 µg/mL (absolutno 150 µg v pripravi proteinovih vzorcev za 2-DE), kar pomeni da je bil izkupiček naše izolacije proteinov iz HepG2 celic uspešen. Koncentracije proteinov v vzorcih so prikazane v Preglednica 16.

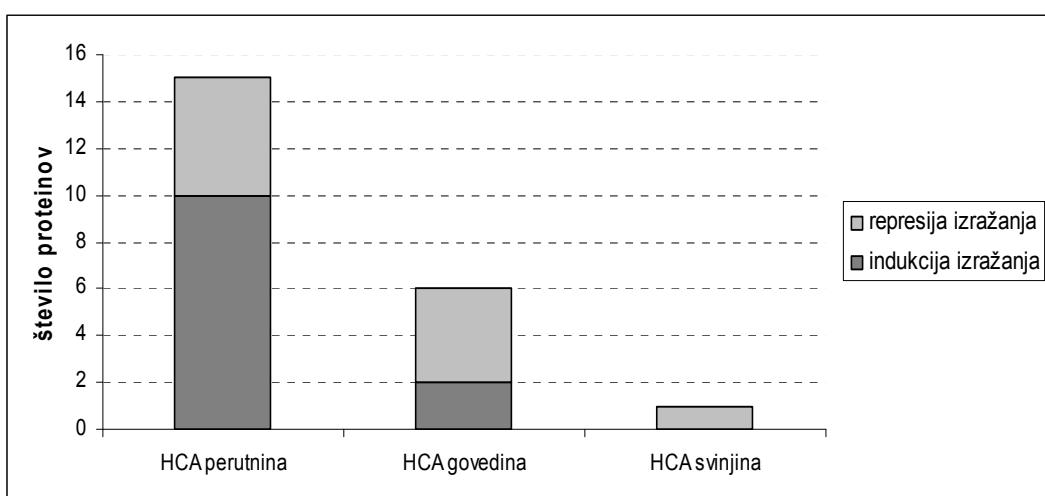
Preglednica 16. Koncentracija proteinov v vzorcih izoliranih iz dveh bioloških ponovitev HepG2 celičnih kultur po 24-urnem tretiranju s HCA ekstrakti za 2-DE.

Celice HepG2 smo v vseh primerih tretirali 24 ur s 100-kratnimi redčitvami HCA ekstraktov v celičnem mediju in 1% DMSO.

tretma	1. biološka ponovitev: koncentracija proteinov ($\mu\text{g/mL}$)	2. biološka ponovitev: koncentracija proteinov ($\mu\text{g/mL}$)
svinjina HCA	5662,6	10142,6
svinjina sredica	5796,0	8756,0
perutnina HCA	5636,0	6542,6
perutnina sredica	7089,3	8409,3
govedina HCA	6262,6	8769,3
govedina sredica	6396,0	8036,0
1% DMSO	6569,3	6102,6

5.4 REZULTATI 2-DE

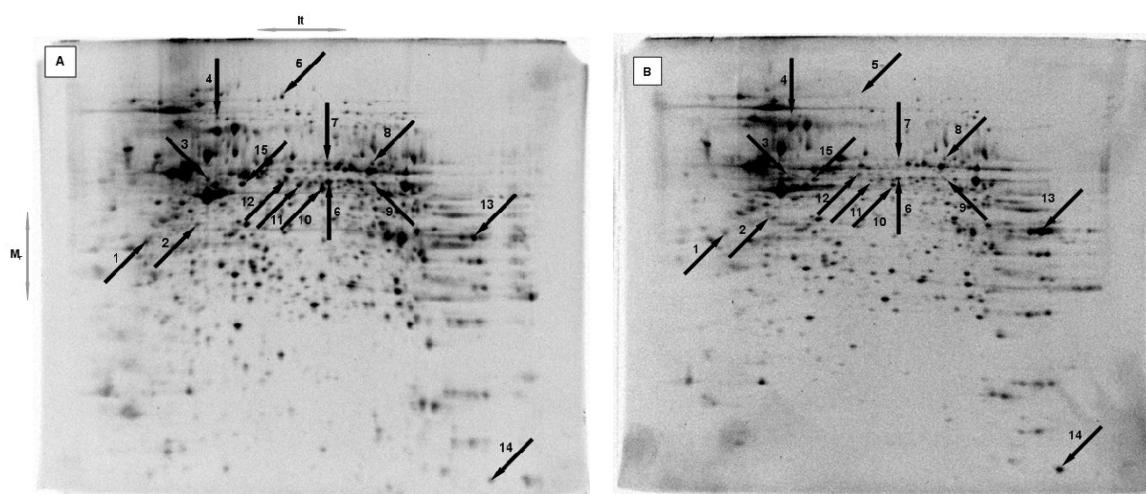
V našem primeru je bilo območje zaznave proteinov z 2-DE v pH območju 3-10 in razponu M_r 10 do 200 kDa. Največ sprememb v izražanju proteinov je bilo v proteinskem profilu HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene perutnine, in sicer pri izražanju 15 proteinov, od tega se je izražanje induciralo pri 10, pri 5 pa je prišlo do represije. V proteinskem profilu HepG2 tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene govedine se je spremenilo izražanje 6 proteinov; izražanje 4 se je zmanjšalo, 2 pa povišalo. Pri HepG2 celicah tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene svinjine se je znižalo izražanje enega proteina (Slika 11).



Slika 11. Število proteinov s spremenjenim izražanjem.

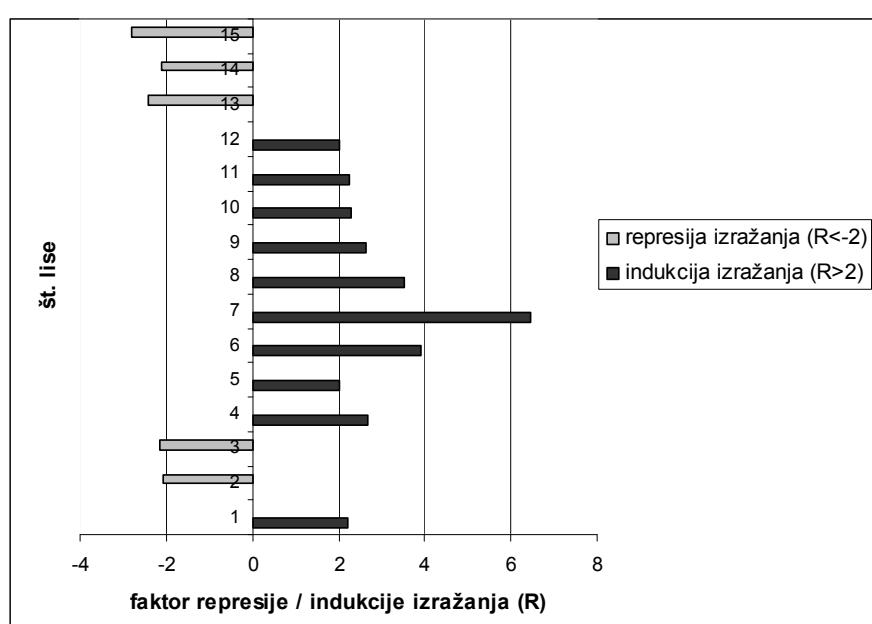
V proteinskem profilu HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene perutnine, se je spremenilo izražanje 15 proteinov, pri tretiranju s HCA iz ekstrakta pečene govedine 6, pri tretiranju HepG2 celic s HCA ekstraktom iz pečene svinjine pa 1 proteina.

Ni opaziti, da bi bil kateri od proteinov s spremenjenim izražanjem, skupen vsem trem ali paru dveh vzorcev.



Slika 12. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene perutnine.

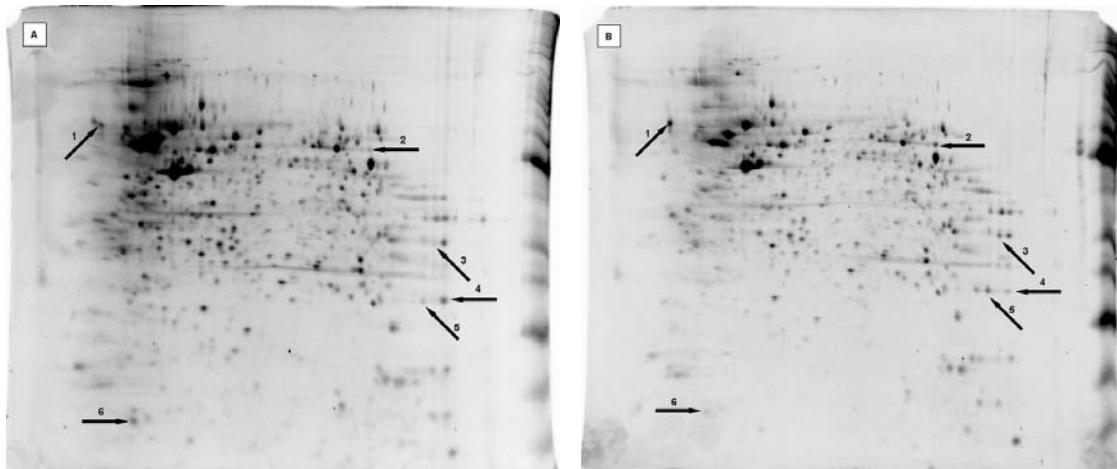
- A. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih 24 ur s 100-kratno redčitvijo HCA iz pečene perutnine.
B. Negativna kontrola: proteinski profil HepG2 celic tretiranih 24 h s 100-kratno redčitvijo ekstrakta iz sredice pečene perutnine.
Puščice prikazujejo proteine, katerih izražanje se je spremenilo najmanj za faktor 2; $R > 2$ ali $R < -2$. V proteinskem profilu HepG2 celic tretiranih s HCA iz pečene perutnine se je, v pH območju 3-10 v vodoravni smeri in območju 10-200 kDa M_r v navpični, spremenilo izražanje 15 proteinov. Območje zaznave proteinov je enako pri vseh proteinskih profilih.



Slika 13. Analiza proteoma HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene perutnine.

Slika prikazuje proteine, katerih izražanje se je glede na negativno kontrolo spremenilo za več kot faktor 2. V proteinskem profilu HepG2 celic tretiranih s HCA iz pečene perutnine se je spremenilo izražanje 15

proteinov. Od tega se je izražanje 10 proteinov induciralo, 5 pa represiralo. Izražanje preostalih proteinov se glede na negativno kontrolo ni spremenilo.

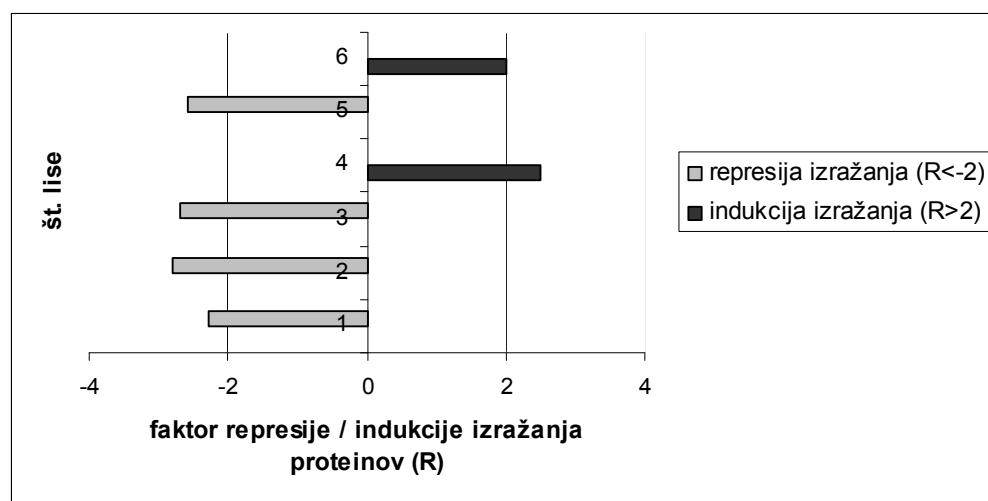


Slika 14. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene govedine.

A. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih 24 ur s 100-kratno redčitvijo HCA ekstrakta iz pečene govedine.

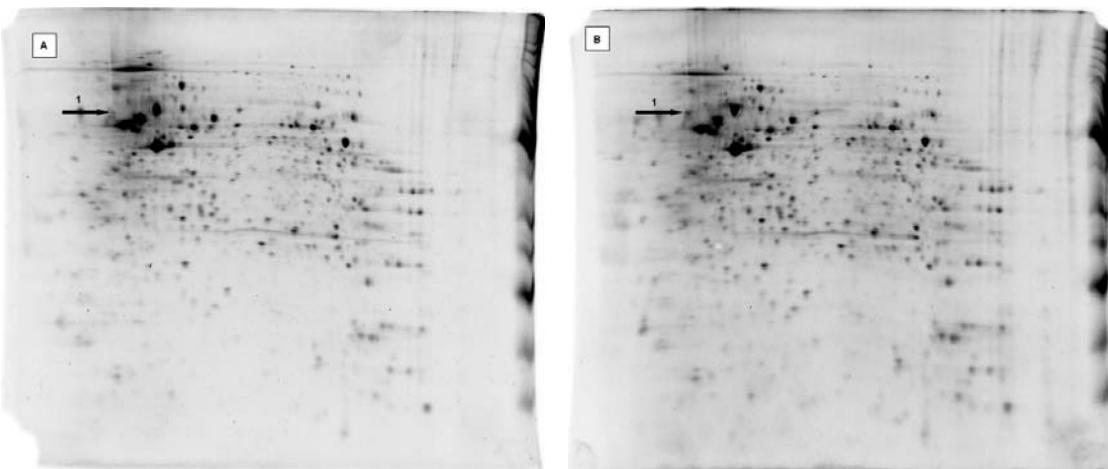
B. Negativna kontrola: proteinski profil HepG2 celic tretiranih 24 h s 100-kratno redčitvijo ekstrakta iz sredice pečene govedine.

V proteinskem profilu HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene govedine se je spremenilo izražanje 6 proteinov.



Slika 15. Analiza proteoma HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene govedine.

V proteinskem profilu HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene govedine se je spremenilo izražanje 6 proteinov, od tega se je izražanje 2 induciralo, 4 pa represiralo.



Slika 16. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene svinjine.

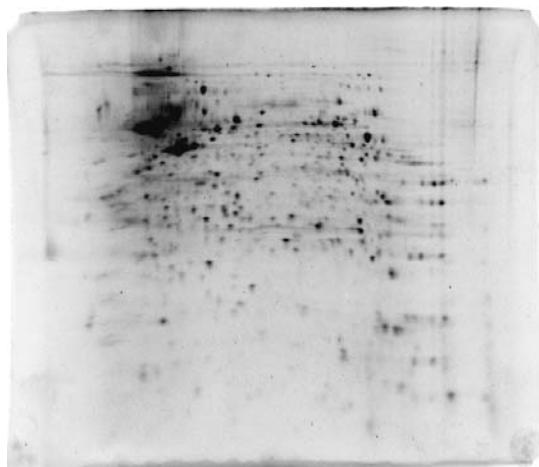
- A. Proteinski profil HepG2 celic tretiranih 24 ur s 100-kratno redčitvijo HCA ekstrakta iz pečene svinjine.
B. Negativna kontrola: proteinski profil HepG2 celic tretiranih 24 h s 100-kratno redčitvijo ekstrakta iz sredice pečene svinjine.

Preglednica 17. Analiza proteoma HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene svinjine.

V proteinskem profilu HepG2 celic tretiranih s HCA ekstraktom iz pečene svinjine se je represiralo izražanje 1 proteina.

št. lise	indukcija izražanja ($R > 2$)	represija izražanja ($R < -2$)
1	-	-2,325

Proteinske profile HepG2 celic tretiranih s HCA ekstrakti smo vedno primerjali s pripadajočo negativno kontrolo, tretirano z ekstraktom iz mesne sredice, kjer analiza mesnih ekstraktov HCA ni pokazala njihove prisotnosti. Ker smo vse HCA ekstrakte raztopljalji v DMSO, smo naredili tudi proteinski profil HepG2 tretiranih z 1% DMSO (Slika 17). Namen proteinskega profila kontrole topila je bil izključiti morebiten obsežen vpliv DMSO na izražanje proteinov v HepG2. Profil kontrole topila smo primerjali z vsemi tremi negativnimi kontrolami. Profili se v izražanju proteinov niso bistveno razlikovali.



Slika 17. Proteinski profil HepG2 celic za kontrolo topila (1% DMSO).

Proteinski profil HepG2 celic se v izražanju proteinov ni bistveno razlikoval od profilov negativnih kontrol za vse tri vrste mesa.

6 RAZPRAVA IN SKLEPI

6.1 RAZPRAVA

6.1.1 Mutagenost HCA ekstraktov iz pečenega mesa

Glede na predhodne podatke o mutagenosti PhIP, MeIQx in IQ so dobljeni rezultati Amesovega testa pričakovani. Potrjujejo hipotezo, da so mutageni tudi v koncentracijah, v kakršnih so potrjeno prisotni v pečenem mesu. HCA v mešanicah lahko na različne načine medsebojno vplivajo na delovanje posameznih v mešanici; sinergistično, zaviralno... Rezultati Amesovega testa kažejo, da se mutageni učinek ni izničil. Iz negativnih rezultatov Amesovega testa na sevu TA100 in pozitivnih na TA98 lahko sklepamo, da HCA povzročajo delecije baznih parov in posledično premik bralnega okvirja. Delecije so verjetno posledica napak nastalih pri izrezovalnem popravljalnem mehanizmu, ko izreže adukte HCA na DNA. MeIQx se je pokazal kot močnejši mutagen kot PhIP. Očitno so visoko reaktivni elektrofilni vmesni produkti, ki nastanejo med metabolno aktivacijo MeIQx, bolj reaktivni z DNA kot so pri PhIP, kar potrjuje tudi dejstvo, da povzročijo več poškodb DNA in posledično več mutacij, čeprav je bila količina MeIQx manjša od PhIP v vseh treh ekstraktih HCA. Rezultati pa potrjujejo že prej znane rezultate mutagenosti HCA (Sugimura in sod., 2004).

IQ se po podatkih iz literature v pečenem mesu tvori v zelo nizkih koncentracijah. Predvidevajo, da metode za detekcijo tako nizkih koncentracij, še niso dovolj občutljive, da bi lahko nedvoumno potrdili njegovo prisotnost v pečenem mesu (Toribio in sod., 2007). IQ je poleg MeIQx dokazano eden najmočnejših mutagenov, zato nikakor ne smemo pozabiti njegovega mutagenega potenciala, na katerega opozarja že nakazan trend naraščanja revertantnih kolonij v Amesovem testu, kjer so bile izbrane koncentracije zelo nizke.

HCA ekstrakt iz pečene perutnine je pričakovano pokazal največji mutageni učinek, saj je ekstrakt vseboval skoraj 2-krat večjo količino HCA, kot sta jo HCA ekstrakta iz pečene svinjine in govedine (Preglednica 1). Na drugem mestu je govedina, čeprav je glede na

izsledke analize vsebovala najmanj HCA, pri čemer pa je bila v ekstraktu večja količina MeIQx, ki je močnejši mutagen kot PhIP.

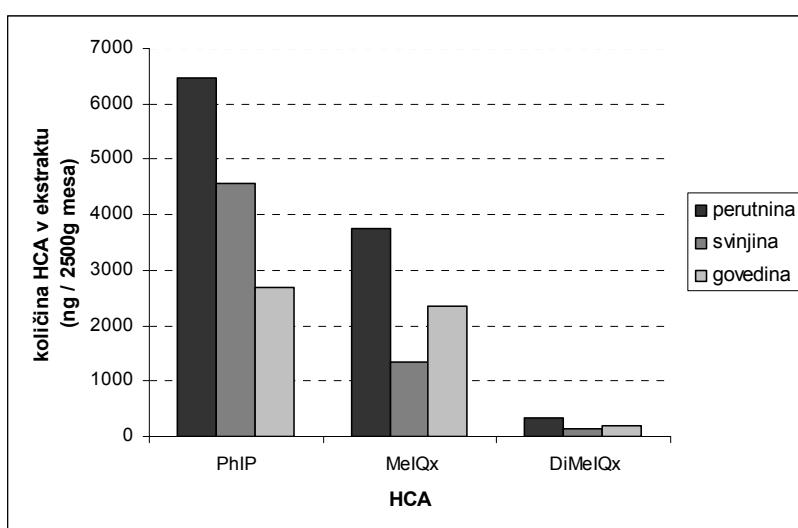
6.1.2 Citotoksičnost HCA ekstraktov iz pečenega mesa za HepG2 celice

Izbrana najvišja redčitev HCA ekstraktov iz pečenega mesa t.j. 100-kratna redčitev, ni pokazala citotoksičnega učinka na HepG2 celice. Z nadomestitvijo tretmaja s HCA v celičnem mediju s celičnim medijem brez HCA in podaljšanjem inkubacije za 24 ur, smo želeli preveriti tudi vpliv HCA na ustavitev celičnih delitev, na katere HCA niso imeli vpliva. Rezultat je v skladu z mehanizmom karcinogenega delovanja HCA, kjer je akumulacija mutacij, ki nastanejo med dolgotrajno izpostavljenostjo, pomemben dejavnik povečanega tveganja za razvoj raka .

6.1.3 Vpliv HCA ekstraktov iz pečenega mesa na izražanje proteinov v HepG2 celicah

Spremembe v izražanju proteinov HepG2 tretiranih s HCA iz pečene perutnine se ujemajo z največjo količino HCA v ekstraktu HCA iz perutnine in so po pričakovanih pokazali največ sprememb v indukciji in represiji izražanja proteinov pri HepG2. Pri proteinskih profilih celic tretiranih z ekstraktom HCA iz svinjine in govedine so spremembe manjše, vendar pri govedini še vedno bolj številčne kot pri svinjini, kar se na prvi pogled ne ujema s podatkom, da je govedina po celokupni količini HCA, ki so se tvorili med pečenjem na zadnjem mestu. Rezultate lahko razložimo s količinami posameznih HCA v obeh ekstraktih, ki se razlikujeta v količini in razmerju PhIP in MeIQx, ki ju vsebujeta. V ekstraktu iz svinjine je 1,7-krat več PhIP kot ekstraktu iz govedine, kjer pa je situacija ravno obratna; 1,7-krat več MeIQx kot PhIP (Slika 18). Kaže da PhIP in MeIQx različno vplivata na proteinski profil HepG2 celic. Če sklepamo iz znanih rezultatov, ima MeIQx večji vpliv na proteom kot PhIP, kar je lahko posledica večjega števila poškodb, ki jih povzroči v HepG2 ali intenzivnejšega detoksifikacijskega metabolizma oz. indukcijo še

drugih ali dodatnih metabolnih poti. MeIQx je poleg IQ potrjeno eden najmočnejših mutagenov (Sugimura in sod., 2004).



Slika 18. Rezultati analize prisotnosti HCA v ekstraktih iz pečene govedine, svinjine in perutnine.

V vseh treh vzorcih pečenega mesa je bilo po količini največ PhIP, sledita MeIQx in DiMeIQx. (Vir in pripravil: dr. Tomaž Polak)

Brez identifikacije proteinov s spremenjenim izražanjem je trenutno nemogoče določiti, na katere proteine ali družine proteinov so imeli HCA največji vpliv. Lahko zgolj špekuliramo, da gre verjetno za proteine udeležene v metabolizem in detoksifikacijo HCA, proteine udeležene v procesih popravljanja poškodb na DNA ter proteasomske proteine. Povzetki podobnih proučevanj vpliva toksičnih snovi na proteinske profile tarčnih celic ugotavljajo, da se le-te ob kratkotrajni izpostavljenosti običajno odzovejo s stresnim odgovorom, ki kot ugotavljajo običajno vključujejo indukcijo izražanja antioksidativnih proteinov topotnega šoka (Hsp), proteine proteasomov, nekatere metabolne proteine idr. (Hooven in Baird, 2008; Santos in sod., 2009; Fanous in sod., 2008). Analize izražanja genov pri podganji hepatokarcinogenezi kot posledici učinkov MeIQx, so pokazale povišano spremenjeno izražanje genov udeleženih v procese celičnega cikla in glutationskega metabolizma (Kang in sod., 2007).

Zavedamo se, da je naš raziskovalni sistem še precej umetno in izolirano zastavljen. Pri naših raziskavah nismo neposredno upoštevali vpliva črevesne flore na absorpcijo HCA v črevesu, ki ima kot navajajo avtorji v literaturi, pomemben vpliv na absorpcijo v črevesu (Vanhaecke in sod., 2008). Prezreti ne smemo vpliva različnih antioksidantov, ki so sestavni del naše prehrane in delujejo preprečevalno (Bacon in sod., 2003). Tudi cvrtje mesa v olju, naj bi zmanjševalo količino HCA v samem mesu, ker se HCA kot relativno nepolarne molekule topijo v olju in kot navajajo avtorji, se lahko količina HCA v mesu pri cvrtju na temperaturi 130°C zmanjša za 40% (Randel in sod., 2007). Kljub temu pa ne smemo zanemariti škodljivega vpliva HCA, čeprav v zelo nizkih koncentracijah. V literaturi ugotavljajo, da se tvorijo adukti PhIP na DNA že pri koncentracijah v velikostnem redu 100 pM (Bacon in sod., 2003), medtem ko so bile naše koncentracije HCA v nM velikostnem razredu.

Za potrditev mutagenosti določene snovi v začetnih stopnjah proučevanja učinka določene snovi, en sam test nikakor ni dovolj, zato smo izbrali več različnih testov, zato da bi lahko morebitno mutagено delovanje potrdili ali ovrgli na podlagi več različnih pristopov in nivojev testiranja. HCA, ki so prisotni v naši vsakdanji prehrani, ostajajo zanimivi z vidika proučevanja humane karcinogeneze, še zlasti v dolgoročnem smislu, ko ne gre več za stresne odgovore celic, ampak verjetno izražanje posledic mutacij na proteom, ki so ključne za razvoj raka.

Proučevanje na nivoju proteoma je relativno novo področje in vsak rezultat odpira številna dodatna vprašanja. Trenutna količina podatkov nam še ne omogoča statistične obdelave rezultatov 2-DE in določitve proteinov, ki se jim je spremenilo izražanje. Rezultati pa nam dajejo dober orientacijski vpogled v situacijo spremenjenega izražanja proteinov, ki ga pripisujemo vplivu HCA na proteinski profil HepG2. Nedvomno je zaradi najvišjega števila sprememb najbolj zanimiv vpliv HCA iz perutnine, kjer bo tudi središče sledečih raziskav, vključno z identifikacijo proteinov.

6.2 SKLEPI

Preglednica 18. Povzetek rezultatov.

	količina HCA (ng/2500g mesa)	povprečno št. revertant pri <i>S. typhimurium</i> TA98 (10x redčitev ekstrakta HCA)	št. proteinov s spremenjenim izražanjem v HepG2 celicah	
			REPRESIJA IZRAŽANJA	INDUKCIJA IZRAŽANJA
PERUTNINA	10549	397	5	10
SVINJINA	6047	187	1	0
GOVEDINA	5234	247	4	2

- HCA iz mesnih ekstraktov pečene perutnine, svinjine in govedine so mutageni za *S. typhimurum* TA98.
- 100-kratne redčitve HCA ekstraktov iz pečene perutnine, svinjine in govedine niso citotoksične za HepG2 celice in ne vplivajo na njihov delitveni cikel.
- HCA iz mesnih ekstraktov, že po 24 urni izpostavljenosti, vplivajo na izražanje proteinov v HepG2 celicah.
- Največji učinek, na ravni bakterijske mutageneze in sprememb izražanja proteinov v HepG2 celicah, imajo HCA iz pečene perutnine.
- HCA iz pečene svinjine so bolj mutageni od HCA iz pečene govedine, vendar imajo manjši vpliv na spremembe izražanja proteinov v HepG2 celicah, kot ga imajo HCA iz pečene govedine. Najverjetneje zato, ker je v ekstraktu HCA iz pečene govedine več MeIQx kot v ekstraktu HCA iz pečene svinjine.

VIRI

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2003. *Tissues and Cancer. V: Essential Cell Biology.* 2. izdaja. New York, Garland Science: 726-737

Bacon J.R., Williamson G., R. Colin G., Lappin G., Langouët S., Bao Y. 2003. *Sulforaphane and querceatin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes.* 24, 12: 1903-1911

Bandara L. R., Kennedy S. 2002. *Toxicoproteomics – a new preclinical tool. Drug Discovery Today,* 7, 7: 411-418

Cheng K., Chen F., Wang M. 2006. *Heterocyclic amines: Chemistry and health. Molecular Nutrition & Food Research,* 50: 1150-1170

Fanous A., Weiss W., Görg A., Jacob F., Parlar H. 2008. *A proteome analysis of the cadmium and mercury response in Corynebacterium glutamicum. Proteomics,* 8, 4976-4986

Felton S. J., Knize G. M., Wu W. R., Colvin M. E., Hatch F.T., Malfatti M. A. 2007. *Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. Mutation Research,* 616, 90-94

Gauvin J., Broyde S., Shapino R. 2001. *The food mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline: a conformational analysis of its major DNA adduct and comparison with the 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline adduct. Chemical Research in Toxicology,* 14, 5: 476–482

Hooven L. A., Baird W. M. 2008. *Proteomic analysis of MCF-7 cells treated with benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, coal tar extract, and diesel exhaust extract. Toxicology,* 249, 1-10

- Kang J. S., Wanibuchi H., Murai T., Morimura K., Kinoshita A., Fukushima S. 2007. Analysis of gene expression in different stages of *MeIQx*-induced rat hepatocarcinogenesis. *Oncology reports*, 17, 747-752
- Kindt T. J., Goldsby A. R., Osborne A. B. 2007. *Cancer and the Immune System. V: Kuby Immunology*. 6. izdaja. New York, W. H. Freeman and Company: 525-529
- Knasmüller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersh-Sundermann V., Williamson G., Heitsch T., Darroudi F., T. Natarajan A. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, 402: 185-202
- Kroeger M. 2006. How omics technologies can contribute to the '3R' principles by introducing new technologies in animal testing. *Trends in Biotechnology*, 24, 8, 343-346
- Loeb L. A., Harris C. C. 2008. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer research*, 68, 6863-6872
- Luch A. 2005. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nature reviews*, 5, 113-125
- Pfau W., L. Martin F., J. Cole K., Venitt S., H. Phillips D., L. Grover P., Marquardt H. 1999. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20, 4: 545-551
- Randel G., Balzer M., Grupe S., Drusch S., Kaina B., Platt K. L., Schwarz K. 2007. Degradation of heterocyclic aromatic amines in oil under storage and frying conditions and reduction of their mutagenic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2245–2253

Ristic A., Cichna M., Sontag G. 2004. Determination of less polar heterocyclic aromatic amines in standardized beef extracts and cooked meat consumed in Austria by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 802, 87-94

Santos P. M., Simões T., Sá-Correira I. 2009. Insights into yeast adaptive response to agricultural fungicide mancozeb: A toxicoproteomics approach. *Proteomics*, 9, 657-670

Sanz Alaejos M. S., Pino V., M. Alfonso A. 2008. Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: Influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. A review. *Food Research International*, 4, 327-340

Strickland P. T., Qian Z., Friesen M. D., Rothman N., Sinha R. 2002. Metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-*b*)pyridine (PhIP) in human urine after consumption of charbroiled or fried beef. *Mutation Research*, 506-50, 163-173

Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens / carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95, 4:290-299

Toribio F., Busquets R., Puignou L., Galceran M.T. 2007. Heterocyclic amines in griddled beef steak analyzed using a single extract clean-up procedure. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 667-675

Turesky R.J. 2005. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 101-117

Turesky R.J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168: 219-227

Vanhaecke L., Knize M. G., Noppe H., De Brabander H., Verstraete W., Van de Wiele T.
2008. Intestinal bacteria metabolize the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans. Food and Chemical Toxicology, 46, 140-148

Weisburger J. H. 2002. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. Mutation research, 506-507, 9-20

Wery J. P. 2007. Application of Proteomics Technologies to Biomarker Discovery and Development – Challenges and Solutions. Current Separations and Drug Development, 22, 1: 15-17. <http://www.currentseparations.com/issues/22-1/CS22-1d.pdf> (13. maj 2009)

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici doc.dr. Metki Filipič za strokovno usmerjanje mojega dela. Hvala recenzentu prof.dr. Gregorju Anderluhu in predsednici komisije doc.dr. Jerneji Ambrožič-Avguštin za pregled naloge.

Posebej zahvalila bi se delovni mentorici dr. Ireni Hreljac in mentorici proteomskega dela naloge doc.dr. Poloni Jamnik za pozitivno vzdušje, pomoč in nasvete pri izvedbi naloge.

Hvala tudi moji družini za zaupanje in potrpežljivost.

PRILOGE

SLOVARČEK NEKATERIH POJMOV

KARCINOGENEZA - potek razvoja rakavega obolenja.

KARCINOGENI - [iz gr.], kemijske snovi, ki povzročajo rast tumorjev in razvoj raka. Karcinogeni so med drugim v hrani (nitrozamin), v cigaretinem dimu (benzpiren) in nekaterih izpušnih plinih. Pogosto se aktivirajo šele v telesu, ko se v reakcijah za razstrupljevanje strupenih snovi kemijsko spremenijo; nekateri karcinogeni so nevarni samo, kadar obstaja ustrezni kokarcinogen ali promotor.

MUTAGENEZA - [iz lat.-gr.], zvečana verjetnost za pojav mutacij zaradi delovanja fizikalnih ali kemijskih dejavnikov (mutagenov).

MUTAGENI - [iz lat.-gr.], snovi ali viri sevanja, ki učinkujejo na dedne zasnove in jih lahko spremenijo. Mutageni so kemijske spojine (npr. fosgen, peroksiidi, akridini, analogi nukleotidnih baz), ionizirajoče sevanje (rentgenski žarki, UV-svetloba), temperaturni šoki.

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO**

Ana SKRT

**MUTAGENOST HETEROCIKLIČNIH AMINOV
IZ RAZLIČNIH VRST PEČENEGLA MESA IN
NJIHOV VPLIV NA PROTEINSKI PROFIL CELIC
HUMANEGA HEPATOMA HepG2**

**DIPLOMSKO DELO
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ**

Ljubljana, 2009