

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Džejla BAJREKTAREVIĆ

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNEGA VPLIVA
IZBRANIH CITOSTATIKOV NA BAKTERIJE,
ČLOVEŠKE IN RIBJE JETRNE CELICE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologije

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Džejla BAJREKTAREVIĆ

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNEGA VPLIVA IZBRANIH
CITOSTATIKOV NA BAKTERIJE, ČLOVEŠKE IN RIBJE JETRNE
CELICE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologije

**DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SELECTED
CYTOSTATICS ON BACTERIA AND HUMAN AND ZEBRAFISH
LIVER CELLS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, v laboratorijih Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok, za somentorico dr. Jano Nunić in za recenzentko prof. dr. Majo Čemažar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica Prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
(mentorica): Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica dr. Jana NUNIĆ
(somentorica): Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka

Članica Prof. dr. Maja ČEMAŽAR
(recenzentka): Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Datum zagovora:

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

Džejla Bajrektarević

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 615.9: 615.277: 579.61: 576 (043) = 163.6
KG genotoksičnost/ citostatiki/ cisplatin/ etopozid/ imatinib mezilat/ 5-fluororacil/ *Salmonella typhimurium*/ jetrne celice človeškega hepatoma/ jetrne celice rib cebric/ celice HepG2/ celice ZFL/ Amesov test/ test mikrojeder/ analiza dvočlenih prelomov DNA/ γ -H2AX/ pretočna citometrija/
AV BAJREKTAREVIĆ, Džejla, dipl. biol (UN)
SA ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/ NUNIĆ, Jana (somentorica) / ČEMAŽAR, Maja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2013
IN UGOTAVLJENJE GENOTOKSIČNEGA VPLIVA IZBRANIH CITOSTATIKOV NA BAKTERIJE, ČLOVEŠKE IN RIBJE JETRNE CELICE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XII, 65 str., 15 pregl., 14 sl., 8 pril., 51 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Vsakodnevno smo izpostavljeni mnogim genotoksičnim dejavnikom, ki povzročajo poškodbe DNA. Takšne dejavnike je treba prepoznati in oceniti, kakšno tveganje za človekovo zdravje predstavljajo. Eden od takšnih dejavnikov v okolju so ostanki citostatikov in njihovi metaboliti. Zaradi tega je bil cilj naše naloge raziskati genotoksično delovanje izbranih citostatikov v različnih testnih sistemih. Glede na pogostost uporabe in predvidene okoljske koncentracije smo izbrali štiri citostatike z različnim načinom delovanja: cisplatin, etopozid, imatinib mezilata in 5-fluorouracil. Kot testne organizme smo uporabili bakterije *Salmonella typhimurium*, sev TA98 in TA100, celično linijo človeškega hepatoma HepG2 in normalne ribje jetrne celice ZFL. Potencialno genotoksično delovanje citostatikov za bakterije *Salmonella typhimurium*, sev TA98 in TA100, smo ugotavljali z Amesovim testom, medtem ko smo genotoksično delovanje citostatikov pri celicah HepG2 in ZLF ugotavljali s testom mikrojeder ter z analizo dvočlenih prelomov s pretočno citometrijo. Z Amesovim testom smo ugotovili, da je citostatik cisplatin deloval mutageno in toksično za bakterijo *Salmonella typhimurium* sev TA98 in TA100. Ostali citostatiki niso delovali mutageno, saj niso povečali števila induciranih revertant. S testom mikrojeder smo pokazali, da pri celicah HepG2 citostatiki cisplatin, etopozid in 5-fluorouracil povečajo število mikrojeder, medtem ko imatinib mezilat ni deloval genotoksično. Po drugi strani pa so pri celicah ZFL vsi citostatiki povzročili povečanje števila mikrojeder. Prav tako smo z analizo dvočlenih prelomov pokazali, da vsi citostatiki, z izjemo imatinib mezilata, pri celicah HepG2 vplivajo na nastanek žarišč γ -H2AX, katerih število je sorazmerno s številom dvočlenih prelomov DNA, medtem ko te metode na celicah ZFL nismo uspeli uporabiti, saj se primarna monoklonska IgG₁ protitelesa proti γ -H2AX niso vezala na celice. Rezultati tako kažejo, da uporabljeni citostatiki delujejo genotoksično na bakterije, človeške in ribje jetrne celice v nizkih koncentracijah, kakršne lahko pričakujemo tudi v okolju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 615.9: 615.277: 579.61: 576 (043) = 163.6
CX genotoxicity/ cytostatic agents/ cisplatin/ etoposide/ imatinib mesylate/ 5-fluorouracil/
Salmonella typhimurium/ human liver hepatocellular cells/ liver cells of Zebrafish/
HepG2 cells/ ZFL cells/ Ames assay/ cytokinesis block micronucleus /analysis of DNA
double stand breaks / γ -H2AX/ flow cytometry
AU BAJREKTAREVIĆ, Džejla
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/ NUNIĆ, Jana (co-advisor)/ ČEMAŽAR, Maja
(reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2013
TI DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SELECTED CYTOSTATICS
ON BACTERIA AND HUMAN AND ZEBRAFISH LIVER CEL
DT M. SC. THESIS (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 65 p., 15 tab., 14 fig., 8 ann., 51 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Everyday we are exposed to many genotoxic agents that cause DNA damage. We must identify such factors and assess the potential risk they pose to human health. One of such factors are the cytostatic residues and their metabolites in the environment. Therefore, the aim of our work was to investigate genotoxic effects of selected cytotoxic agents in different test systems. Due to the frequency of use and the predicted environmental concentrations, we chose four cytostatic agents with different mechanisms of action: cisplatin, etoposide, imatinib mesylate and 5-fluorouracil. As test organisms we used bacteria *Salmonella typhimurium*, strain TA98 and TA100, the human hepatoma cell line HepG2 and normal liver fish cells ZFL. Potential genotoxic effects of cytostatics for bacteria *Salmonella typhimurium* was determined with the Ames assay, while the genotoxic effects of cytostatics in HepG2 and ZLF cells were determined with micronucleus assay and analysis of double strand breaks by flow cytometry. With the Ames assay we observed that cytostatic cisplatin is mutagenic and toxic for *Salmonella typhimurium*, strain TA98 and TA100. Other cytostatics were not mutagenic, as they did not increase the number of induced revertants. With the micronucleus assay we showed that in HepG2 cells cisplatin, etoposide and 5-fluorouracil agents increase the number of micronuclei, while imatinib mesylate was not genotoxic. On the other hand, in ZFL cells all cytostatics increased the number of micronuclei. Furthermore, by analyzing double strand breaks we observed that in HepG2 cells all cytostatics, with the exception of imatinib mesylate, affected the formation of foci of γ -H2AX, which number is proportional to the number of double strand DNA breaks. We were not able to use this method with ZFL cells, as the primary monoclonal IgG1 antibody γ -H2AX did not bind with this cell line. Taken together, our results indicate that selected cytostatics induce genotoxic effects in bacteria, human and fish liver cells at low concentrations, similar to those which can be expected in the environment.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII

1 UVOD	I
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 HIPOTEZA	I
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GENOTOKSIČNOST	3
2.1.1 Testi genotoksičnosti	3
2.1.1.1 <i>In vitro</i> testi za določanje genskih mutacij	4
2.1.1.2 <i>In vivo</i> test genskih mutacij	4
2.1.1.3 <i>In vitro</i> testi za določanje kromosomskih aberacij	5
2.1.1.4 <i>In vivo</i> testi kromosomskih poškodb	5
2.1.1.5 <i>In vitro</i> testi za ugotavljanje primarnih poškodb DNK	6
2.1.1.6 <i>In vivo</i> testi za ugotavljanje primarnih poškodb DNK	6
2.2 NASTANEK RAKA-KANCEROGENEZA	6
2.2.1 Lastnosti rakastih celic	7
2.2.2 Pristopi zdravljenja raka.....	7
2.2.2.1 Citostatiki	8
2.2.2.1.1 Cisplatin	9
2.2.2.1.2 Etopozid	10
2.2.2.1.3 Imatinib mezilat.....	11
2.2.2.1.4 5- fluorouracil.....	12
2.3 VIRI IN USODA CITOSTATIKOV V OKOLJU	14

2.3.1 Vir citostatikov v okolju	14
2.3.2 Usoda citostatikov v okolju.....	15
2.3.2.1 Disociacija.....	16
2.3.2.2 Sorpcija.....	16
2.3.2.3 Biorazgradljivost	16
2.3.2.4 Obstojnost proti fotolizi	17
2.4 TOKSIČNOST CITOSTATIKOV.....	18
2.4.1 Citostatiki v delovnem okolju.....	18
2.4.1.1 Biomonitoring	19
2.4.2 Citostatiki v vodnjem okolju	19
2.5 NADZOR UPORABE CITOSTATIKOV.....	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI.....	21
3.1.1 Kemikalije	21
3.1.2 Model človeških jetrnih celic - celična kultura HepG2.....	22
3.1.3 Model ribjih jetrnih celic – celična kultura ZFL	24
3.1.4 Shranjevanje in štetje celic	24
3.2 METODE.....	25
3.2.1 Gojenje celic HepG2.....	25
3.2.2 Gojenje celic ZFL	26
3.2.3 Ugotavljanje mutagenega delovanja izbranih citostatikov na bakterije <i>Salmonella typhimurium</i> z Amesovim testom.....	26
3.2.3.1 Princip Amesovega testa	26
3.2.3.2 Sevi bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>	27
3.2.3.3 Potek poskusa	27
3.2.3.4 Priprava raztopin in gojišč.....	28
3.2.3.5 Priprava vzorcev.....	29
3.2.3.6 Izvedba Amesovega testa	30
3.2.3.7 Statistična analiza rezultatov	30
3.2.4 Ugotavljanje genotoksičnega delovanja izbranih citostatikov na celice HepG2 in ZFL s testom mikrojeder.....	31
3.2.4.1 Princip testa mikrojeder	31

3.2.4.2	Potek poskusa.....	32
3.2.4.3	Barvanje in štetje MN	33
3.2.4.4	Statistična analiza rezultatov	34
3.2.5	Ugotavljanje genotoksičnega delovanja izbranih citostatikov na celice HepG2 z analizo dvoverižnih prelomov s pretočno citometrijo	35
3.2.5.1	Princip analize dvoverižnih prelomov s pretočno citometrijo	35
3.2.5.2	Potek poskusa.....	35
3.2.5.3	Označevanje celic s protitelesi	37
3.2.5.4	Statistična analiza rezultatov	37
4	REZULTATI	38
4.1	MUTAGENO DELOVANJE CITOSTATIKOV NA BAKTERIJI <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 in TA100.....	38
4.1.1	Amesov test	38
4.1.1.1	<i>S. typhimurium</i> sev TA98.....	38
4.1.1.2	<i>S. typhimurium</i> sev TA100.....	40
4.2	TEST MIKROJEDER	42
4.2.1	Celice HepG2	42
4.2.2	Celice ZFL.....	45
4.3	ANALIZA DVOVERIŽNIH PRELOMOV S PRETOČNO CITOMETRIJO	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.2	SKLEPI	57
6	POVZETEK	59
7	VIRI	61
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev citostatikov CP, ET, IM in 5-FU z delovanjem na novotvorbe v skupine in podskupine (IVZ, 2013).....	8
Preglednica 2: Citostatiki, njihova biorazgradljivost in sorpcija v aktivno blato (Kosjek in Heath, 2011).....	17
Preglednica 3: Uporabljene kemikalije v magistrski nalogi.....	21
Preglednica 4: Uporabljeni citostatiki v magistrski nalogi.....	22
Preglednica 5: Tretiranje celic HepG2 s citostatiki CP, ET, IM in 5-FU	32
Preglednica 6: Tretiranje celic ZFL s citostatiki CP, ET, IM in 5-FU	32
Preglednica 7 Tretiranje HepG2 celic s citostatiki CP, ET, IM in 5-FU.....	36
Preglednica 8: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika CP na celice HepG2	42
Preglednica 9: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika ET na celice HepG2	43
Preglednica 10: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika IM na celice HepG2	44
Preglednica 11: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika 5-FU na celice HepG2.	44
Preglednica 12: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika CP na celice ZFL.....	45
Preglednica 13: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika ET na celice ZFL.....	46
Preglednica 14: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika IM na celice ZFL.....	46
Preglednica 15: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika 5-FU na celice ZFL.....	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Vezava citostatika CP na N-7 mesto gvanina v DNA – (A) 1,2-intraverižni adukt, (B) inerverižni adukt, (C) monofunkcionalni adukt, (D) protein-DNA adukt (Cepeda in sod., 2007)	10
Slika 2: Vezavni mesti encima topoizomeraza II (zeleni krogi) za citostatik ET, ki stabilizira kompleks ET encim –DNA (Bromberg in sod., 2003).....	11
Slika 3: Kromosomska abnormalnost KML ter nastanek Ph (Philadelphia) kromosoma (Savag in Antman, 2002).....	12
Slika 4: Način delovanja citostatika 5-FU (Longlej in sod., 2003)	13
Slika 5: Viri ter odstranjevanje farmacevtskih izdelkov v okolju (Nikolaou in sod., 2007)	15
Slika 6: Celice HepG2 (Foto: Alja Štraser)	23
Slika 7 : Celice ZFL (Foto: Matjaž Novak)	24
Slika 8: Primeri genomskeh nestabilnosti na nivoju kromosoma/molekule – (f) dvojedrna celica z MN, (g) dvojedrna celica z NPB, (h) dvojedrna celica z NBUDs (Fenech, 2007)	31
Slika 9: Število kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA98 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam citostatika CP (A), citostatika ET (B), citostatika IM (C) in citostatika 5-FU (D).....	39
Slika 10: Število kolonij <i>S. typhimurium</i> seva TA100 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam citostatika CP (A), citostatika ET (B), citostatika IM (C) in citostatika 5-FU (D).....	41
Slika 11: Vpliv različnih koncentracij citostatika CP na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) in reprezentativni histogram (B)	48
Slika 12: Vpliv različnih koncentracij citostatika ET na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) in reprezentativni histogram (B).....	49
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij citostatika IM na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) reprezentativni in histogram (B)	50
Slika 14: Vpliv različnih koncentracij citostatika 5-FU na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) in reprezentativni histogram (B).....	51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Priprava 0.1% tripsina za celice HepG2

Priloga B1: Priprava minimalnega glukoznega gojišča

Priloga B2: Priprava Vogel – Bonner medija (VB medij)

Priloga B3: Priprava 40 % glukoza

Priloga B4: Priprava Top agarja

Priloga B5: Priprava raztopine histidin/biotin

Priloga B6: Priprava hranielnega gojišča

Priloga B7: Priprava fosfatnega pufra

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATC	anatomsko-terapevtsko-kemični klasifikacijski sistem
ATP	adenozin trifosfat
AO	akridin oranž
BaP	benzo(a)piren
CH ₂ THF	5,10 – metilen tetrahidrofolat
CP	cisplatin
Cyt-b	citohalazin B
DHFU	dihidrofluorouracil
DMEM	Eaglovo gojišče po Dulbeccu
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
D _{ow}	vodni porazdelitveni koeficient
DPD	dihidropirimidin dehidrogenaza
DSB	dvoverižni prelomi
dTMP	deoksitimidin monofosfat
dTNP	deoksinukleotid
dUMP	deoksiuridin monofosfat
dUTP	deoksiuridin trifosfat
dUTPase	pirofosfataza
EDTA	etilen diamin tetra acetat
EGF	epidermalni rastni faktor
EMA	Evropska medicinska agencija
ET	etopozid
FBS	fetalni goveji serum
FdUMP	fluorodeoksiuridin monofosfat
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano
FdUTP	fluorodeoksiridin trifosfat
FUTP	fluorouridin trifosfat
γ-H2AX	gama-H2AX

HepG2	celice človeškega hepatoma
HIS/BIO	histidin/biotin
IARC	Mednarodna agencija za raziskovanje raka
IM	imatinib mezilat
L-Gln	L-glutamin
miRNA	mikroRNA
MNs	mikrojedra
mRNA	informacijska RNA
NBUDs	jedrni brsti
NDI	jedrni delitveni indeks
NPBs	nukleoplazmatski mostički
NQNO	4-nitrokvinolin-N-oksid
PBS	raztopina slanega fosfatnega pufra
Pen/Strep	raztopina penicilina in streptomicina
Ph	philadelphia kromosom
RNA	ribonukleinska kislina
TK	tirozin kinaza
TS	timidilat sintetaza
UDG	uracil-DNK glukozilaza
ZFL	ribje jetrne celice
5-FU	5-fluorouracil

1 UVOD

Staranje prebivalstva in daljšanje življenjske dobe v razvitem svetu ima za posledico naraščanje števila različnih bolezni, zaradi česar je uporaba farmacevtskih izdelkov čedalje večja. Zaradi nepravilnega odstranjevanja farmacevtskih ostankov le-ti pogosto zaidejo v okolje, vendar so glavni vir njihovih ostankov in metabolitov človeški izločki ter odpadne vode bolnišnic in klinik, ki zaidejo v zemljo, podtalnico in površinske vode in s tem ogrožajo zdravje vseh živih organizmov (Kosjek in Heath, 2011).

Z naraščajočo porabo različnih farmacevtskih izdelkov narašča tudi poraba citostatikov. Citostatiki so zdravila, ki se uporabljajo v kemoterapiji za zdravljenje raka. Rakasta pretvorba celic je odvisna od mutagenih dejavnikov, ki skupaj prizadenejo ekspresijo genov, stimulirajo celično proliferacijo in spodbujajo delitev tistih celic, ki imajo poškodovano DNA. Citostatiki imajo različne mehanizme citotoksičnega delovanja (Novaković in sod., 2009). Dokazano je, da so ostanki citostatikov in njihovih metabolitov že pri nizkih koncentracijah genotoksični (Kosjek in Heath, 2011). Povzročajo poškodbe DNA, mutacije in druge genetske spremembe v celicah, kar vpliva na reprodukcijo, rast in razvoj tako ljudi kot vodnih organizmov (Zounková in sod., 2007). Zaskrbljujoče je, da se v okolju nahajajo tudi metaboliti citostatikov, ki so lahko bolj genotoksični od predhodnih oblik. Večina citostatikov je v okolju slabo razgradljivih tako, da v večini primerov čistilne naprave zapustijo nespremenjeni (Nikolaou in sod., 2007).

V zadnjih letih se število raziskav in optimizacije metod za dokazovanje genotoksičnosti citostatikov povečuje, saj se znanstveniki in zdravstvene organizacije zavedajo posledic ostankov citostatikov v okolju. Istočasno nad uporabo citostatikov poteka stroga nadzor s strani svetovnih agencij in uradov, ki prav tako proučujejo vpliv njihovih ostankov v okolju (Johnson in sod., 2007; Nikolaou in sod., 2007).

1.1 NAMEN DELA

Namen naloge je bil proučiti genotoksični vpliv izbranih citostatikov (cisplatin, etopozid, imatinib mezilat in 5-fluorouracil) na bakterijah *Salmonella typhimurium* (seva TA98 in TA100) z Amesovim testom, na modelih celic človeškega hepatoma (HepG2) ter jetrnih celic odraslih rib cebric (ZFL) s testom mikrojeder in z indikatorskim testom γ -H2AX.

1.2 HIPOTEZA

Pričakujemo, da po izpostavitvi bakterije *S. typhimurium* ter celic HepG2 in ZFL netoksičnim koncentracijam izbranih citostatikov, bodo le-ti delovali genotoksično. Predvidevamo, da bodo izbrani citostatiki povzročili povečanje števila induciranih revertant, nastanek mikrojeder ter nastanek žarišč γ -H2AX.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GENOTOKSIČNOST

Genotoksičnost je sposobnost fizikalnega ali kemijskega agensa, da poškoduje DNA in povzroči mutacije in druge genetske spremembe v celicah živih organizmov. Genotoksične snovi lahko na DNA delujejo direktno ali pa vplivajo na celične mehanizme, ki zagotavljajo natančno podvojevanje DNA (niti delitvenega vretena, topoizomerazo, DNA polimerazo). Spremembe, ki jih povzročajo genotoksični agensi so genske mutacije (točkaste mutacije, delecije, insercije enega ali več genov), klastogeneze (spremembe v strukturi kromosoma) ter aneuploidije (spremembe v številu kromosomov) (Eastmond in sod., 2009).

Genotoksičnost povzročajo številna onesnaževala v okolju, med njimi tudi citostatiki ter njihovi ostanki v okolju (Zounková in sod., 2007). Genotoksini nimajo praga delovanja, tako, da lahko že v nizkih koncentracijah povzročijo genetske poškodbe in mutacije ter posledično rakava in druga kronična obolenja (Filipič, 2004), zato je zelo pomembno, da obstajajo testi s katerimi lahko dokažemo njihovo genotoksičnost.

2.1.1 Testi genotoksičnosti

Teste genotoksičnosti lahko glede na način izvedbe razdelimo na *in vitro* in *in vivo* teste. Glede na vrsto genetskih poškodb, teste nadalje razdelimo na osnovne in indikatorske. Osnovni testi so namenjeni odkrivanju mutacij (Amesov test) in kromosomskih mutacij (test mikrojeder), med tem ko z indikatorskimi testi določamo markerje, ki dokazujejo poškodbe DNA, kot so nastanek DNA aduktov, prelomi DNA verig in izmenjava sestrskih kromatid. Teste genotoksičnosti lahko razdelimo tudi glede na končni genetski učinek, ki ga testi zaznavajo: genske mutacije, kromosomske aberacije in primarne poškodbe DNA (Eastmond in sod., 2009).

2.1.1.1 *In vitro* testi za določanje genskih mutacij

Test povratnih mutacij z bakterijami

Najbolj razširjen je Amesov test, s katerim ovrednotimo pogostost povratnih mutacij specifičnih sevov bakterije *Salmonella typhimurium*, ki zaradi delovanja genotoksinov ponovno pridobi sposobnost sinteze histidina (Mortelmans in Zieger, 2000). Najpogosteje uporabljeni sevi bakterije so TA1535, TA1537 ali TA97 ali TA97a, TA98, TA100 in TA102 (Eastmond in sod., 2009; Antunović in sod., 2011).

Test genskih mutacij v sesalskih celicah

S temi testi ugotavljamo genske mutacije, vključno z zamenjavami baznih parov in mutacije bralnega okvirja (insercije, delecije). Celične linije, ki se uporabljajo pri teh testih so celice mišjega limfoma L5178Y, celice kitajskega hrčka CHO, CHO-AS52 in V79 ter celice človeškega limfoblasta TK6. Testi najpogosteje zaznajo mutacije na lokusih za timidin kinazo, hipoksantin–gvanin fosforibozil transferazo in ksantin–gvanin fosforibozil transferazo (Antunović in sod., 2011).

2.1.1.2 *In vivo* test genskih mutacij

Test genskih mutacij na somatskih in zarodnih celicah glodalcev

Pri tem testu je fag ali plazmidni vektor integriran v genom miši ali podgan – transgen, s pomočjo katerega odkrivamo morebitne mutacije in/ali kromosomske poškodbe. Integriran fag ali plazmid v gostiteljski celici izzove mutacije. Transgen se prenaša tudi v zarodne celice, zato lahko mutacije zaznamo v vseh celicah. Trangeni se na mutacije odzovejo podobno kot endogeni in so primerni za odkrivanje točkovnih mutacij, insercij in manjših delecij (Antunović in sod., 2011).

2.1.1.3 *In vitro* testi za določanje kromosomskih aberacij

In vitro test kromosomskih aberacij v sesalskih celicah

S testom ugotavljamo ali testirana snov povzroča kromosomske aberacije, predvsem poliploidije. S pomočjo trajnih celičnih linij ali primarnih celičnih kultur ugotavljamo, ali določena snov povzroča kromosomske aberacije. Celice, ki so v metafazi opazujemo s pomočjo FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija) ali obarvanjem kromosomov (Antunović in sod., 2011).

In vitro test mikrojeder v sesalskih celicah

S testom mikrojeder določamo genomske nestabilnosti na nivoju kromosoma/molekule, predvsem prisotnost mikrojeder (Antunović in sod., 2011), ki nastanejo kot fragmenti kromosomov ali celih kromosomov, ki zaostanejo v anafazi celične delitve (Fenech, 1993). Takšne celice prepoznamo po dvojedrnem izgledu, ki nastane zaradi s citohalazinom b inhibirane citokineze. Je edina metoda, ki hkrati dokazuje klastogene in aneugene učinke testirane snovi (Antunović in sod., 2011).

2.1.1.4 *In vivo* testi kromosomskih poškodb

Test mikrojeder eritrocitov sesalcev

Namen metode je ugotoviti, ali določena snov povzroča kromosomske poškodbe (številčne in strukturne) polikromatičnih eritrocitov v kostnem mozgu in/ali periferni krvi živali (po navadi glodalcev) (Antunović in sod., 2011).

Aberacija kromosomov kostnega mozga sesalcev

S testom ugotovimo, ali določena snov povzroča kromosomske aberacije celic kostnega mozga živali (po navadi glodalcev), tako, da s testom ugotovimo, ali je testirana snov dosegla kostni mozek. S testom lahko ugotavljamo kromosomske aberacije tudi drugih tkiv in ne samo kostnega mozga (Antunović in sod., 2011).

2.1.1.5 *In vitro* testi za ugotavljanje primarnih poškodb DNA

SOS test (na primer *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002)

Test vsebuje fuzijo gena β - galaktozidaze in gena za SOS odgovor. Genotoksin aktivira odgovor, ki ga ugotavljamo z merjenjem aktivnosti encima β - galaktozidaze (Žegura in sod., 2006).

Test komet

S testom komet zaznavamo eno - in/ali dvoverižne prelome DNA in alkalno labilna mesta, ki so posledica neposrednih poškodb DNA ali pa nastanejo kot vmesna stopnja med popravljanjem poškodb DNA (Antunović in sod., 2011).

2.1.1.6 *In vivo* testi za ugotavljanje primarnih poškodb DNA

Nenačrtna sinteza DNA v jetrnih celicah sesalcev

Namen tega testa je določiti preizkušane snovi, ki sprožijo popravljanje DNA v jetrih tretiranih živali. Preizkus temelji na vključitvi izotopsko označenega timidina v DNA jetrnih celic, v katerih je majhna pogostnost celic v fazi S celičnega ciklusa (Antunović in sod., 2011).

2.2 NASTANEK RAKA - KANCEROGENEZA

Kancerogeneza je kompleksen proces, pri kateri pride do sprememb na celični DNA. Spremembe nastanejo tako na genih, ki stimulirajo delitev celic, kot tudi na genih, ki so vpleteni v mehanizme kontrole podvojevanja DNA, aktivacijo popravljalnih mehanizmov ter sprožanja apoptoze. Vse nastale spremembe morajo biti irreverzibilne in se morajo kot take prenesti na naslednjo generacijo celic. Kancerogeni dejavniki, ki povzročajo rakasto pretvorbo celic so lahko mutageni ali epigenetski dejavniki. Mutageni dejavniki so lahko fizikalni (UV svetloba in ionizirajoče sevanje), kemični (aflatoksine, heterociklične aromatske amine, benzopirene, N-nitrozamine, katrane in akrilamid) in biološki (predvsem virusi: hepatitis B, Epstein Barrow virus, humani T-limfocitotropni virus 1 ter virus humane imunske pomankljivosti). Epigenetski dejavniki predstavljajo stalen stres za celico in neposredno ne prizadenejo strukture DNA. Po navadi gre za spontane mutacije, ki

najpogosteje nastanejo zaradi napak, ki jih naredijo polimeraze pri podvojevanju DNA (Novaković in sod., 2009).

Znanstveniki so ugotovili, da ima tudi RNA oziroma mikroRNA (miRNA) (18–25 nukleotidov) pomembno vlogo pri izražanju različnih genov, ki uravnavajo delitev celic, razvoj in diferenciacijo ter tistih genov, ki so nujni za apoptozo. miRNA se veže na 3' konec mRNA (3'UTR) in s tem prepreči prevajanje mRNA. Odvisno na katero mRNA se veže, miRNA lahko deluje tudi kot tumorski supresor ali onkogen (Novaković in sod., 2009).

2.2.1 Lastnosti rakastih celic

Rakasto spremenjena celica je manj diferencirana kot normalna celica in ima sposobnost neskončne celične delitve (Serša, 2009). Z nadaljnimi delitvami le-te pride do nastanka genetsko nestabilnih celic, ki oblikujejo tumor s heterogeno populacijo celic (Folkman, 2007). V celicah se kopijo mutacije v genih, ki skrbijo za rast, smrt in diferenciacijo celic, kar celicam omogoči večjo mobilnost, invazivnost, vstop v bezgavke in v žilje ter tvorbo metastaz (Serša, 2009). Celice se do nekaj milimetrov velikosti sprva prehranjujejo z difuzijo kisika in hranili iz bližnjih žil (Folkman, 2007). To fazo imenujejo avaskularna faza rasti, ki lahko traja več let (Serša, 2009). Ko pa maligna celica začne izločati angiogene dejavnike se sproži angiogeneza tumorjev, kar omogoča intenzivno delitev malignih celic in posledično vodi v hitro rast tumorja (Folkman, 2007). Novo nastalo žilje rastočega tumorja je neorganizirano in se razlikuje od žilja normalnih tkiv (Serša, 2009).

2.2.2 Pristopi zdravljenja raka

Rak lahko zdravimo lokalno ali sistemsko. Najbolj pogost način lokalnega zdravljenja raka je kirurško zdravljenje, ki omogoča odstranitev tumorske mase. Drug lokalnen način zdravljenja raka je radioterapija, pri kateri uporabljam različne vrste ionizirajočega sevanja. Pri tem pride do enojnih ali dvojnih prelomov DNA, s čemer je onemogočena nadaljnja delitev celic. Najpogosteje se uporablja gama sevanje, X žarki in elektroni. Sistemsko zdravljenje obsega kemoterapijo, hormonsko terapijo in zdravljenje z biološkimi

zdravili. Kemoterapija uporablja naravne ali umetno pridobljene spojine, ki imajo protitumorski učinek. Kemoterapeutiki delujejo na cel organizem, zato govorimo o kemoterapiji kot o sistemskem zdravljenju. Kemoterapeutiki niso specifični za tumorske celice, zaradi mehanizma njihovega delovanja delujejo predvsem na hitro se deleče celice, tako tumorske kot normalne. Hormonska terapija se uporablja za zdravljenje hormonsko odvisnih rakov (rak prostate in dojke) in vpliva na endokrini sistem. Pri zdravljenju z biološkimi zdravili pa uporabljamo snovi, ki spodbujajo telesu lastne mehanizme v boju proti raku, kot so imunomodulatorji in tarčna zdravila. Med imunomodulatorje spadajo citokini, kot so interleukin-2 in interferoni, ki delujejo direktno na tumorske celice ali preko spodbujanja imunskega odziva. Tarčna zdravila pa delujejo na specifične molekularne tarče v maligni celici. Pripravljena so tako, da selektivno zavirajo tarčo, ki je v maligni celici spremenjena, v normalni pa ne. Genska terapija pa je specifična vrsta zdravljenja, kjer z vnosom specifičnega gena v celice selektivno vplivamo na tumorske celice (Serša, 2009).

V naši magistrski nalogi smo preverjali genotoksično delovanje citostatikov cisplatin (CP), etopozid (ET), imatinib mezilat (IM) ter 5 – fluorouracil (5-FU), zato se bomo v nadaljevanju osredotočili le na ta protirakava zdravila.

2.2.2.1 Citostatiki

Citostatiki so zdravila, ki se uporabljajo v kemoterapiji. Anatomsko-terapevtsko-kemični klasifikacijski sistem (ATC angl. Anatomical Therapeutic Classification) je sistem za razvrščanje zdravil, ki uvršča citostatike v razred L, kamor so uvrščena zdravila z delovanje na novotvorbe in imunomodulatorji. Nadalje se razred L razvrsti še v skupine in podskupine, ki so za CP, ET, IM in 5 – FU prikazane v Preglednici 1 (IVZ, 2013).

Preglednica 1: Razvrstitev citostatikov CP, ET, IM in 5-FU z delovanjem na novotvorbe v skupine in podskupine (IVZ, 2013)

Citostatik	Skupina	Podskupina
CP	L01X: druga zdravila z delovanjem na novotvorbe	L01XA: platinove spojine
ET	L01C: rastlinski alkaloidi in druge naravne učinkovine	L01CB: derivati podofilotoksina
IM	L01X: druga zdravila z delovanjem na novotvorbe	L01XE: inhibitorji protein kinaz
5 - FU	L01B: rastlinski zaviralci celične presnove	L01BC: analogi pirimidinskih baz

Znanih je okoli 50 različnih vrst citostatikov, ki se uporablajo v bolnišnicah razvitih držav. 75 % teh zdravil pacienti uporablajo v domači oziroma ambulanti oskrbi. Zdravljenje s kemoterapijo v razvitih državah vsako leto narašča za 10 % (Johnson in sod., 2007; Kosjek in Heath, 2011).

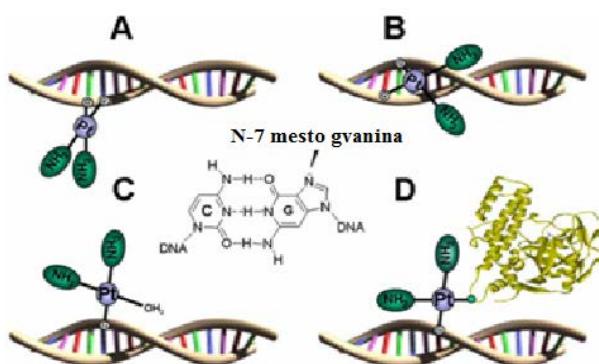
Med najpogosteje uporabljene citostatike štejemo 5-FU, gemcitabin, ifosfamid, ciklofosfamid, metotreksat, CP, ET in doksorubicin, medtem ko je uporaba IM v porastu (Zounková in sod., 2007; Kosjek in Heath, 2011). Na podlagi pogostosti uporabe, predvidenih okoljskih koncentracij in na podlagi različnih mehanizmov delovanja, smo v magistrski nalogi proučili genotoksično delovanje CP, ET, IM in 5-FU, kateri so v nadaljevanju podrobnejše opisani.

2.2.2.1.1 Cisplatin

Platinove (II) koordinacijske spojine uvrščamo med najpomembnejše anorganske in organokovinske protirakave učinkovine. Kljub nekaj tisoče preizkušenim kompleksom, je še vedno najbolj uporabljen cisplatin (CP) (Obreza, 2009). CP (*cis*-diaminodikloro platina(II) oz. *cis*-DDP) je zelo razširjen citostatik, ki je bil prvi v skupini snovi, ki delujejo na bazi platine. Je modelna učinkovina za zdravljenje raka, kar se tiče uporabe kovin v medicini. Poleg svojega analoga karboplatina (*cis*-diamino-1,1-ciklobutandikarboksilat platin(II)) (Cepeda in sod., 2007) in oksaliplatina ((1R,2R)-diaminocyclohexane)oxalate-platinum (II) (Harper in sod., 2010), je danes med najpogosteje uporabljenimi citostatiki (Cepeda in sod., 2007).

Princip delovanja CP je v vezavi na tarčno (tumorsko), kot tudi ne tarčno DNA kar posledično inhibira transkripcijo in/ali replikacijo in zaradi tega pride do apoptoze ali nekroze celic ter s tem do celične smrti (Wang in Lippard, 2005). CP se veže na DNA brez kloridnih ligandov. Molekula vode sčasoma odstrani en ali oba kloridna liganda, tako, da nastane $[Pt(H_2O)Cl(NH_3)_2]^+$ in $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$ kation. Namesto klora je na molekulo vezana voda, ki zlahka izstopi, kar omogoča molekuli CP, da dostopa do baz v DNA. Najpogosteje se veže na N-7 mesto gvanina in adenina. Nastanejo 1,2- ali 1,3-intraverižne in interverižne prečne povezave oziroma DNA adutki, med verigami DNA (Slika 1). Nastale poškodbe prepoznajo specifični proteini, ki sprožijo popravljalne mehanizme ali poti, ki vodijo v celično smrt z apoptozo (Pabla in sod., 2008).

CP se uporablja za zdravljenje raka jajčnikov, raka materničnega vrata, drobnoceličnega pljučnega raka, mišično – invazivnega raka sečnega mehurja ter raka glave in vrata. CP kot tudi carboplatin in oksaliplatin, se pogosto uporablja v kombinaciji z drugimi citostatiki, kot so ET, 5-FU, vinblastin, gemcitabin, ciklofosfamid, doksorubicin in epirubicin. Uporaba CP ima tudi tudi stranske učinke, saj povzroča izpadanje las, je nefrotoksičen, nevrotoksičen, emetogen ter ototoksičen (Wang in Lippard, 2005).



Slika 1: Vezava citostatika CP na N-7 mesto gvanina v DNA – (A) 1,2-intraverižni adukt, (B) interverižni adukt, (C) monofunkcionalni adukt, (D) protein-DNA adukt (Cepeda in sod., 2007: 4)

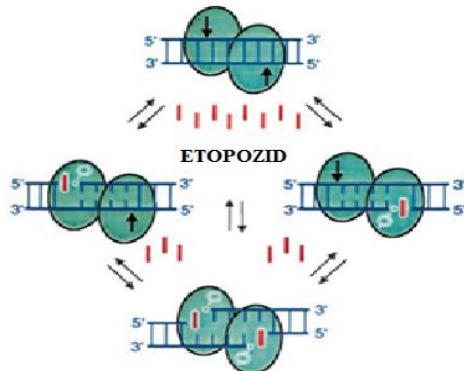
2.2.2.1.2 Etopozid

Leta 1880 je Podwyssotski iz korenike rastline *Podophyllum peltatum* izoliral podofilotoksin, ki so mu že v 50 - letih določili strukturo (Obreza, 2009). Njegov polsintezni derivat, ki se v medicini uporablja že 20 let za zdravljenje raka, je etopozid (ET) (Bromberg in sod., 2003).

Glavni mehanizem protitumorskega delovanja je inhibicija DNA – topoizomeraze II ter inhibicija formacije mikrotubulov (Castro in sod., 2003). Topoizomeraza II je encim, ki se veže na DNA in cepi obe verigi tako, da gre druga veriga skozi luknjo, ki jo je ustvaril encim. Cepljena DNA se nato zopet zlepi (Bromberg in sod., 2003). ET deluje tako, da prepreči ponovno povezovanje fragmentov DNA, saj ima topoizomeraza II dve vezavni mesti za deriveate podofilotoksina, ki stabilizirajo kompleks učinkovina – encim – DNA (Slika 2). Delovanje je najbolj izraženo v S in na začetku G2 faze celičnega cikla. Omenjeni kompleksi se nabirajo v celici in sprožijo apoptozo (Obreza, 2009).

ET se uporablja za zdravljenje drobnoceličnega pljučnega raka ter raka na testisih v kombinaciji z drugimi učinkovinami. Učinkovitost se kaže tudi pri nekaterih limfomih.

Za ET je značilno teratogeno delovanje, zato je uporaba v nosečnosti odsvetovana (Obreza, 2009).



Slika 2: Vezavni mesti encima topozomeraza II (zelena kroga) za citostatik ET, ki stabilizira kompleks ET-encim –DNA. Encim se veže na DNA in povzroči dvooverižni prelom, nato pa molekula ET (rdeče) prepreči ponovno zlepjenje verig (Bromberg in sod., 2003: 5)

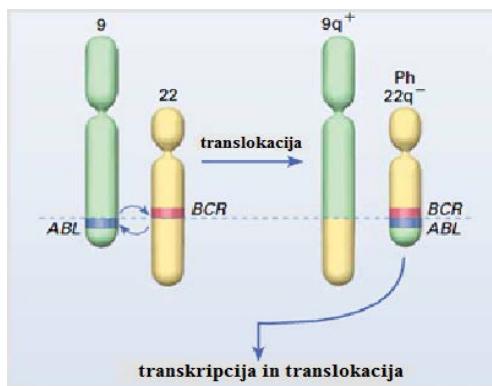
2.2.2.1.3 Imatinib mezilat

Imatinib mezilat je inhibitor tirozin kinaze. Tirozin kinaza je transmembranski protein, ki katalizira prenos fosfatnih skupin iz adenozin trifosfata (ATP) do tirozinskih ostankov na proteinu substrata. Fosforilacija teh proteinov je pomemben mehanizem v signalni transdukciji in regulaciji bioloških procesov kot so celična rast, diferenciacija in celična smrt (Obreza, 2009).

IM je citostatik za zdravljenje kronične mieloične levkemije (KML) in je prvo zdravilo, usmerjeno proti točno določeni tarči, encimu BCR-ABL s tirozin kinazno aktivnostjo (Kralj in sod., 2012). IM se veže na aktivno mesto BCR-ABL, kamor naj bi se vezal ATP in inhibira encimsko aktivnost (Rošker, 2011). Z inhibicijo tega encima IM prepreči nekontrolirano delitev rakastih celic (Kralj in sod., 2012).

Za večino KML je značilna kromosomska abnormalnost, ki se imenuje Philadelphia (Ph) kromosom, pri kateri gre za recipročno translokacijo med kromosomoma 9 in 22. Posledica translokacije je fuzija ABL onkogena kromosoma 9 in BCR regije na kromosому 22, pri kateri pride do nastanka himernega BCR-ABL gena, ki kodira protein z izrazito tirozin kinazno aktivnostjo (Savag in Antman, 2002) (Slika 3). IM je specifičen za domene tirozin kinaz ABL, PDGF-R in c-kit (Rošker, 2001).

IM se uporablja tudi za zaviranje prenosa signalov preko tirozin-kinaz c-kit, ki so odgovorne za pojav gastrointestinalnih stromalnih tumorjev (GIST) (Savag in Antman, 2002). Najpogostejsi stranski učinki zdravljenja z IM so zadrževanje tekočine (edemi spodnjih udov), problemi s kožo (izpuščaji) in dispepsija (motnje s prebavo) (Rošker, 2011).



Slika 3: Kromosomska abnormalnost KML ter nastanek Ph (Philadelphia) kromosoma, pri kateri pride do translokacije med kromosomom 9 in 22 in do nastanka BCR-ABL gena (Savag in Antman, 2002: 3)

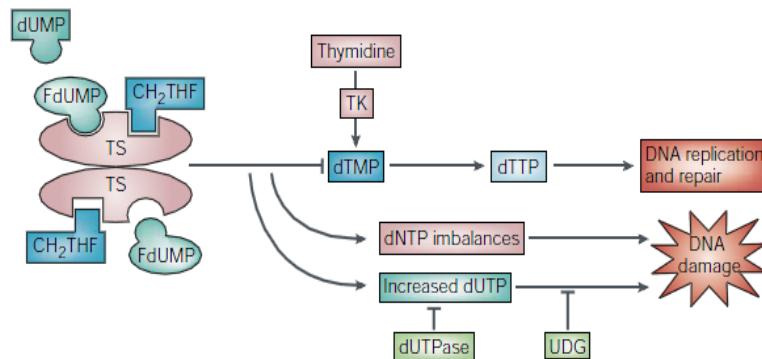
2.2.2.1.4 5- fluorouracil

5-fluorouracil uvrščamo v skupino antimetabolitov. Le-ti so spojine, ki preprečujejo biosintezo normalnih celičnih metabolitov ali se vgradijo v makromolekule, kot sta DNA in RNA in inhibirajo njihove normalne procese, zato lahko upočasnijo celično rast ali delitev (Longley in sod., 2003). Po mehanizmu delovanja so pogosto encimski inhibitorji, ali pa ustavijo verižno biokemično reakcijo na določeni stopnji. V terapiji rakavih obolenj se uporabljajo analogi folne kisline, purinskih in pirimidinskih baz (Obreza, 2009). Analogi pirimidinskih baz inhibirajo določene encime in ovirajo biosintezo nukleotidov, po drugi strani pa se kot lažni nukleotidi vgradijo v nukleinske kisline in motijo njihovo biosintezo in funkcijo. Zamenjava vodika s fluorom oziroma metilne skupine z bromom ali jodom bistveno ne vpliva na velikost molekule, spremeni pa reaktivnost spojine in posledično njeno vlogo v organizmu (Obreza, 2009).

5-FU je analog uracila, pri katerem je vodikov atom na mestu C-5 zamenjan z fluorom. V celico vstopa zelo hitro in uporablja iste transportne mehanizme kot uracil. 5-FU se v celici pretvori v številne aktivne antimetabolite, kot so fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP angl. fluorodeoxyuridine monophosphate), fluorodeoksiridin trifosfat (FdUTP angl. fluorodeoxyuridine triphosphate) in fluorouridin trifosfat (FUTP angl. fluorouridine

triphosphate). Lažni metaboliti z vgradnjem v DNA in RNA inhibirajo sintezo le-teh kot tudi delovanje encima timidilat sintetaze (Longley in sod., 2003). Vez C-F je stabilna, zato ne pride do pretvorbe v timidin in regeneracije timidilat sintetaze. Popravljalni mehanizmi zaznajo napako in jo poskušajo odpraviti, vendar pride do cepitve verige DNA (Obreza, 2009) (Slika 4). 80 % 5-FU se katabolizira v jetrih, kjer je tudi največ encima dihidropirimidin dehidrogenaze (DPD angl. dihydropyrimidine dehydrogenase), ki 5-FU pretvori v neaktivni metabolit dihidrofluorouracil (DHFU angl. dihydrofluorouracil) (Longley in sod., 2003).

5-FU se uporablja za zdravljenje raka debelega črevesa in trebušne slinavke, učinkovit pa je tudi pri raku dojke, jeter in nekaterih tumorjev v področju glave (Obreza, 2009). Pogosto se uporablja v kombinaciji s leukovorinom in irinotekanom, predvsem za zdravljenje raka debelega črevesja (Ishihara in sod., 2010). Ugotovili so, da uporaba 5-FU zaviranje delovanja kostnega mozga, povzroča mukolitis, dermatitis, drisko in ima škodljiv vpliv na srce (kardiotoksičnost) (Han in sod., 2008).



Slika 4: Način delovanja citostatika 5-FU: timidilat sintetaza (TS) s pomočjo 5,10 – metilen tetrahidrofolata (CH_2THF) katalizira pretvorbo deoksiuridin monofosfata (dUMP) v deoksimidin monofosfat (dTMP). V primeru prisotnosti 5-FU, pa aktivni metabolit 5-FU, fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) se skupaj z CH_2THF veže na TS kompleks in s tem preprečita vezavo dUMP in inhibira sintezo dTMP. Posledica tega je porast deoksinukleotida (dTNP) in deoksiuridina trifosfata (dTUTP), ki povzročata poškodbe DNA. Koliko bo dUTP poškodoval molekulo DNA je odvisno od količine pirofosfataze (dUTPase) in uracil-DNA glukozilaze (UDG). V nasprotnem primeru, pa lahko timidin, s pomočjo tirozin kinaze (TK) prepreči inhibicijo sinteze dTMP kar vodi v nadaljnjo podvojevanje DNA (Longley in sod., 2003: 3)

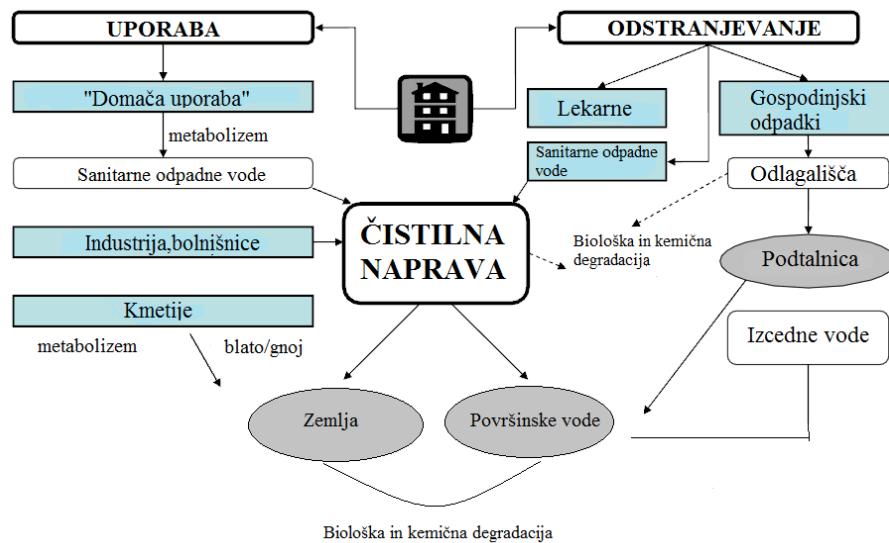
2.3 VIRI IN USODA CITOSTATIKOV V OKOLJU

V razvitem svetu število različnih bolezni narašča in s tem tudi potreba po farmacevtskih izdelkih. Posledično z naraščanjem uporabe se povečuje tudi količina njihovih ostankov in metabolitov v okolju (Nikolaou in sod., 2007). Kljub dejству, da so v okolju prisotni, so posledice ostankov začeli raziskovati in objavljati šele leta 1990, najprej v severni Ameriki in nato v Evropi, kajti pred tem z obstoječimi analitskimi metodami ni bilo mogoče zaznati tako nizkih koncentracij farmacevtskih ostankov v okolju. Veliko pozornost so namenili zdravilom za zdravljenje raka, kajti dokazano je, da se v okolju v večini primerov nahajajo v nizkih koncentracijah ter, da so pri teh koncentracijah citotoksični, genotoksični, mutageni in teratogeni (Kosjek in Heath, 2011).

2.3.1 Vir citostatikov v okolju

Glavni vir pojavljanja citostatikov v okolju so predvsem zdravstvene ustanove. Citostatiki zaidejo v okolje predvsem preko bolnišničnih odpadnih voda, kajti nekateri zapustijo čistilne naprave nespremenjeni (Kosjek in Heath, 2011). Prav tako se citostatiki v našem organizmu metabolizirajo in se z urinom in blatom izločijo v neaktivni obliki, s tem, da 10 % se jih ne metabolizira, izločijo se nespremenjeni, v aktivni obliki (Zounková in sod., 2010) (Slika 5).

Poleg citostatikov se v okolju pojavljajo tudi njihovi metaboliti, ki so lahko prav tako nevarni. Koncentracija v odpadnih vodah je odvisna od velikosti zdravstvenih ustanov, ter od števila zdravljenjih onkoloških pacientov (Kosjek in Heath, 2011), vendar ocenjujejo, da je povprečna koncentracija posameznih citostatikov v odpadnih vodah bolnišnic 5 – 50 µg/l (Kümmeler, 2001). V večini držav so bili citostatiki v okolju odkriti v nizkih koncentracijah, tako v čistilnih napravah, odpadnih vodah, površinskih vodah, morskih vodah, kot tudi v podtalnici (Nikolaou in sod., 2007).



Slika 5: Viri ter odstranjevanje farmacevtskih izdelkov v okolju. Glavni vir njihovih ostankov v okolju so industrijske in bolnišnične odpadne vode, vendar ti v okolje zaidejo tudi s človeškimi izločki (urin in blato) ter kmetijskimi odpadnimi vodami. Neustrezno odstranjevanje ostankov farmacevtskih izdelkov prav tako vpliva na njihovo pojavnost v okolju. Vsi ti ostanki zaidejo z odpadnimi vodami do čistilnih naprav, vendar na žalost čistilne naprave niso sposobne popolnoma odstraniti njihovih ostankov in metabolitov, zato le-ti zaidejo v zemljo, podtalnico in posledično tudi v površinske vode (Nikolaou in sod., 2007: 3)

2.3.2 Usoda citostatikov v okolju

Usoda citostatikov ter njihovih metabolitov v okolju je odvisna predvsem od kemijske zgradbe in njihove koncentracije (Kosjek in Heath, 2011). Zaradi različne kemijske sestave nekateri citostatiki, kot so ET, CP, ifosfamid, kapecitabin, se v okolju ohranajo nespremenjeni (Kosjek in Heath, 2011) medtem, ko se citostatiki kot so 5-FU, citarabin in gemcitabin delno razgradijo (Zounková in sod., 2010). Kosjek in Heath (2011) navajata, da 5-FU kot molekula ne vsebuje sladkorja in je bolje razgradljiva v primerjavi s citarabinom, ki vsebuje arabinozo in gemcitabinom, pri katerem je arabinosa fluorirana, vendar kljub temu, so v okolju bolje razgradljivi od drugih citostatikov.

2.3.2.1 Disociacija

pKa je ravnotežna konstanta, ki opisuje sposobnost disociacije spojine pri določeni pH vrednosti. Disociacija je razpad oziroma razgradnja citostatikov v okolju, ki je odvisna od pH. Poveča mobilnost citostatikov v vodi in vpliva na stanje le-teh v okolju. Nekateri citostatiki, kot so klorambucil, melfalan in metotreksat (Zounková in sod., 2010) imajo dobro afiniteto za disociacijo, med tem ko drugi, kot so karmustin, ciklofosfamid, citarabin, gemcitabin, 5-FU, kapecitabin, vinblastin, vinkristine, ET, doksorubicin, epirubicin, daunorubicin, ifosfamid in CP v okolju ne disocirajo (Kosjek in Heath, 2011).

2.3.2.2 Sorpcija

Mehanizem in obseg sorpcije je odvisen od spojine in njene kemijske strukture. Za določitev stopnje sorpcije in sposobnosti prehajanja citostatikov v organsko snov, se uporablja koeficient D_{ow} (vodni porazdelitveni koeficient), ki določa stopnjo sposobnosti porazdelitve organskih molekul med maščobe in lipide, ter sorpcijo citostatikov v tla, sedimente in mulj. Polarni citostatiki, kot so 5-FU, ciklofosfamid, ifosfamid ter kapecitabin se v vodi ne razgradijo, tako, da je tudi njihova sorpcija v aktivno blato čistilnih naprav zanemarljiva, zato čistilne naprave zapustijo nespremenjeni. Aromatski amini (melfalan in klorambucil) se zaradi reaktivnosti aromatske aminoskupine zelo dobro vežejo s humusom in organskimi snovmi v tleh. Vinka alkaloidi (vinblastin, vinkristin), antraciklini (epirubicin, daunorubicin) ter njihovi analogni mitoksantoni imajo za razliko od drugih citostatikov zelo dobro sorpcijo v plastiko, jeklo in steklo (Kosjek in Heath, 2011).

2.3.2.3 Biorazgradljivost

Na biorazgradljivost citostatikov v okolju vpliva predvsem kemijska struktura, njihova aktivnost ter prisotnost drugih citostatikov (Kümmerer, 2001). Njihova razgradnja je lahko tudi zaskrbljujoča, saj so novo nastali produkti lahko bolj toksični od predhodnih metabolitov (Nikolaou in sod., 2007). Biorazgradnja citostatikov v vodi in aktivnem blatu čistilnih naprav je različna. Ciklofosfamid in ifosfamid nista razgradljiva v vodi, niti v aktivnem blatu, kar je dokazal tudi Buerge s sod. (2006). Antraciklini (doksorubicin, epirubicin, daunorubicin) v aktivnem blatu prav tako niso biorazgradljivi. Za citostatike 5-FU, citarabin, gemcitabin, metatreksat in kapecitabin je značilno, da imajo v vodi nizko

biorazgradljivost, s tem, da na njihovo razgradnjo vpliva predvsem njihova koncentracija v okolju. Kosjek in Heath (2011) omenjata poskus, kjer so citarabin inokulirali v aktivno blato za 10 dni in uspešnost njegove razgradnje je bila 70 %. Biorazgradljivost ostalih citostatikov, ter njihova sorpcija v aktivno blato, so prikazani v Preglednici 2 (Kosjek in Heath, 2011).

Preglednica 2: Citostatiki, njihova biorazgradljivost in sorpcija v aktivno blato (Kosjek in Heath, 2011: 8)

Citostatik	Biorazgradljivost	Sorpcija v aktivno blato
Ciklofosfamid	NE	NE
Ifosfamid	NE	NE
Citarabin	Delno razgradljivi	/b
Gemcitabin	Delno razgradljivi	/b
5-FU	Delno razgradljivi	NE
Kapecitabin	Delno razgradljivi	NE
Metotreksat	Delno razgradljivi	/b
Vinblastin	NE	DA
Vinkristin	NE	DA
ET	/a	/b
Doksorubicin	NE	DA
Epirubicin	NE	DA
Daunorubicin	NE	DA
Mitoksanton	NE	DA
CP	NE	/b

^aET ni podatka o biorazgradljivosti

^bNi podatka o sorpciji v aktivno blato

2.3.2.4 Obstojnost proti fotolizi

Citostatiki se v okolju lahko razgradijo tudi s pomočjo svetlobe – s fotolizo. Fotoliza je lahko direktna ali indirektna. Znanstveniki predvidevajo, da se z direktno fotolizo razgradijo citostatiki metotreksat, vinblastin in ET, vendar to področje še ni dovolj raziskano in objavljeno. Indirektno fotolizo določa stopnja hidroksilnih radikalov. Citostatiki, ki imajo visoko stopnjo hidroksilnih radikalov, imajo večji potencial za oksidacijo. Takšni so vinblastin, ciklofosfamid, ifosfamid, 5-FU in ET. Straub (2009) je dokazal, da 5-FU absorbira svetlobo pri 266 nm ter, da se lahko razgradi z direktno

fotolizo tako, da je raztopino s citostatikom izpostavimo živosrebrni žarnici, pri tej valovni dolžini. Ciklofosfamid je občutljiv na svetlobo, vlago, temperaturo in oksidacijo. Pri 30 °C poteče hidroliza le-tega s cepitvijo klora. Pomembno je tudi v katerih vodnih telesih s nahaja citostatik, saj na primer v jezerih ni dovolj svetlobe, zato je razgradnja ciklofosfamida slabša, kot pa v drugih površinskih vodah.

Razgradnja citostatikov s fotolizo je zelo slabo raziskana. Znanstveniki predvidevajo, da se citostatiki lahko razgradijo s pomočjo svetlobe, vendar sam potek reakcij še ni znan. V prihodnosti bo verjetno več pozornosti namenjeno raziskavam na tem področju, kajti to bi lahko bili novi načini razgradnje in odstranjevanja ostankov citostatikov ter njihovih metabolitov iz odpadnih voda (Kosjek in Heath, 2011).

2.4 TOKSIČNOST CITOSTATIKOV

Citostatiki, ki so sproščeni v okolje delujejo škodljivo na vse žive organizme. Obstajajo dokazi, da negativno vplivajo na reproduktivni sistem ljudi, predvsem na moško plodnost, vplivajo pa tudi na pojavnost raka dojke in mod kot tudi na pojav genetskih napak otrok (Nikolaou in sod., 2007). Prav tako škodljivo vplivajo na reproduktivni sistem, rast in razvoj vodnih organizmov (Zounková in sod., 2010).

2.4.1 Citostatiki v delovnem okolju

O izpostavljenosti citostatikom na delovnem mestu ter njihovi mutagenosti je prvi poročal Falck s sod. leta 1979 in od takrat se redno izvaja biomonitoring medicinskega osebja. V stik s citostatiki medicinsko osebje prihaja vsakodnevno na različne načine: preko vdihavanja in kontakta preko kože, med čiščenjem prostorov in predmetov, ki so bili v stiku z zdravljenimi pacienti ter s poškodbami pri delu (vbodi z iglo). Najpogosteje prihajajo v stik s citostatiki med pripravo terapije, predvsem kombinirane terapije, kjer so istočasno izpostavljeni različnim vrstam citostatikov, ki imajo različne mehanizme delovanja ter različno stopnjo genotoksičnosti. Na stopnjo genotoksičnosti ne vpliva samo čas izpostavljenosti (delovna doba) tem več tudi starost, spol, razvade (kajenje) itn. (Kopjar in sod., 2010).

Z raziskavami so dokazali, da dolgotrajna izpostavljenost nizkim koncentracijam citostatikov vodi v nastanek mutacij v različnih celicah in tkivih, kot so celice prebavnega trakta, kostnega mozga, spolne celice, folikli dlak in kožne celice (Kopjar in sod., 2010).

Mednarodna agencija za raziskovanje raka (IARC angl. International Agency for Research on Cancer) je rakotvorni potencial citostatikov razvrstila v skupine, in sicer busulfan, ciklofosfamid, ET, klorambucil, melfalan, metil-CCNU, tiotepa in treosulfan, spadajo v skupino 1, ki je rakotvorna za človeka. Skupina 2A je verjetno rakotvorna. V to skupino spadata CP in IM. Skupina 2B je mogoče rakotvorna. Sedem vrst citostatikov ni dovolj raziskanih, zato jih ne morejo klasificirati in spadajo v skupino 3. Sem sodijo 5-FU, aktinomicin D, ifosfamid, 6-merkaptopurin, metotreksat, vinbkastin in vinkristin (IARC, 2013). Zelo zaskrbljujoče je dejstvo, da IARC dvajset vrst citostatikov ni razvrstila v skupine in to predstavlja velik problem, saj je medicinsko osebje vsak dan izpostavljen tem zdravilom (Kopjar in sod., 2010).

2.4.1.1 Biomonitoring

Biomonitoring medicinskega osebja se izvaja od leta 1980. Vsak biološki nadzor mora biti specifičen in mora dokazati odvisnost med dozo in učinkom. Vsaka zdravstvena ustanova mora biti seznanjena katerim citostatikom je medicinsko osebje izpostavljen ter izbrati primerno metodo za dokazovanje genotoksičnosti. Za ugotavljanje poškodb DNA se v tem primeru uporabljajo analiza izmenjav sestrskih kromatid, analiza kromosomskih aberacij, test mikrojeder in kometni test (Kopjar in sod., 2010)

2.4.2 Citostatiki v vodnem okolju

Znano je, da citostatiki ter njihovi metaboliti zaidejo v okolje z odpadnimi vodami ter z človeškimi in živalskimi iztrebki, kjer so jim v različnih koncentracijah izpostavljeni predvsem vodni organizmi, zato so ekotoksičnost in genotoksičnost različnih citostatikov ugotavljali v večih raziskavah. Zounková in sod. (2007, 2010) so delovanje ciklofosfamida, 5-FU, CP, ET, doksorubicina, citarabina in gemcitabina ugotavljali na različnih modelnih organizmih: *Pseudomonas putida*, *Daphnia magna*, *Desmodesmus*

subspicatus in *Pimephales promelas*. Ugotovili so, da je za *Pseudomonas putida*, *Daphnia magna* in *Desmodesmus subspicatus* najbolj toksičen citostatik 5-FU, medtem ko sta citarabin in CP bila toksična samo za *Daphnia magna*, ciklofosfamid za *Desmodesmus subspicatus*, doksorubicin pa za *Pseudomonas putida*. Izbrani citostatiki so pri celicah inhibirali DNA polimerazo, zaustavili proliferacijo, sprožili apoptozo celic ter s tem vplivali na rast in razvoj organizmov (Zounková in sod., 2007; Zounková in sod., 2010). Kosjek in Heath (2011) sta za razliko od Zounkove testirali razgradnjo 5-FU v aktivnem blatu čistilnih naprav, v koncentracijah 9 – 854 mg/l in dokazali, da so bile najvišje koncentracije toksične za mikroorganizme.

2.5 NADZOR UPORABE CITOSTATIKOV

Leta 1995 je bila ustanovljena Evropska medicinska agencija (angl. EMA European Medicines Agency), ki skrbi za nadzor uporabe farmacevtskih izdelkov ter proučuje vpliv njihovih ostankov v okolju. Ocenjujejo, da ostanki zdravil v okolju že pri koncentraciji 10 ng/l predstavljajo tveganje za zdravje ljudi in živali (Johnson in sod., 2007).

V EU je testiranje ekotoksičnosti farmacevtskih izdelkov bilo določeno z Direktivo 92/18 EEC, ki je bila namenjena predvsem zdravilom, ki so namenjena veterini. Direktivo so leta 2001 dopolnili (2001/83/EC) z zahtevo, da z objavo novega farmacevtskega izdelka, morajo priložiti poročilo o njegovem tveganju za okolje, s tem, da je Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (FDA angl. Food and Drug Administration) direktivo nadgradil z zahtevo, da z objavo novega farmacevtskega izdelka, morajo poleg poročila o njegovem tveganju za okolje napisati tudi, ali pričakujejo, da bo koncentracija teh izdelkov v vodnem okolju $\geq 1 \mu\text{g/l}$ (Nikolaou in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

V magistrski nalogi smo uporabili kemikalije, ki so navedene v Preglednici 3, medtem ko so v Preglednici 4 navedeni podatki o citostatikih, ki so bili uporabljeni v nalogi.

Preglednica 3: Uporabljene kemikalije v magistrski nalogi

Kemikalija	Proizvajalec	Kataloška št.
Agar	Bacto Agar	214060
Akridin oranž	Sigma, ZDA	A-6014
Primarna monoklonska IgG ₁ protitelesa, Anti-	Millipore, CA	16-202A
Benzo(a)piren	Sigma, ZDA	B-1760
CP	Sigma - Aldrich, Nemčija	479306
Citohalazin B	Sigma, ZDA	C-6762
DMEM HG	Gibco, VB	52100-039
DMSO	Sigma, ZDA	41644-1L
EDTA	Sigma, ZDA	E5134-500G
EGF	Invitrogen, VB	PHG0314
Etanol	Sigma, ZDA	2221
Eter	Sigma - Aldrich, Nemčija	30-995-8
ET	Santa Cruz, ZDA	SC-3512A
FBS – za celice ZFL	ATCC, ZDA	30-2020
FBS	Euro Clone, Italija	EC S0180L
Formaldehid	Sigma, ZDA	533998-500ML
Glukoza	Fluka, Nemčija	49150
Glukoza-6-fosfat	Sigma, ZDA	G-7879
Glukoza monohidrat	Sigma, ZDA	G7528
Ham's F12	Gibco, VB	21700-026
HEPES	Gibco, VB	15630-056
IM	Santa Cruz, Italija	SC-202180
Inzulin	Sigma, ZDA	I9278

Nadaljevanje Preglednice 3. Uporabljene kemikalije v magistrski nalogi

Kemikalija	Proizvajalec	Kataloška št.
KCl	Fluka, Nemčija	60130
Leibowitz L-15	PAA, Avstrija	E 15-020
L-glutamin	PAA, Avstrija	M11-006
Metanol	Sigma, ZDA	M1775-1GA
MgSO₄·7H₂O	Fluka, Nemčija	63140
NaCl	Merck, Nemčija	06404
NaHCO₃	Sigma, Nemčija	13433
Na₂HPO₄	Fluka, Nemčija	71640
NaH₂PO₄·H₂O	Merck, Nemčija	1.06346.0500
Nutrient Broth N°2 Oxoid	Oxoid, VB	CM0067
Ocetna kislina	Merck, Nemčija	607:002-00-6
PBS	PAA, Avstrija	H15-011
Raztopina penicilina in streptomicina (pen/strep)	PAA, Avstrija	P11-010
Tripansko modrilo	Sigma, ZDA	T-8154
0.25 % trypsin EDTA	Gibco, VB	25200-056
Trypsin	Sigma, ZDA	T-4174
Williamsov medij	Sigma, ZDA	W-1878
5-fluorouracil	Sigma, ZDA	F6627

Citostatiki

Preglednica 4: Uporabljeni citostatiki v magistrski nalogi

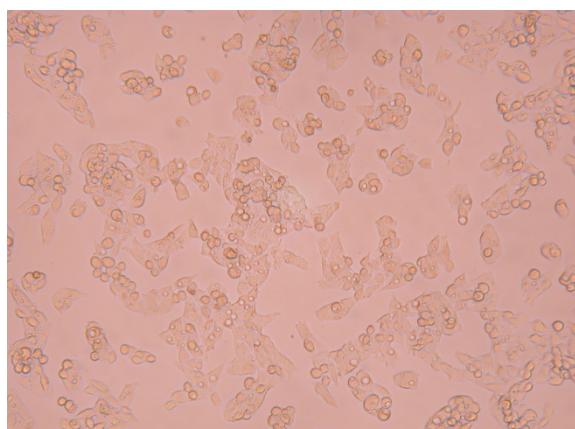
Citostatik	Založna raztopina	Topilo
CP	1 mg/ml	dH ₂ O
ET	25 mg/ml	DMSO
IM	50 mg/ml	dH ₂ O
5-FU	75 mg/ml	DMSO

3.1.2 Model človeških jetrnih celic - celična kultura HepG2

Kulture jetrnih celic se veliko uporabljajo pri proučevanju metabolizma ksenobiotikov v biomedicinskih raziskavah in testih genotoksičnosti, saj jetrne celice izločajo in proizvajajo številne encime, ki igrajo ključno vlogo pri čiščenju telesa in biotransformaciji ksenobiotikov v manj nevarne snovi. Zato smo v magistrski nalogi potencialno genotoksično delovanje izbranih citostatikov raziskali na modelu celične linije človeškega

hepatoma HepG2 (Slika 6). Celična kultura HepG2 je kultura človeških jetrnih celic, ki je bila prvič izolirana leta 1972 iz primarnega hepatoma 11-letnega dečka iz Argentine (Aden in sod., 1972). V uporabi je več različnih klonov te celične linije, ki se med seboj razlikujejo tako morfološko kot tudi glede aktivnosti presnovnih encimov. Celice HepG2 imajo aneuploiden kariotip (od 48 do 54 kromosomov), najpogosteje imajo 52 kromosomov. Delitveni čas celic je 20 do 28 ur (Natarajan in Darroudi, 1991). Te celice so eden izmed zelo pogosto uporabljenih *in vitro* celičnih modelov (Wilkening in sod., 2003), ki se je izkazal za odlično orodje pri proučevanju genotoksičnosti okoljskih in prehranskih kemikalij (Knausmüller in sod. 2004). Primernost njihove uporabe temelji predvsem na ohranjenosti mnogih metabolnih funkcij, ki pa se pri gojenju primarnih kultur hepatocitov izgubijo. Imajo aktivne metabolne encime I faze (citokrom P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B, CYP2E1) in II faze (glutation-S-trasferaza, sulfotransferaza, N-acetiltransferaza, uridin glukoronosiltransferaza), ki imajo pomembno vlogo pri aktivaciji in detoksifikaciji mutagenih snovi, ki delujejo na celično DNA (Knausmüller in sod., 2004).

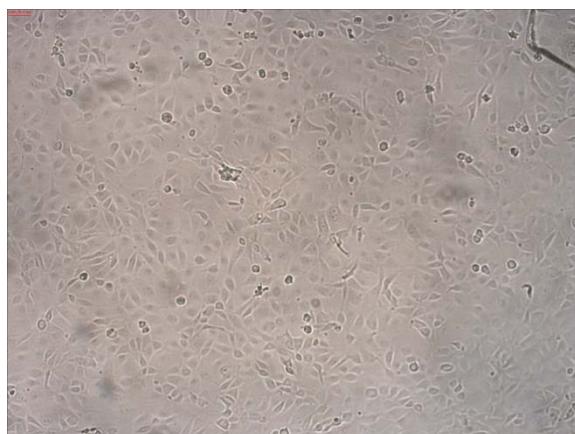
Celično linijo HepG2, ki smo uporabili pri našem delu, je poklonil dr. Firouz Darroudi (Oddelek za kemijsko mutagenezo; Univerza v Leidnu, Nizozemska) in jo hrani Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka, Večna pot 111, Ljubljana.



Slika 6: Celice HepG2. Foto: Alja Štraser

3.1.3 Model ribjih jetrnih celic – celična kultura ZFL

Pri našem delu smo uporabili model komercialne celične linije ATCC (ATCC angl. American Type Culture Collection, Manassas, ZDA) (Slika 7). Leta 1992 so iz jeter desetih odraslih cebric izolirali jetrne celice ZFL. Kulture celic ZFL se predvsem uporablajo pri proučevanju metabolizma ksenobiotikov ter *in vitro* testih za ugotavljanje onesnaženosti okolja. Celice sintetizirajo številne encime, kot so alanin in aspartat aminotransferaze, glukozo-6-fosfataze in alkalne fosfataze. Prav tako sintetizirajo številne proteine, med njimi tudi 54kDa in 50kDa velika proteina, ki nadzirata prisotnost dioksina 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksina v organizmu (TCDD) (Ghosh in sod., 1994).



Slika 7 : Celice ZFL. Foto: Matjaž Novak

3.1.4 Shranjevanje in štetje celic

Celični liniji HepG2 in ZFL smo imeli shranjeni v tekočem dušiku. Celice HepG2 smo uporabljali do največ 15. pasaže po odmrznitvi, celice ZFL pa do največ 35. pasaže po odmrznitvi, saj se s časom gojenja in pri višjih pasažah spremenijo morfogenetske lastnosti celic, encimske aktivnosti pa se zmanjšajo.

Za hitro preverjanje živosti in številčnosti celic smo jih šteli z hemocitometrom (Blau Brand, Nemčija). Predhodno smo jih pobarvali z tripan modrim v razmerju 1:5 (10 µl celične suspenzije s 40 µl barvila). Tripan modro je vitalno barvilo, ki prodre samo v mrtve celice, ki jih obarva modro, žive celice pa »svetijo«.

Število celic v suspenziji izračunamo po enačbi 1:

$$\underline{(A+B+C+D) \times R \times K_p \times V_{suspenzije}}$$

4

... (1)

A, B, C, D – število celic v posameznih kvadratkih; R – faktor redčenja;

$K_p = 10^4$ (faktor za izračun števila celic v 1 ml celične suspenzije)

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje celic HepG2

Celice HepG2 smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) v gojišču, ki je vsebovalo Williamsovo gojišče E, obogateno z 15 % serumom govejega zarodka (FBS angl. fetal bovine serumom), z dodatkom 1 % antibiotika penicilina/streptomicina (pen/str) in 1 % L- Glutamina (L-Gln), v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂ atmosferi.

Celice smo dvakrat tedensko presajali ob 80 % preraščenosti plošče, s podlage smo jih odlepljali z 0.1 % tripsinom. Priprava tripisina je prikazana v prilogi A. Pripravljeni tripsin smo sterilizirali s filtriranjem skozi filter s porami velikosti 0.22 µm (Corning Costar Corporation, ZDA).

Pri presajanju smo iz plstenke odstranili gojišče, celice sprali z 1x fosfatnim pufrom (PBS angl. phosphate buffer saline) in dodali tripsin, ki je bil ogret na 37°C ter inkubirali 5 minut v inkubatorju. Po inkubaciji smo celice rahlo pretresli, da so se odlepile od podlage, na kar smo dodali sveže gojišče. Serum v gojišču zavre delovanje tripsina in tako prepreči morebitne dodatne poškodbe DNA, ki bi nastale zaradi predolge izpostavljenosti tripsinu. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Supernatant smo po centrifugiranju zavrgli, pelet pa smo resuspendirali v svežem gojišču – najprej s pipeto, nato pa 8x nežno s sterilno brizgo (BD Plastipak, Španija) in iglo (0.9x40 mm, BD Plastipak, Španija) in jih prenesli v novo centrifugirko. Dobili smo suspenzijo posameznih celic, ki rastejo v eni plasti. Nato smo jih nasadili v novo plstenko.

3.2.2 Gojenje celic ZFL

Celično kulturo ZFL smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur v gojišču sestavljenem iz gojišča Leibowitz L-15 (50 %), Eaglovega gojišča po Dulbeccu (DME angl. Dulbecco's modified eagles medium) (35 %) in gojišča Ham's F12 (15 %), obogatenim z 0.01 mg/ml inzulinom, 50 ng/ml epidermalnega rastnega faktorja (EGF angl. epidermal growth factor) in 5 % FBS, z dodatkom 15 mM HEPES-om, 0.15 g/l NaHCO₃, in 0.1 % Pen/Strep pri temperaturi 28 °C.

Celice smo dvakrat tedensko presajali ob 90 % preraščenosti plošče, s podlage smo jih odlepljali z 0.25 % tripsinom EDTA. Sterilno smo odstranili gojišče in celice sprali z 1 x PBS. Dodali smo tripsin, ki je bil ogret na 37 °C C ter inkubirali 5 minut v inkubatorju. Nežno smo premešali, da so se celice odlepile. Delovanje tripsina smo ustavili z dodajanjem svežega gojišča ter suspenzijo prenesli v centrifugirko. Centrifugirali smo 5 minut pri 1200 obratih/minut. Pelet smo resuspendirali v svežem gojišču in celice nasadili v novo plastenko.

3.2.3 Ugotavljanje mutagenega delovanja izbranih citostatikov na bakterije *Salmonella typhimurium* z Amesovim testom

3.2.3.1 Princip Amesovega testa

Amesov test (ali *Salmonella* mikrosomalni test povratnih mutacij) sta razvila B. Ames in D. M. Maron leta 1970. Gre za kratkotrajni bakterijski test povratnih mutacij, ki je namenjen zaznavanju širokega spektra spojin, katere povzročajo poškodbe, kar nato vodi v nastanek genskih mutacij (Maron in Ames, 1983).

Pri Amesovem testu uporabljamo različne seve bakterije *Salmonella typhimurium*, ki zaradi mutacij v različnih genih na histidinskem operonu ne morejo sintetizirati aminokisline histidin. Kadar testne seve *S. typhimurium* gojimo na minimalnem glukoznem gojišču, ki vsebuje histidin v sledovih, lahko kolonije tvorijo le tiste bakterije, pri katerih pride do povratnih mutacij in se vzpostavi pravilno bralno zaporedje za sintezo histidina. Takšne kolonije imenujemo His⁺ revertante. Število spontanih revertant na ploščo je relativno konstantno, v prisotnosti mutagenov pa se število povratnih mutacij poveča. Bolj

je neka snov mutagena, več mutacij nastane, kar posledično zaznamo s povečanim številom kolonij na ploščah (Mortelmans in Zieger, 2000).

Prednosti Amesovega testa so predvsem v zanesljivosti rezultatov, hitrosti, cenovni ugodnosti in obsežni bazi podatkov (Claxton in sod., 2001).

3.2.3.2 Sevi bakterije *Salmonella typhimurium*

V Amesovem testu smo uporabili seva bakterije *S. typhimurium* TA98 in TA100, ki sta pridobljena iz bakterije *S. enterica* subsp. I serovar Typhimurium (*S. typhimurium* LT2). Ta je po Gramu negativna, aerobno/fakultativno anaerobna, mobilna, nesporulirajoča enterobakterija.

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

Sev TA100 ima za specifično tarčno sekvenco marker *hisG46*, ki se uporablja za ugotavljanje mutacij, kjer pride do zamenjave baznih parov, primarno na GC baznih parih. Pride do zamenjave leucina (GAG/CTC) s prolinom (GGG/CCC) (Maron in Ames, 1984).

3.2.3.3 Potek poskusa

Izhodišni bakterijski kulturi *S. typhimurium* sev TA98 in TA 100, ki ju shranjujemo na -80 °C, smo na hitro odmrznili in prenesli (50 µl v 10 ml hraničnega bujona z ampicilinom, končne koncentracije 25 µg/ml) v hranični bujon. Čez noč smo jih inkubirali v tekočem gojišču, na 37 °C, da so se namnožile. Naslednji dan, 2 uri pred začetkom testa, smo bakterijsko kulturo stresali na stresniku (približno 600 obratov/minuto), da so bakterije prešle v eksponencialno fazo rasti.

3.2.3.4 Priprava raztopin in gojišč

Plošče minimalnega glukoznega gojišča

V steklenico za avtoklaviranje smo dodali destilirano vodo in agar ter ob segrevanju (≈ 50 °C) mešali na magnetnem mešalu, dokler se agar ni raztoplil. Raztopljen agar smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Po končanem avtoklaviranju, ko so se raztopine nekoliko ohladile, smo dodali sterilno raztopino 50x VB soli in 40 % glukozo, ki smo ju avtoklavirali ločeno. Raztopino smo premešali in v vsako petrijevko razlili 30 ml gojišča. Počakali smo, da se je agar strdil in nato plošče v obrnjenem položaju shranili na hladnem. Sestavine za pripravo minimalnega glukoznega gojišča so prikazane v Prilogi B1.

Vogel – Bonner medij (VB medij)

V steklenico za avtoklaviranje smo najprej dodali destilirano vodo in ob mešanju na magnetnem mešalu dodajali zatehtane soli v navedenem vrstnem redu. Pri tem smo vedno počakali, da se je predhodna sol popolnoma raztopila in šele nato dodali naslednjo. Raztopino smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in jo nato shranili na hladnem. Sestavine za pripravo VB medija so prikazane v Prilogi B2.

40 % glukoza

Glukozo smo ob segrevanju (≈ 50 °C) in mešanju na magnetnem mešalu raztoplili v destilirani vodi. Raztopino smo nato avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in jo do uporabe shranili na hladnem. Sestavine za pripravo 40 % glukoze so prikazane v Prilogi B3.

Top agar

Agar in NaCl smo ob segrevanju (≈ 50 °C) in mešanju na magnetnem mešalu raztoplili v destilirani vodi ter nato raztopino avtoklavirali 20 minut pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo jo shranili na hladnem. Pred uporabo smo dodali histidin/biotin (5 mM) v sledovih, da je bila končna koncentracija 0.05 mM. Sestavine za pripravo top agarja so prikazane v prilogi B4.

Raztopina histidin/biotina

Destilirani vodi smo dodali biotin in ga ob segrevanju ($\approx 50^{\circ}\text{C}$) raztapliali toliko časa, da smo dobili bistro raztopino. Nato smo dodali in raztopili tudi histidin. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo čez membranski filter s porami $0.22\ \mu\text{m}$ (Corning Costar Corporation, New York, ZDA) in jo shranili na hladnem (4°C). Sestavine za pripravo raztopine histidin/biotin so prikazane v Prilogi B5.

Hranilno gojišče

Hranilni agar smo ob segrevanju in mešanju ($\approx 50^{\circ}\text{C}$) na magnetnem mešalu raztopili v destilirani vodi in nato raztopino avtoklavirali 20 minut pri 121°C ter jo do uporabe shranili na hladnem. Sestavine za pripravo hranilnega gojišča so prikazane v Prilogi B6.

Fosfatni pufer

Raztopini $0.2\ \text{M}$ natrijevega dihidrogen fosfata in $0.2\ \text{M}$ dinatrijevega hidrogen fosfata smo zmešali v zgoraj navedenih volumnih in umerili pH na 7.4. V primeru, da je bil pH prenizek, smo dodali $0.2\ \text{M}$ dinatrijev hidrogen fosfat. Pufer smo sterilizirali s filtracijo čez membranski filter s porami $0.22\ \mu\text{m}$ in ga shranili na hladnem (4°C). Sestavine za pripravo fosfatnega pufra so prikazane v Prilogi B7.

3.2.3.5 Priprava vzorcev

Z Amesovim testom smo testirali štiri različne koncentracije citostatikov. Končne koncentracije citostatikov CP, ET in IM so bile 25 , 50 , 100 in $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$, kar ustreza 2.5 , 5 , 10 in $20\ \mu\text{g}/\text{ploščo}$ ter 5-FU 0.5 , 1 , 2 in $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$, kar ustreza 0.05 , 0.1 , 0.2 in $0.4\ \mu\text{g}/\text{ploščo}$.

V poskuse smo vključili kontrole, in sicer dH_2O kot negativno kontrolo, ki nam je služila za določanje števila spontanih revertant, kontrola DMSO kot kontrolo topila, s katero smo ugotavljali, ali topilo vpliva na povišanje števila spontanih revertant ter 4-nitrovinolin-N-oksid (NQNO) kot pozitivno kontrolo (končna koncentracija $2.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$).

3.2.3.6 Izvedba Amesovega testa

Bakterije *S. typhimurium* TA98 in TA100, ki smo jih čez noč gojili pri 37 °C, smo dve uri pred začetkom testa stresali na stresalniku (600 obratov/min) pri 37 °C. Med inkubacijo in stresanjem smo pripravili koncentracije citostatikov ter top agar.

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

Amesov test smo izvedli v njegovi standardni različici, vgradnje v ploščo. Testni sev smo izpostavili citostatikom direktno na plošči minimalnega gojišča. V epruvetke v termobloku (43 °C) smo dodali 2 ml top agarja z raztopljenim his/bio. K top agarju smo dodali 100 µl vzorca in 100 µl bakterijske suspenzije. Pri tem smo bili pozorni, da temperatura v termobloku ni presegla 45 °C in da bakterije niso bile predolgo na visoki temperaturi. Vsebino epruvetke smo premešali na vorteksu in jo zlili na prej pripravljene plošče minimalnega gojišča. Ko se je top agar strdil, smo plošče obrnili in jih inkubirali 2-3 dni na 37 °C.

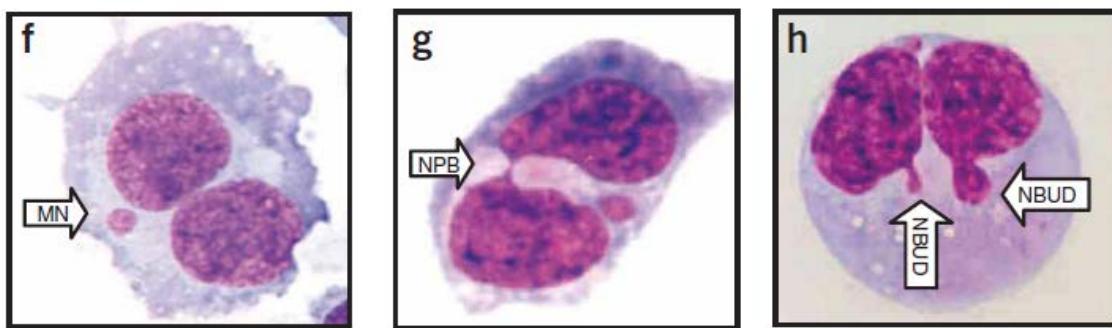
3.2.3.7 Statistična analiza rezultatov

Po končani inkubaciji smo prešteli število spontanih in induciranih revertant. Pod mikroskopom smo preverili ozadje na ploščah, da smo izključili morebitno toksično delovanje vzorcev in mutagenov. Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo Studentovega t- testa ($p < 0.05$). Vsako koncentracijo smo testirali v treh ponovitvah.

3.2.4 Ugotavljanje genotoksičnega delovanja izbranih citostatikov na celice HepG2 in ZFL s testom mikrojeder

3.2.4.1 Princip testa mikrojeder

Test mikrojeder (CBMN angl. the cytokinesis-block micronucleus assay) je metoda za določanje genomske nestabilnosti na nivoju kromosoma/molekule, s katero ugotavljamo ali določeni agensi povzročajo strukturne in številčne poškodbe kromosomov (klastogene in anevgene snovi). S to metodo lahko ugotavljamo prelome, prerazporeditve, izgubo in neločevanje kromosomov, amplifikacijo genov, nekrozo ali apoptozo (French, 2000). S testom CBMN ugotavljamo, ali določen agens povzroča nastanek mikrojeder (MNs angl. micronucleus), nukleoplazmatskih mostičkov (NPBs angl. nucleoplasmatic bridges) ali jedrnih brstov (NBUDs angl. nuclear buds) (Slika 8). Kvantifikacija je omejena na celice, ki so se le enkrat delile. Takšne celice prepoznamo po dvojedrnem izgledu, ki nastane zaradi s citohalazinom b inhibirane citokinez (Fenech, 1993). MNs nastanejo kot fragmenti kromosomov ali celih kromosomov, ki zaostanejo v anafazi celične delitve (Fenech, 1993). NPBs izražajo prerazporeditve kromosomov in nastanejo, ko centromere dicentričnih kromosomov ali kromatid potujejo na nasprotne celične pole v anafazi in nakazujejo preureditve kromosomov. NBUDs nastanejo kot posledica amplifikacije genov. Amplificirana DNA je selektivno locirana na določenih mestih na obrobju jedra in se izloči v obliki jedrnih brstov, ki lahko med S-fazo tvorijo mikrojedra. NBUDs imajo enako morfologijo kot MNs, le da so z jedrom povezani z ozkim ali širokim pecljem nukleoplazmatskega materiala (Fenech in Crott, 2002).



Slika 8: Primeri genomske nestabilnosti na nivoju kromosoma/molekule – (f) dvojedrna celica z MN, (g) dvojedrna celica z NPB, (h) dvojedrna celica z NBUDs (Fenech, 2007: 2)

3.2.4.2 Potek poskusa

Dan pred testom smo celice nasadili na T-25 plasenke za gojenje celic (0.7×10^6 celic HepG2 in 0.5×10^6 celic ZFL).

Naslednji dan smo dodali sveže gojišče z izbranim citostatikom in naprej inkubirali celice (HepG2 24 ur na 37 °C, ZFL pa 72 ur na 28 °C). Pri vsakem poskusu smo naredili negativno kontrolo, kateri smo dodali le sveže gojišče, pozitivno kontrolo (10 µM BaP) in kontrolo topila, da bi izločili morebiten vpliv topila na celice (Preglednici 5 in 6).

Preglednica 5: Tretiranje celic HepG2 s citostatiki CP, ET, IM in 5-FU

Citostatik	Kontrola topila	Koncentracije (µg/ml)
CP	gojišče z 1% dH ₂ O	0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10
ET	gojišče z 0.04% DMSO	0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10
IM	gojišče z 0.02% dH ₂ O	0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10
5-FU	gojišče z 0.013%DMSO	0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10

Preglednica 6: Tretiranje celic ZFL s citostatiki CP, ET, IM in 5-FU

Citostatik	Kontrola topila	Koncentracije (µg/ml)
CP	/ ^b	0.001, 0.01, 0.1 in 1
ET^a	/ ^b	0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 in 100
IM	/ ^b	0.001, 0.01, 0.1, 1 in 5
5-FU	gojišče z 0.013% DMSO	0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10

^aIzbrane citostatike na celicah ZFL smo testirali pri koncentracijah v µg/ml, edino pri ET so bile koncentracije v rangu ng/ml, saj so se višje koncentracije izkazale za toksične.

^bPri tretiranju celic s CP, ET in IM, kontrole topila nismo testirali, saj so bili volumni DMSO in dH₂O zanemarljivi.

Po končanem tretmaju smo gojišče s citostatikom odstranili in celice 2x sprali z 1x PBS. Dodali smo sveže gojišče s citohalazinom b v končni koncentraciji 2 µg/ml in celice HepG2 inkubirali naslednjih 26 ur na 37 °C, celice ZFL pa 48 ur na 28 °C.

Po končani inkubaciji s citohalazinom smo odstranili gojišče in ga spravili v centrifugirko. Celice smo sprali s 3 ml 1x PBS-om in tudi to spravili v centrifugirko. Dodali smo 1.5 ml tripsina. Za 5 minut smo jih postavili v inkubator, po tem času pa preverili ali so res vse odlepljene. Z gojiščem in PBS-om, ki smo ga shranili v centrifugirki, smo sprali plasenkovo

in celice centrifugirali pri 6 °C (HepG2 5 minut pri 800 obratih/minuto, ZFL 5 min pri 1000 obratih/minuto). Po centrifugiranju smo celice sprali s 3 ml 1x PBS in ponovno centrifugirali pri 6 °C (HepG2 5 minut pri 800 obratih/minuto, ZFL 5 min pri 1000 obratih/minuto).

Po centrifugiranju smo odstranili supernatant. Razbili smo pelet in po kapljicah dodali 5 ml hladnega (+4 °C) 75 mM KCl, nežno premešali vsebino in celice centrifugirali (HepG2 5 minut pri 600 obratih/minuto, ZFL 5 min pri 800 obratih/minuto).

Odstranili smo supernatant, razbili smo pelet in potem s kapalko, po kapljicah dodali 5 ml Karnojevega fiksativa (metanol:ocetna kislina 3:1); najprej smo dodali 1 ml Karnojevega fiksativa in spet razbili pelet ter takoj zatem smo dodali 3 kapljice formaldehida, in nato še preostanek Karnojevega fiksativa – 4 ml po kapljicah. Nato smo nežno premešali vsebino in celice centrifugirali (HepG2 5 minut pri 600 obratih/minuto, ZFL pa 5 minut pri 800 obratih/minuto).

Supernatant smo odstranili, razbili pelet in še dvakrat ponovili fiksiranje (metanol:ocetna). Celice smo centrifugirali (HepG2 5 minut pri 600 obratih/minuto, ZFL pa 5 minut pri 800 obratih/minuto).

Po zadnjem fiksiranju smo odstranili supernatant, razbili pelet in suspenzijo celic zredčili do primerne gostote. Na stekelca, ki so bila predhodno namočena v eter, smo nanesli 15 µl celične suspenzije in takoj s steklcem potrkali z robom po mizi, da se je suspenzija razdelila po steklcu in nato preverili gostoto celic pod mikroskopom. Za vsak vzorec smo pripravili vsaj tri preparate. Zakodirane preparate smo prestavili v škatlo in jih do štetja shranili na sobni temperaturi. V tej fazи so preparati obstojni tudi več mesecev.

3.2.4.3 Barvanje in štetje MNs

Preparate smo barvali s 15 µl akridin oranža (raztopljen v dH₂O, koncentracija 10 µg/ml) ter analizirali pod fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescenčno svetlobo (filter B2-A, ekscitacija: 450 – 490 nm, emisija: 520 nm) pri 400x povečavi (objektiv 40x). Med štetjem smo imeli preparate zakodirane.

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

- dvojedrne celice z enim MN,
- dvojedrne celice z dvema in večimi MNs,
- dvojedrne celice z NPBs,
- dvojedrne celice z NBUDs,
- dvojedrne celice z različnimi kombinacijami zgoraj navedenih.

Poleg MNs smo vedno šteli tudi število eno-, dvo-, tro- in več-jedrnih celic in tako določili delitveni indeks celic (NDI angl. nuclear division index), s katerim smo dobili informacijo ali preiskovana snov vpliva na delitveni cikel celic. Za določitev NDI smo prešteli 500 celic. Pri štetju MNs smo upoštevali naslednje kriterije (Fenech, 2000):

- MN smo šteli samo v dvojedrnih celicah,
- MN je moral biti okrogle ali ovalne oblike,
- MN je moral biti od jedra popolnoma odcepljen,
- MN naj ne bi bil oddaljen od glavnih jeder več kot 2 premera glavnega jedra
- MN mora je moral biti manjši kot $\frac{1}{4}$ glavnega jedra.

3.2.4.4 Statistična analiza rezultatov

Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo statističnega programa Graph Pad Prism 5, (Kalifornija, ZDA). Za vsako proučevano skupino smo izračunali povprečje, standardno deviacijo ter p-vrednost. Rezultate izbranih koncentracij in pozitivne kontrole smo primerjali s kontrolo topila z enosmerno analizo variance ANOVA; Dunnett's Multiple Comparison Test ($p < 0.05$). Celoten poskus smo ponovili v treh neodvisnih ponovitvah.

3.2.5 Ugotavljanje genotoksičnega delovanja izbranih citostatikov na celice HepG2 z analizo dvooverižnih prelomov s pretočno citometrijo

3.2.5.1 Princip analize dvooverižnih prelomov s pretočno citometrijo

Dvooverižni prelomi DNA (DSB angl.double-strand breaks) lahko nastanejo naključno med podvajanjem DNA ali kot posledica delovanja ionizirajočega sevanja ali genotoksičnih snovi. Ko pride do nastanka DSBs jih vedno sledi fosforilacija histona H2AX na serinu 139. H2AX je eden od histonov iz družine H2A in je sestavni del histonskega oktamera v nukleosomih. Za njegovo fosforilacijo so odgovorne predvsem kinaze kot sta ATM (angl. ataxia telangiectasia mutated) in ATR (ATM-Rad3-related) iz poti PI3K. Okoli DSBs se takoj po nastanku pojavijo žarišča fosforiliranega H2AX, γ -H2AX (γ H2AX), ki zaradi tega predstavlja občutljiv biomarker za DSBs v celicah. Vloga fosforilirane oblike histona H2AX še ni povsem znana. Znano je, da se po fosforilaciji H2AX, kondenzacija DNA zmanjša, kar verjetno omogoča popravljalnim encimom lažji dostop do mesta poškodbe (Chowdhury in sod., 2005). S pretočno citometrijo lahko z merjenjem fluorescentnih signalov v posameznih celicah analiziramo prisotnost DSBs, posredno preko detekcije žarišč γ -H2AX, katerih število je sorazmerno s številom DSBs v razmerju 1:1. γ -H2AX opazujemo s pomočjo imunofluorescence, posredovane z za γ -H2AX specifičnimi, s flurokromom (FITC) označenimi, primarnimi monoklonskimi mišjimi IgG₁ protitelesi. Analiza γ -H2AX s pretočnim citometrom omogoča oceno poškodb DNA in proteinov, ki so vpleteni v odgovor na poškodbe (Kuo in Yang, 2008).

Genotoksično delovanje izbranih citostatikov z analizo dvooverižnih prelomov s pretočno citometrijo smo preverjali samo na celicah HepG2 in ne na celicah ZFL, ker se na celice ZFL primarna monoklonska IgG₁ protitelesa proti γ -H2AX niso vezala.

3.2.5.2 Potek poskusa

Dan pred testom smo nasadili 0.8×10^6 celic na T-25 platenke za gojenje celic. Naslednji dan smo dodali sveže gojišče z izbranim citostatikom in celice inkubirali 24 ur na 37 °C (Preglednica 7).

Preglednica 7: Tretiranje HepG2 celic s citostatiki CP, ET, IM in 5-FU

Citostatik	Negativa	Kontrola	Pozitivna	Koncentracije ($\mu\text{g/ml}$)
CP	celično gojišče	gojišče z	ET	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in
ET	celično gojišče	gojišče z	/ ^a	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in
IM	celično gojišče	gojišče z	ET	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in
5-FU	celično gojišče	gojišče z	ET	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in

^a pri tretiranju celic z ET nismo uporabili pozitivne kontrole, saj je bila ta že del poskusa (1 $\mu\text{g/ml}$)

Pri vsakem poskusu smo uporabili več kontrol:

Negativna-neoznačena kontrola, kateri smo dodali le sveže gojišče in je nismo označili s protitelesi, s katero smo optimizirali nastavitev elektronike.

Negativna označena kontrola, kateri smo dodali le sveže gojišče in smo jo označili s protitelesi – na to kontrolo smo primerjali vzorce, da smo preprečili lažno pozitivne rezultate, zaradi neupoštevanja DSBs, ki so prisotni v kontrolnem vzorcu.

Kontrola topila, kjer smo svežemu gojišču dodali topilo (DMSO ali dH₂O), da smo ugotovili morebiten vpliv topila na celice.

Pozitivna kontrola, pri kateri smo celice tretirali z ET (1 $\mu\text{g/ml}$), za katerega je znano, da povzroča nastanek DSBs.

Po 24 urni izpostavitvi smo celice sprali z 5 ml 1x PBS in jih odlepili od podlage s 1.5 ml tripsina. Gojišče in PBS, s katerim smo spirali celice nismo zavrgli, ampak smo združili s požetimi celicami, da nismo izgubili plavajočih celic.

Centrifugirali smo 5 minut pri 800 obratih/minuto pri 6 °C ter zavrgli supernatant in resuspendirali celice v 5 ml hladnega 1x PBS. Ponovno smo centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto pri 6 °C ter zavrgli supernatant in resuspendirali celice v 0.5 ml hladnega 1x PBS.

Po kapljicah smo med mešanjem dodali 1.5 ml ledeno hladnega etanola (99.8 %) in fiksirali čez noč na +4 °C, ker tako odstranimo celice pred vrhom G₀/G₁ celičnega cikla (apoptotske celice). Fiksirane celice smo do označevanja hranili pri -20 °C.

3.2.5.3 Označevanje celic s protitelesi

Po fiksaciji smo celice centrifugirali 10 minut pri 1000 obratih/minuto pri 6 °C. Odstranili smo etanol in resuspendirali celice v 5 ml 1x PBS. Počakali smo 1 minuto in centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto pri 6 °C.

Odstranili smo supernatant in resuspendirali celice v 0.5 ml 1x PBS s protitelesi proti γ -H2AX (primarna monoklonska IgG₁ protitelesa, Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139), FITC conjugate), 2000x redčeni, neoznačeno kontrolo pa v 1x PBS. Priprava in označevanje s protitelesi je potekalo v temi. Celice smo inkubirali 1 uro na ledu v temi.

Po inkubaciji smo celice centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto pri 6 °C ter zavrgli supernatant in resuspendirali celice v 5 ml hladnega 1x PBS (to smo ponovili 2x).

Na koncu smo celice centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto pri 6 °C ter zavrgli supernatant in resuspendirali celice v 0.5 ml hladnega 1x PBS (povzeto po Chowdhury (2005), Kuo (2008) in 10G-Pos29-01, analiza dvojeravnih prelomov DNA s pretočno citometrijo, laboratorija GEN).

3.2.5.4 Statistična analiza rezultatov

Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo statistika. Statistično signifikantne razlike med tretiranimi celicami in kontrolo topila smo ugotovili s programskim paketom R, in sicer s programom linearni mešani model, kajti vir naključnih napak niso bile samo biološke ponovitve, ampak tudi vzorci znotraj ponovitve. Celoten poskus smo ponovili v treh neodvisnih ponovitvah.

4 REZULTATI

4.1 MUTAGENO DELOVANJE CITOSTATIKOV NA BAKTERIJI *Salmonella typhimurium* TA98 in TA100

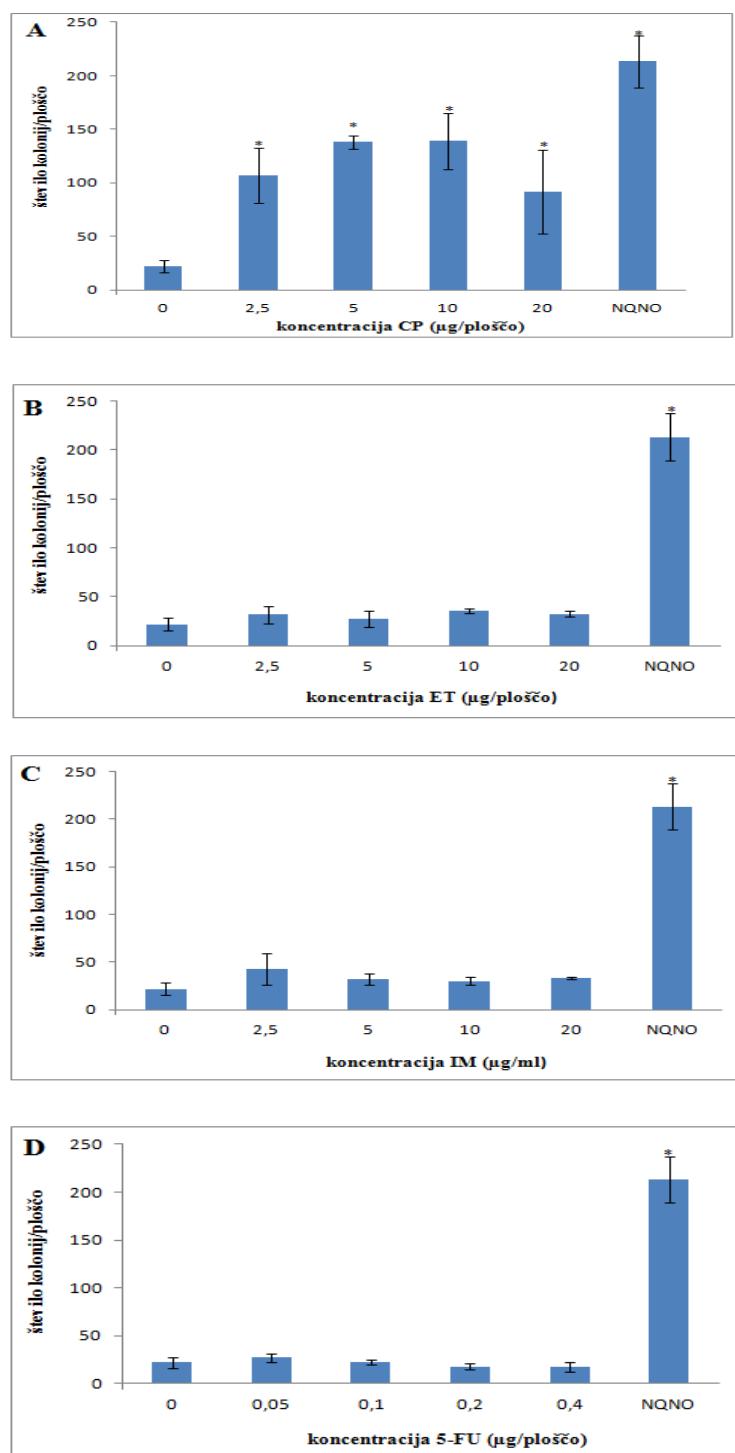
4.1.1 Amesov test

V magistrski nalogi smo želeli preveriti, ali citostatiki CP, ET, IM in 5-FU povzročajo mutacije pri bakteriji *S. typhimurium* sev TA98 in TA100. Bakterije *S. typhimurium* sev TA98 in TA100 smo izpostavili različnim koncentracijam citostatikov CP, ET in IM (0, 2.5, 5, 10 in 20 µg/ploščo) ter 5-FU (0, 0.05, 0.1, 0.2 in 0.4 µg/pl) in na ta način ugotavljal njihovo potencialno mutageno delovanje.

4.1.1.1 *S. typhimurium* sev TA98

Rezultati so pokazali, da citostatik CP poveča število induciranih revertant, kar pomeni, da povzroča mutacijo -1 premika bralnega okvirja (delecije) pri sevu TA98. Koncentracija 20 µg/ploščo je bila rahlo toksična, saj smo pod mikroskopom opazili redkejše ozadje. Pozitivna kontrola NQNO se je prav tako statistično značilno razlikovala od kontrole topila (Slika 9A).

Ostali citostatiki (ET, IM in 5-FU) pri nobeni testirani koncentraciji niso delovali mutageno, saj niso povzročili mutacije -1 premika bralnega okvirja (delecije) oziroma povečanje števila induciranih revertant pri sevu TA98. Najvišja testirana koncentracija 20 µg/ploščo pri citostatiku ET in IM in 0.4 µg/ploščo pri 5-FU, ni bila toksična. Pozitivna kontrola NQNO se je v vseh treh primerih statistično značilno razlikovala od kontrole topila (Slike 9B, 9C in 9D).



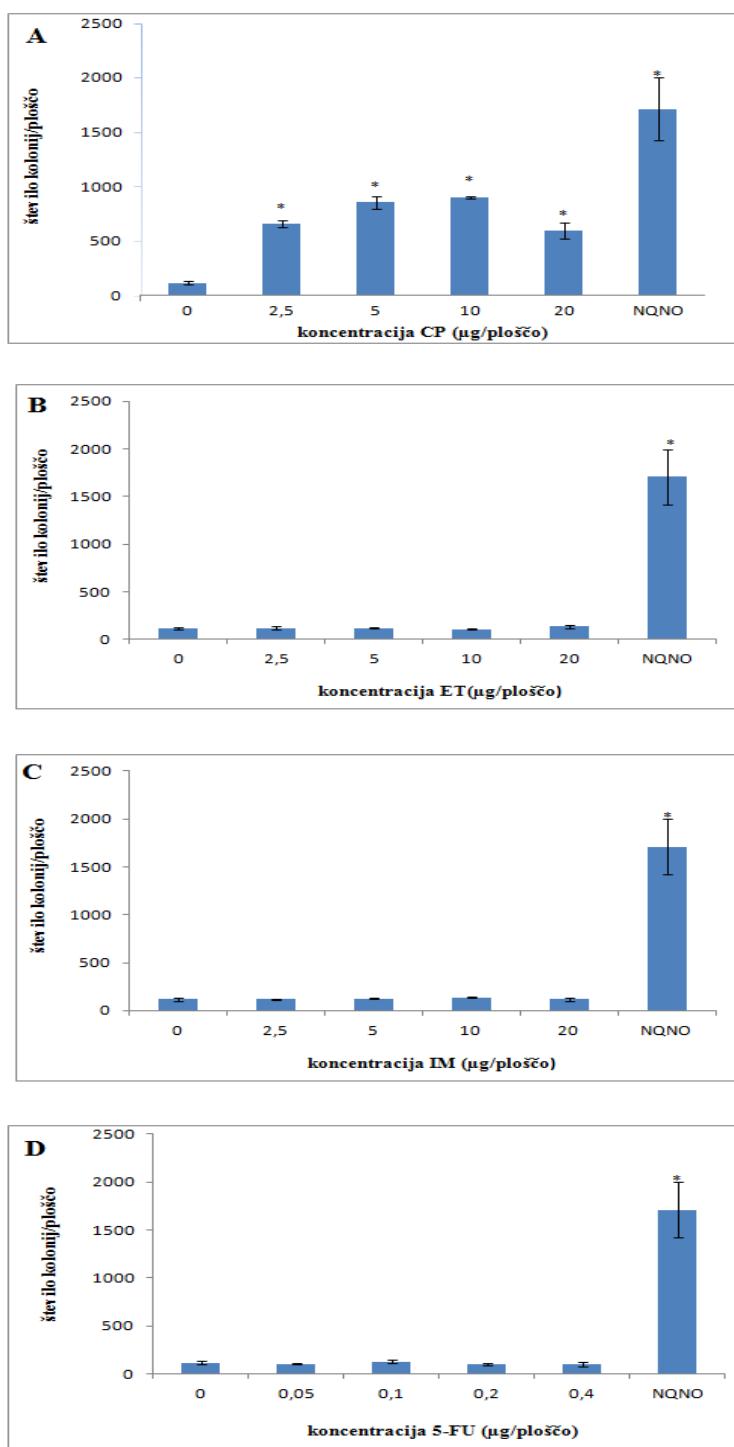
Slika 9: Število kolonij *S. typhimurium* seva TA98 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam citostatika CP (A), citostatika ET (B) citostatika IM (C) in citostatika 5-FU (D)

Bakterije *S. typhimurium* seva TA98 smo izpostavili različnim koncentracijam CP, ET, IM (0, 2,5, 5, 10, 20 µg/ploščo) in 5-FU (0, 0,05, 0,1, 0,2 0,4 µg/ploščo). Za kontrolno skupino (koncentracija 0 µg/ploščo) smo namesto vzorca dodali DMSO, za pozitivno kontrolo pa smo uporabili NQNO (2,5 µg/ml). Rezultati so prikazani kot povprečno število kolonij zraslih na treh ploščah ($\pm SD$). * $p<0,05$; statistično značilno povečanje števila induciranih revertant s kontrolno skupino.

4.1.1.2 *S. typhimurium* sev TA100

Rezultati so pokazali, da citostatik CP poveča število induciranih reventant, kar pomeni, da povzroča zamenjavo baznih parov leucina (GAG/CTC) s prolinom (GGG/CCC) pri sevu TA 100. Koncentracija 20 µg/ploščo je bila prav tako rahlo toksična, saj je bilo ozadje na ploščah redkejše. Pozitivna kontrola NQNO se je prav tako statistično značilno razlikovala od kontrole topila (Slika 10A).

Ostali citostatiki (ET, IM in 5-FU) pri nobeni testirani koncentraciji niso delovali mutageno, saj niso povzročili zamenjave baznih parov leucina (GAG/CTC) s prolinom (GGG/CCC) oziroma povečanje števila induciranih revertant. Najvišja testirana koncentracija 20 µg/ploščo pri citostatiku ET in IM in 0.4 µg/ploščo pri 5-FU, ni bila toksična. Pozitivna kontrola NQNO se je v vseh treh primerih statistično značilno razlikovala od kontrole topila (Slike 10B, 10C in 10D).



Slika10: Število kolonij *S. typhimurium* seva TA100 zraslih na ploščah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam citostatika CP (A) citostatika ET (B), citostatika IM (C) in citostatika 5-FU (D)

Bakterije *S. typhimurium* seva TA100 smo izpostavili različnim koncentracijam CP, ET, IM (0, 2,5, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ploščo}$) in 5-FU (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 $\mu\text{g/ploščo}$). Za kontrolno skupino (koncentracija 0 $\mu\text{g/ploščo}$) smo namesto vzorca dodali (DMSO), za pozitivno pa smo uporabili NQNO (končna koncentracija 2,5 $\mu\text{g/ml}$). Rezultati so prikazani kot povprečno število kolonij zraslih na treh ploščah ($\pm\text{SD}$). * $p<0.05$; statistično značilno povečanje števila induciranih revertant v primerjavi s kontrolno skupino.

4.2 TEST MIKROJEDER

V drugem delu magistrske naloge smo preverili ali citostatiki CP, ET, IM in 5-FU vplivajo na nastanek MNs, NPBs in NBUDs pri celicah HepG2 po 24 urni izpostavitvi ter pri celicah ZFL po 72 urni izpostavitvi. Celice HepG2 smo izpostavili CP, ET, IM in 5-FU pri koncentracijah (0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 µg/ml), celice ZFL pa pri koncentracijah CP (0.001, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml), ET (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 in 100 ng/ml), IM (0.001, 0.01, 0.1, 1 in 5µg/ml) ter 5-FU (0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 µg/ml). Prav tako smo pri obih celičnih linijah preverili vpliv izbranih citostatikov na NDI.

4.2.1 Celice HepG2

Rezultati so pokazali, da po 24 urni izpostavitvi celic HepG2 CP pride do statistično značilnega povečanja števila MNs in do znižanja NDI le pri najvišji koncentraciji, 1 µg/ml (Preglednica 8).

Preglednica 8: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika CP na celice HepG2. Preglednica prikazuje število celic z MNs, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija (µg/ml)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
24h	0	26.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00	60.00 ± 22.63	1.88 ± 0.11
	0.001	35.00 ± 21.21	0.00 ± 0.00	76.50 ± 34.65	1.76 ± 0.31
	0.01	24,50 ± 6.36	0.00 ± 0.00	78.50 ± 40.31	1.75 ± 0.33
	0.1	40.50 ± 10.61	0.50 ± 0.71	81.00 ± 41.01	1.78 ± 0.36
	1	56.50 ± 2.12*	0.50 ± 0.71	99.00 ± 21.21	1.43 ± 0.01*
	BaP	40.00 ± 0.00*	2.00 ± 2.83	79.00 ± 32.53	1.36 ± 0.04*

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku CP v koncentracijah (0, 0.001, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml) za 24 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Celice kontrole smo izpostavili gojišču s 1% dH₂O, (0= kontrola topila). Celice smo izpostavili tudi 10 µM BaP, ki je predstavljal pozitivno kontrolo. Poskus smo ponovili v treh neodvisnih ponovitvah in v vsakem poskusu prešteli 1000 dvojedrnih celic ter dodatnih 500 celic, za določitev NDI. * p<0.05; statistično značilno povečanje števila celic z MNs ter zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino. MNs = mikrojedra, NPBS = nukleoplazmatski mostički, NBUDS = jedrni brsti, NDI = delitveni indeks celic.

Iz rezultatov je razvidno, da je po izpostavitvi celic HepG2 ET pri koncentracijah 0,1, 1 in 10 µg/ml prišlo do statistično značilnega povečanja števila celic z MNs, pri koncentracijah 1 in 10 µg/ml do povečanega nastanka NPBs ter pri vseh uporabljenih koncentracijah (0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 µg/ml) do povečanega nastanka NBUDs. Prav tako je pri koncentracijah 1 in 10 µg/ml prišlo do zmanjšane delitve celic, saj je NDI tretiranih celic bil statistično značilno manjši od NDI kontrolnih celic (Preglednica 9).

Preglednica 9: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika ET na celice HepG2. Preglednica prikazuje število celic z MNi, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija (µg/ml)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
24 h	0	22.50 ± 0.71	1.00 ± 1.41	44.50 ± 6.36	2.00 ± 0.04
	0.001	25.00 ± 1.41	0.50 ± 0.71	73.50 ± 2.12*	1.94 ± 0.06
	0.01	28.50 ± 2.12	2.50 ± 0.71	79.00 ± 1.41*	2.02 ± 0.05
	0.1	44.0 ± 2.83*	2.50 ± 0.71	82.50 ± 2.12*	1.98 ± 0.06
	1	82.50 ± 7.07*	13.00 ± 1.41*	117.00 ± 4.24*	1.38 ± 0.18*
	10	59.00 ± 4.24*	36.00 ± 8.49*	130.00 ± 8.49*	1.19 ± 0.03*
	BaP	41.00 ± 4.24*	3.00 ± 1.41	88.00 ± 8.49*	1.36 ± 0.00*

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku ET v koncentracijah (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 µg/ml) za 24 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Celice kontrole smo izpostavili gojišču s 0.04 % DMSO. Za ostale podrobnosti glej legendo preglednice 8. * p<0.05; statistično značilno povečanje števila celic z MNs, NPBs, NBUDs ter zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino.

Rezultati so pokazali, da po tretiranju celic HepG2 z IM pri nobeni testirani koncentraciji ni prišlo do povečanja števila celic z MNs, NPBs, kot tudi ne z NBUDs. Prav tako nismo opazili vpliva na delitev celic, saj se NDI celic tretiranih z IM ni statistično značilno razlikoval od NDI kontrolnih celic (Preglednica 10).

Preglednica 10: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika IM na celice HepG2. Preglednica prikazuje število celic z MNs, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
24h	0	22.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00	194.00 ± 93.34	1.68 ± 0.05
	0.001	18.00 ± 8.49	0.00 ± 0.00	199.00 ± 1.41	1.75 ± 0.02
	0.01	16.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00	166.00 ± 45.25	1.86 ± 0.05
	0.1	19.00 ± 1.41	0.00 ± 0.00	187.00 ± 94.75	1.69 ± 0.03
	1	19.00 ± 1.41	0.00 ± 0.00	201.00 ± 18.38	1.78 ± 0.03
	10	15.00 ± 7.07	1.00 ± 1.41	162.50 ± 16.26	1.69 ± 0.07
	BaP	$44.00 \pm 8.49^*$	0.00 ± 0.00	$96.00 \pm 19.80^{***}$	$1.33 \pm 0.05^*$

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku IM v koncentracijah (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) za 24 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Celice kontrole smo izpostavili gojišču s 0.02 % dH₂O. Za ostale podrobnosti glej legendo preglednice 8. * p<0.05, *** p<0.001; statistično značilno povečanje števila celic z MNs, NPBs, NBUDs ter zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino.

Po izpostavitvi celic HepG2 5-FU smo statistično značilno povečanje števila celic z MNs opazili pri koncentracijah 0.1, 1 in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pri koncentracijah 1 in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ je bilo število celic z MNs celo manjše, kot pri koncentraciji 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Glede na to, da je pri koncentracijah 1 in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ prišlo tudi do zmanjšanega NDI v primerjavi s kontrolnimi celicami, predvidevamo, da so celice HepG2 po izpostavitvi tem koncentracijam v citostazi, pri čemer celice ostanejo žive, a se ne delijo več (Preglednica 11).

Preglednica 11: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika 5-FU na celice HepG2. Preglednica prikazuje število celic z MNs, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
24h	0	41.50 ± 14.85	1.00 ± 0.71	105.50 ± 53.03	1.88 ± 0.10
	0.001	39.50 ± 12.02	0.50 ± 0.71	95.50 ± 14.85	1.87 ± 0.05
	0.01	37.00 ± 22.63	1.00 ± 0.00	100.00 ± 65.05	1.88 ± 0.10
	0.1	$119.00 \pm 1.41^*$	4.50 ± 2.12	118.50 ± 6.36	1.71 ± 0.13
	1	$77.00 \pm 31.11^*$	1.00 ± 1.41	102.00 ± 24.04	$1.21 \pm 0.05^*$
	10	$58.00 \pm 29.70^*$	0.50 ± 0.71	86.50 ± 0.71	$1.22 \pm 0.14^*$
	BaP^a	$88.50 \pm 30.41^*$	0.50 ± 0.71	101.50 ± 21.92	$1.36 \pm 0.31^*$

^a Rezultat se razlikuje od drugih citostatikov. S večanjem pasaže aktivnost encimov celic upada in pasaže med posameznimi poskusi so bile različne zato predvidevamo, da je to vzrok odstopanju rezultata.

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku 5-FU v koncentracijah (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) za 24 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Celice kontrole smo izpostavili gojišču s 0.013 % DMSO. Za ostale podrobnosti glej legendo preglednice 8. * p<0.05; statistično značilno povečanje števila celic z MNs ter zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino.

4.2.2 Celice ZFL

Iz rezultatov je razvidno, da je po izpostavitvi celic ZFL CP pri vseh uporabljenih koncentracijah (0, 0.1, 0.01 in 0.001 µg/ml) prišlo do naraščanja števila celic ZFL z MNs, vendar se rezultati testiranih koncentracij statistično niso razlikovali od rezultatov kontrole. Opazili pa smo, da so vse testirane koncentracije statistično značilno vplivale na povečanje števila celic z NBUDs. Pri koncentracijah 0.01 in 0.1 µg/ml je število jedrnih brstov bilo celo manjše kot pri koncentracijah 0.001 in 1 µg/ml. Predvidevamo, da je prišlo do citostaze. Posledično je bil tudi NDI pri teh koncentracijah nižji, od kontrolnih celic se je statistično značilno razlikoval pri koncentracijah 0.01 in 0.1 µg/ml (Preglednica 12).

Preglednica 12: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika CP na celice ZFL. Preglednica prikazuje število celic z MNi, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija (µg/ml)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
72h	0	7.5 ± 0.71	0.00 ± 0.00	34.00 ± 2.83	1.60 ± 0.02
	0.001	8.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	57.50 ± 3.54***	1.52 ± 0.01
	0.01	11.00 ± 1.41	0.00 ± 0.00	51.50 ± 4.95**	1.47 ± 0.01*
	0.1	12.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	55.00 ± 4.24**	1.49 ± 0.00*
	1	14.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00	81.50±37.48***	1.48 ± 0.04
	BaP	14.50±3.54	0.00 ± 0.00	61.50 ± 2.12***	1.48 ± 0.07

Celice ZFL smo izpostavili citostatiku CP v koncentracijah 0, 0.001, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml za 72 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Celice kontrole smo izpostavili gojišču. Celice smo izpostavili tudi 10 µM BaP, ki je predstavljal pozitivno kontrolo. Poskus smo ponovili v dveh neodvisnih ponovitvah in v vsakem poskusu prešeli 1000 dvojedrnih celic ter dodatnih 500 celic, za določitev NDI.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; statistično značilno povečanje števila celic z NBUDs ter zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino. MNs = mikrojedra, NPBS = nukleoplazmatski mostički, NBUDS = jedri brsti, NDI = delitveni indeks celic.

Po izpostavitve celic ZFL ET smo opazili, da je pri koncentracijah 10 in 100 ng/ml prišlo do statistično značilnega povečanja števila celic z MNs ter pri koncentraciji 100 ng/ml do statistično značilnega povečanja števila NBUDs. Pri nobeni koncentraciji nismo opazili statistično značilne spremembe NDI celic tretiranih z ET glede na kontrolo (Preglednica 13).

Preglednica 13: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika ET na celice ZFL. Preglednica prikazuje število celic z MNs, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija (ng/ml)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
72h	0	22.00 ±5.66	0 ± 00	18.00	1.82 ± 0.09
	0.001	26.00 ±5.66	1 ± 1.41	30.00 ± 0.00	1.80 ± 0.07
	0.01	19.00 ±1.41	0 ± 00	30.00 ± 8.49	1.76 ± 0.02
	0.1	18.00 ±5.66	0 ± 00	28.00 ± 2.83	1.76 ± 0.06
	1	14.00 ±2.83	0 ± 00	18.00 ± 5.66	1.72 ± 0.04
	10	34.00 ±0.00*	0 ± 00	25.00 ± 7.07	1.77 ± 0.09
	100	55.00±1.41***	0 ± 00	52 ± 3.54*	1.64 ± 0.01
	BaP	28.00 ± 8.49	0 ± 00	18.00 ± 8.49	1.76 ± 0.05

Celice ZFL smo izpostavili citostatiku ET v koncentracijah 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 in 100 ng/ml za 72 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Za ostale podrobnosti glej legendo preglednice 12. * p<0.05, *** p<0.001; statistično značilno povečanje števila celic z MNs, NBUDs ter zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino.

Ugotovili smo, da se je po izpostavitvi IM število celic z MNs statistično značilno povečalo pri koncentraciji 1 µg/ml, medtem ko pri najvišji koncentraciji 5 µg/ml ni prišlo do značilne statistične razlike. Predvidevamo, da je bila koncentracija 5 µg/ml toksična za celice ZFL in da je število celic z MNs, število preživelih celic (Preglednica 14).

Preglednica 14: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika IM na celice ZFL. Preglednica prikazuje število celic z MNs, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija (µg/ml)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
72h	0	9,00 ±1,41	0,00 ± 0,00	28,00 ± 8,49	1,74 ± 0,01
	0.001	14,00 ±8,49	0,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00	1,70 ± 0,03
	0.01	12,00 ±0,00	0,00 ± 0,00	22,00 ± 2,83	1,77 ± 0,05
	0.1	15,00 ±4,24	0,00 ± 0,00	18,00 ± 2,83	1,77 ± 0,03
	1	21,00 ±9,90*	0,00 ± 0,00	32,00 ± 14,14	1,77 ± 0,04
	5	11,00 ±4,24	0,00 ± 0,00	21,00 ± 4,24	1,69 ± 0,05
	BaP	22,00 ±2,83*	0,00 ± 0,00	34,00 ± 14,14	1,70 ± 0,01

Celice ZFL smo izpostavili citostatiku IM v koncentracijah 0.001, 0.01, 0.1, 1 in 5µg/ml µg/ml za 72 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Za ostale podrobnosti glej legendo preglednice 12. * p<0.05; statistično značilno povečanje števila celic z MNs ter zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino.

Rezultati poskusov izpostavitev celic ZFL 5-FU so pokazali, da je pri koncentraciji 10 µg/ml prišlo do statistično značilnega vpliva na preživetje celic, saj se celice pri tej koncentraciji niso več delile in posledično je prišlo tudi do zmanjšanja NDI (Preglednica 15).

Preglednica 15: Genotoksični vpliv različnih koncentracij citostatika 5-FU na celice ZFL. Preglednica prikazuje število celic z MNi, NPBs in NBUDs ter vpliv na NDI

Čas izpostavitve	Koncentracija (µg/ml)	Celice z MNs	NPBs	NBUDs	NDI
72h	0	14,00 ± 2,83	0 ± 00	24,00 ± 5,66	1,65 ± 0,03
	0,001	18,00 ± 2,83	0 ± 00	12,00 ± 0,00	1,70 ± 0,10
	0,01	20,50 ± 0,71	0 ± 00	20,00 ± 11,31	1,72 ± 0,04
	0,1	18,00 ± 8,49	0 ± 00	19,00 ± 7,07	1,70 ± 0,14
	1	12,00 ± 0,00	0 ± 00	32,00 ± 11,31	1,61 ± 0,03
	10	n.d.	n.d.	n.d.	1,16 ± 0,06*
	BaP	20,00 ± 0,00	0 ± 00	30,00 ± 2,83	1,65 ± 0,04

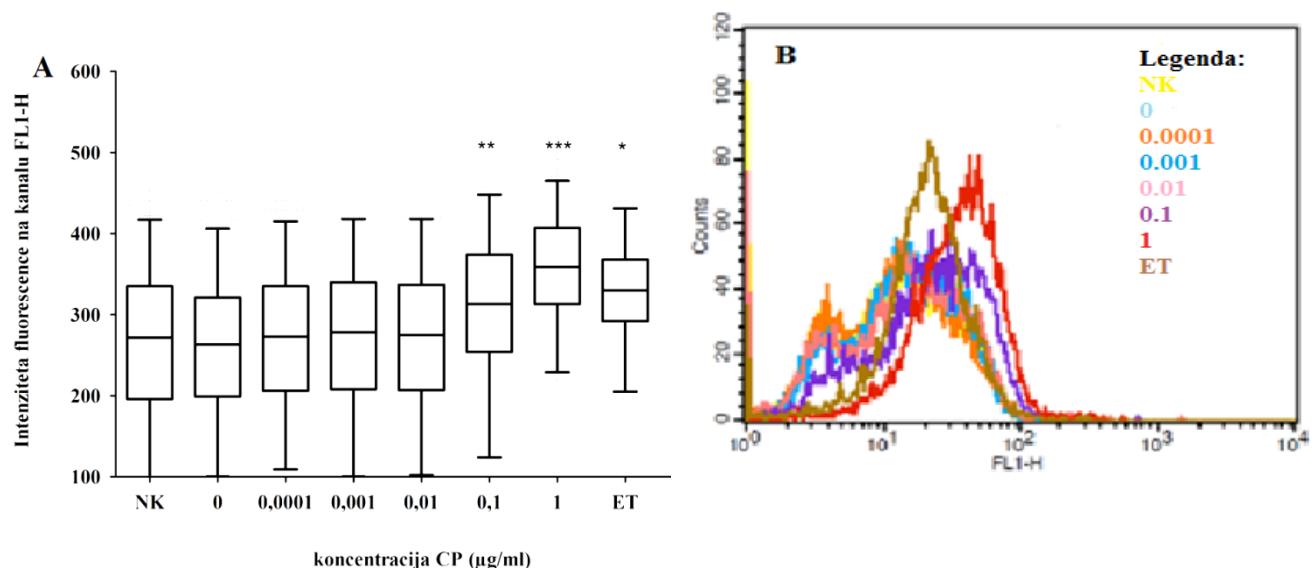
Celice ZFL smo izpostavili citostatiku 5-FU v koncentracijah 0,001, 0,01, 0,1, 1 in 10 µg/ml za 72 ur in nato ugotavljali genotoksično delovanje s testom mikrojeder. Celice kontrole smo izpostavili gojišču z 0,013 % DMSO. Za ostale podrobnosti glej legendo preglednice 12. * p<0,05; statistično značilno zmanjšanje NDI v primerjavi s kontrolno skupino.

Opomba: BaP predstavlja pozitivno kontrolo, vendar se rezultati med citostatiki CP, ET, IM in 5-FU razlikujejo. Celice ZFL smo uporabljali do največ 35. pasaže, s tem, da so se pasaže med posameznimi poskusi razlikovale. Celice ZFL imajo ohranjene metabolne funkcije, vendar se s pasažo metabolna funkcija celic zmanjša in predvidevamo, da je zaradi tega prišlo do razlik v rezultatih.

4.3 ANALIZA DVOVERIŽNIH PRELOMOV S PRETOČNO CITOMETRIJO

V zadnjem delu magistrske naloge smo želeli preveriti ali pri celicah HepG2 izbrani citostatiki CP, ET, IM in 5-FU pri koncentracijah 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, in 1 µg/ml po 24 urah vplivajo na nastanek žarišč γ-H2AX, katerih število je sorazmerno s številom DSBs v razmerju 1:1.

Rezultati so pokazali, da je po izpostavitevi celic HepG2 CP pri koncentracijah 0.1 in 1 µg/ml prišlo do statistično značilnega povečanja števila DSBs (Slika 11).

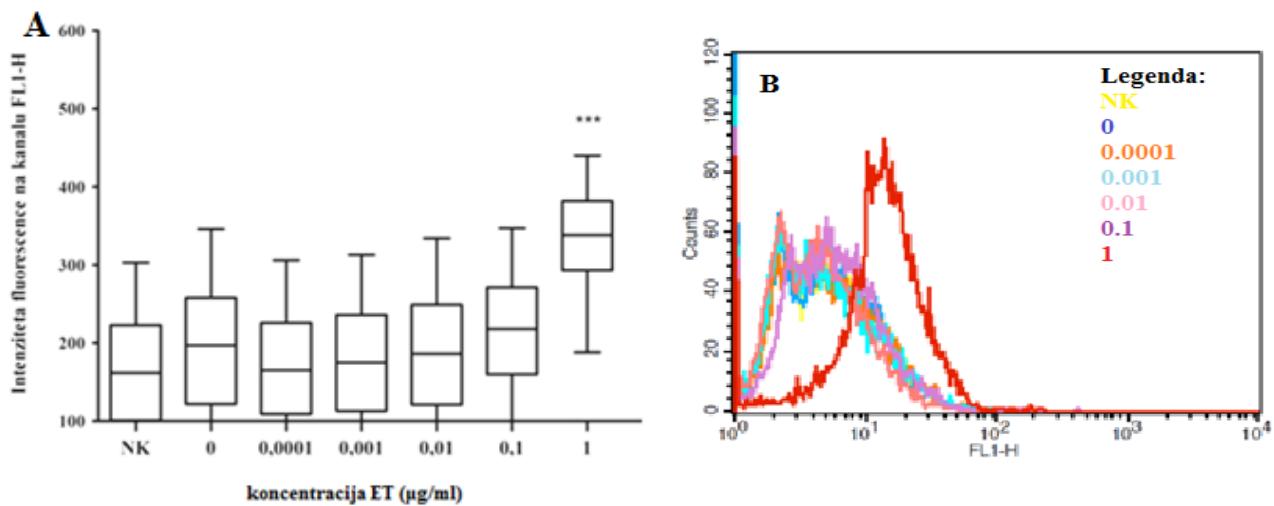


Slika 11: Vpliv različnih koncentracij citostatika CP na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) in reprezentativni histogram (B)

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku CP v koncentracijah 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml za 24 ur in nato analizirali DSB s pretočno citometrijo. Celice kontrole smo izpostavili gojišču. Celice smo izpostavili tudi ET (1 µg/ml), ki je predstavljal pozitivno kontrolo ter kontroli topila (gojišče z 0.1 % dH₂O). Poskus smo ponovili najmanj v treh neodvisnih ponovitvah in v vsakem poskusu prešteli 10 000 celic. (A) Rezultate smo podali v obliki škatel z brki (angl. box plot), ki ponazarjajo porazdelitev naših meritev. Prvi rob škatle predstavlja prvi kvartil (25% podatkov) in drugi rob škatle tretji kvartil (75% podatkov). Škatla z brki in mediana (vodoravna črta v škatli) predstavljajo 95% interval zaupanja. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; statistično značilno povečanje števila DSBs. (B) Reprezentativni histogram.

DSBs = dvoverižni prelomi DNA, NK = negativna kontrola, O = kontrola topila, ET = pozitivna kontrola, FL1-H = emisijska valovna dolžina 515-545 nm.

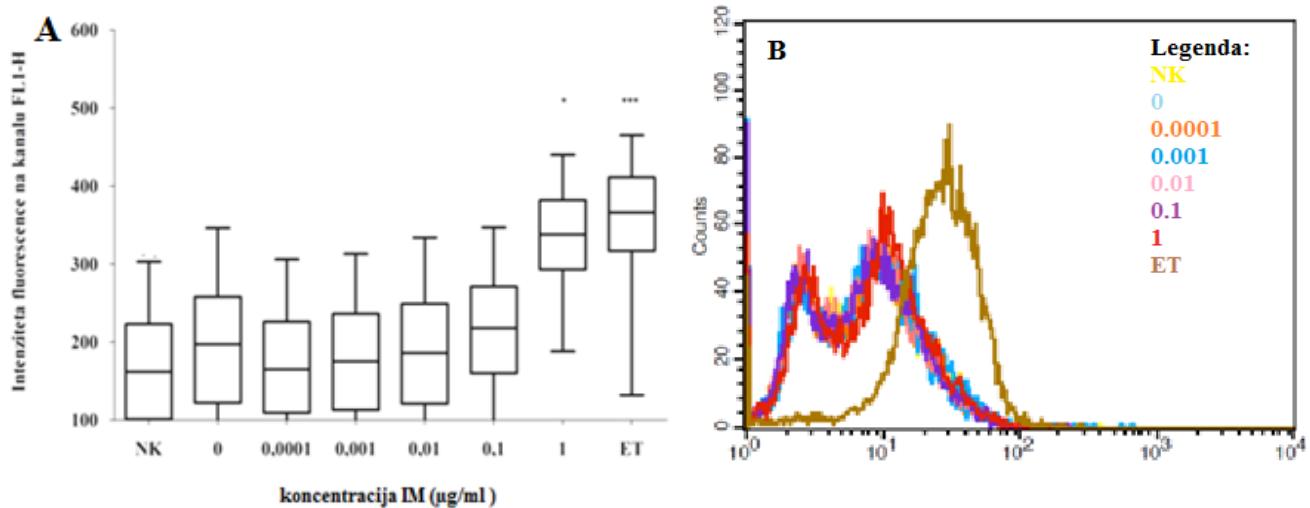
Iz rezultatov je razvidno, da je po izpostavitvi celic HepG2 citostatiku ET edino pri koncentraciji 1 µg/ml prišlo do statistično značilnega povečanja števila DSBs (Slika 12).



Slika 12: Vpliv različnih koncentracij citostatika ET na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) in reprezentativni histogram (B)

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku ET v koncentracijah 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml za 24 ur in nato analizirali DSBs s pretočno citometrijo. Celice kontrole topila smo izpostavili gojišču z 0.004 % DMSO. Za ostale podrobnosti glej legendo slike 11. *** p<0.001; statistično značilno povečanje števila DSBs.

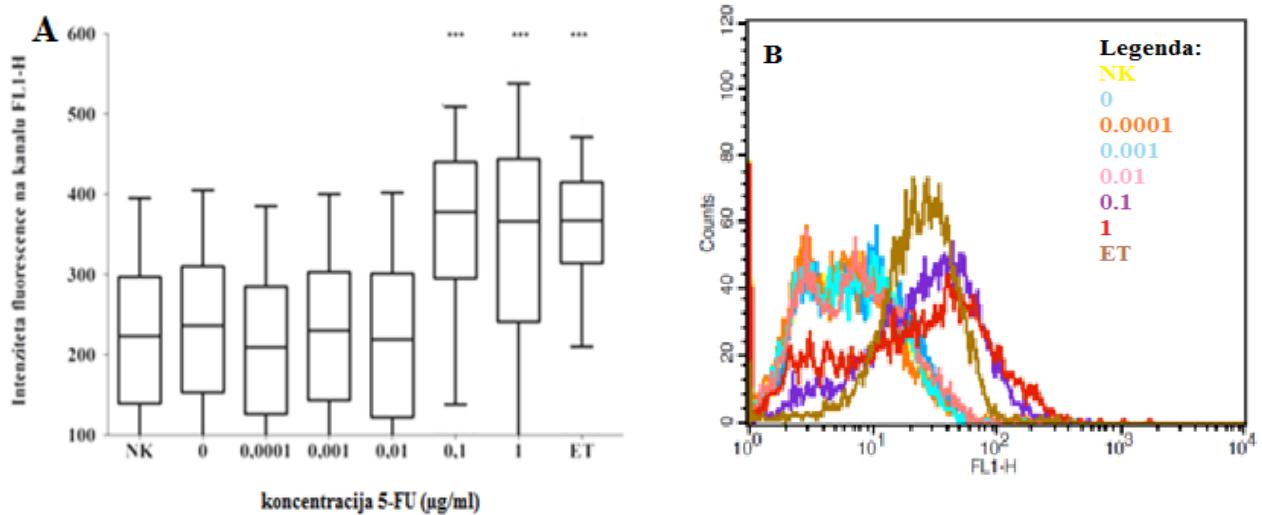
Rezultati so pokazali, da je pri poskusih, v katerih smo celice izpostavili IM prišlo do statistično značilnega povečanja števila DSBs pri koncentraciji 1 µg/ml (Slika 13).



Slika 13: Vpliv različnih koncentracij citostatika IM na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) in reprezentativni histogram (B)

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku IM v koncentracijah 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml za 24 ur in nato analizirali DSBs s pretočno citometrijo. Celice kontrole topila smo izpostavili gojišču z 0.002 % dH₂O. Za ostale podrobnosti glej legendo slike 11.* p<0.05, *** p<0.001; statistično značilno povečanje števila DSBs.

Ugotovili smo, da je po izpostavitevi celic citostatiku 5-FU pri koncentracijah 0.1 in 1 µg/ml prišlo do statistično značilnega povečanja števila DSBs (Slika 14).



Slika 14: Vpliv različnih koncentracij citostatika 5-FU na nastanek DSBs pri celicah HepG2 (A) in reprezentativni histogram (B)

Celice HepG2 smo izpostavili citostatiku 5-FU v koncentracijah 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml za 24 ur in nato analizirali DSBs s pretočno citometrijo. Celice kontrole topila smo izpostavili gojišču z 0.0013 % DMSO. Za ostale podrobnosti glej legendo slike 11. *** p<0.001; statistično značilno povečanje števila DSBs.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Zaradi obsežne uporabe farmacevtskih izdelkov, med njimi tudi citostatikov, le-ti zaidejo v okolje, tako, da so živi organizmi različno dolgo izpostavljeni različnim vrstam in koncentracijam citostatikov ter njihovim metabolitom. Ostanki citostatikov že v nizkih koncentracijah lahko ogrožajo organizme v okolju, kot tudi zdravje ljudi. Posledično lahko normalne celice preusmerijo na pot rakaste pretvorbe.

Organizmi prihajajo v stik s citostatiki in njihovimi metaboliti na različne načine. Medicinsko osebje s pripravo zdravil, odstranjevanjem ostankov citostatikov ter čiščenjem prostorov in predmetov, ki so bili v stiku z zdravljenimi pacienti (Kopjar in sod., 2010). Veliko patientov je v domači oskrbi, tako, da tudi družinski člani, ki skrbijo za onkološkega bolnika prihajajo v stik s citostatiki (Johnson in sod., 2007). Citostatiki zaidejo tudi v okolje, predvsem z bolnišničnimi odpadnimi vodami ter z izločki (blatom in urinom). Čistilne naprave po navadi ne odstranijo citostatikov iz odpadnih voda, saj se ti nahajajo v različnih koncentracijah ter z različnimi kemijskimi značilnostmi, ki omejujejo njihovo sorpcijo v aktivno blato in razgradnjo z mikroorganizmi (Kosjek in Heath, 2011). V okolje, predvsem v druge površinske vode (reke, jezera, morja) in podtalnice zaidejo večinoma nespremenjeni, kjer so jim izpostavljeni vsi živi organizmi, predvsem pa vodni organizmi (Nikolaou in sod., 2007). Številne raziskave so proučevale vpliv različnih citostatikov pri nizkih koncentracijah na različne vodne organizme in dokazale, da zavirajo rast in razvoj organizmov (Zounková in sod., 2007; Zounková in sod., 2010).

V tovrstnih raziskavah v literaturi smo zasledili podatke o genotoksičnem delovanju citostatikov pri nizkih koncentracijah na tarčne (medicinsko osebje) in netarčne organizme (vodni organizmi), zato smo v magistrski nalogi žeeli preveriti genotoksično delovanje citostatikov CP, ET, IM in 5-FU na bakterije *Salmonella typhimurium* ter na celice HepG2 (celice človeškega hepatoma) in ZFL (jetrne celice rib cebric).

Najprej smo z Amesovim testom že leli preveriti mutageno delovanje izbranih citostatikov na bakterije *Salmonella typhimurium*, sev TA98 in TA100. Pokazali smo, da je edino CP deloval mutageno, saj je povečal število induciranih revertant. V literaturi je zelo malo podatkov o ugotavljanju mutagenega delovanja citostatikov z Amesovim testom. Podobne rezultate navaja Zounková s sod. (2007), ki je s SOS kromotestom dokazala genotoksičnost citostatika CP na bakteriji *Escherichia coli*. Rezultati Zounkove s sod. se ujemajo z ugotovitvami Quillardeta in Hofnunga (1993), ki sta s SOS kromotestom dokazala genotoksičnost ciklofosfamida, ter z Amesovim testom genotoksičnost CP na bakterijah *S. typhimurium*, kar se ujema tudi z našo študijo.

V nadaljevanju smo preverili, ali izbrani citostatiki delujejo genotoksično na celice HepG2 in ZFL s testom mikrojeder. V naši študiji smo preverili kako izbrani citostatiki po 24 urni izpostavitvi vplivajo na celice HepG2 in ugotovili, da so vsi razen IM, delovali genotoksično. Razlog za opažene razlike v genotoksičnosti izbranih citostatikov za celice HepG2 je najverjetnejše v njihovih različnih mehanizmih delovanja. Citostatik CP se neposredno veže na DNA in tvori prečne povezave med verigami oziroma DNA adukte (Pabla in sod., 2008), ET inhibira encim topoizomerazo II, ki se tudi veže na DNA in spremeni njen navoj (Castro in sod., 2003), citostatik 5-FU se v celici pretvori v številne aktivne antimetabolite, ki se prav tako neposredno vgradijo v DNA (Longley in sod., 2003). IM nima neposrednega vpliva na DNA, temveč inhibira delovanje signalnega encima tirozin kinaze, ki skrbi za biološke procese, kot so celična rast, diferenciacija in celična smrt (Obreza, 2009), kar pa v našem primeru ni bilo, ni povzročilo klastogenega delovanja.

V literaturi nismo zasledili, da bi s testom mikrojeder analizirali vpliv citostatikov na celicah HepG2, so se pa številne raziskave usmerile na ugotavljanje dolgotrajne izpostavljenosti citostatikom v delovnem okolju (Kopjar in sod., 2010). Kopjar s sod. (2010) je s testom mikrojeder ugotavljal pojavnost MNs pri medicinskem osebju, ki so vsako dnevno izpostavljeni številnim citostatikom. S svojimi raziskavami so dokazali, da dolgotrajna izpostavljenost citostatikom ter neupoštevanje navodil za varnost pri delu, povzroči poškodbe DNA ter vodi v nastanek raka, predvsem raka urogenitalnega in prebavnega trakta.

Poleg človeških jetrnih celic HepG2, smo v nalogi s testom mikrojeder ugotavljali genotoksično delovanje izbranih citostatikov tudi na ribjih jetrnih celicah ZFL. Podvojevalni čas celic ZFL je od 36 – 48 ur, zato smo celice citostatikom izpostavili 72 ur. Celice ZFL so izolirane iz jeter rib cebric in so zato v proučevanju okoljskih onesnažil zelo pomemben modelni organizem (Ghosh in sod., 1994). Kot vodni organizem so pomemben testni sistem tudi v naši študiji, saj citostatiki in njihovi metaboliti z odpadnimi vodami zaidejo tudi v površinske vode in s tem ogrožajo rast in razvoj vodnih živali, rastlin in mikroorganizmov. Za razliko od celic HepG2, so na celice ZFL vsi citostatiki delovali genotoksično. Število celic z MNs, NPBs in NBUDs se je povečalo ter NDI zmanjšal pri nižjih testiranih koncentracijah v primerjavi s celicami HepG2. Predvidevali smo, da so celice ZFL bolj občutljive od celic HepG2, zato so vsi citostatiki delovali genotoksično. Ribe cebrice se kot modelni organizem uporabljajo relativno kratko in zato v literaturi ni veliko podatkov o celičnih kulturah, izoliranih iz teh organizmov. Tudi v našem primeru v literaturi nismo zasledili, da so s testom mikrojeder analizirali vpliv citostatikov na celicah ZFL, tako, da so naši rezultati na tem področju prvi. Menimo, da bi v prihodnosti bilo smotrno izvesti več tovrstnih raziskav, kjer bi na podobnih celičnih linijah ugotavljali vpliv citostatikov in njihovih metabolitov, saj s primerjavami odziva različnih testnih sistemov dobimo boljše rezultate, kar nam lahko pomaga tudi pri predvidevanju potencialnega učinka na ljudi.

Podobne raziskave je izvedla Zounková s sod. (2007), ki je ugotavljala genotoksičnost citostatkov CP, ET, 5-FU in dokosorubicina s SOS kromotestom na modelnih organizmih *Pseudomonas putida*, *Pseudokirchneriella subcapitata* in *Daphnia magna*. Rezultati so pokazali, da sta bila CP in dokosorubicin zelo genotoksična, 5-FU je bil tudi genotoksičen, vendar manj kot predhodna citostatika, s tem, da je bil ET samo škodljiv. Zounková s sod. (2010) je v drugi raziskavi proučevala tudi genotoksičnost 5-FU, citarabina in gemcibina na *P. putida*, *Desmodesmus subspicatus* in *D. magna* in v tej raziskavi ugotovila, da je bil citostatik 5-FU najbolj genotoksičen. Ti rezultati so v nasprotju z rezultati genotoksičnega delovanja citostatikov CP, ET in 5-FU, ki smo jih dobili mi s testom mikrojeder.

EU direktiva 93/67/ECC (EC, 1996) je citostatike glede toksičnost za vodne organizme razvrstila v razrede, glede na njihovo EC₅₀ vrednost (efektivna koncentracija, ki izzove 50% maksimalnega učinka), in sicer: EC₅₀ < 1 mg je zelo toksična koncentracija,

koncentracija, ki povzroči EC₅₀ med 1 – 10 mg/l je toksična ter koncentracija, ki povzroči EC₅₀ med 10 – 100 mg/l škodljiva. Na podlagi te direktive so s študijo določili, da sta citostatika CP in 5-FU zelo toksična, citarabin in deksorubicin sta toksična ter gemcitabin in ET škodljiva za vodne organizme (Zounková s sod., 2007; Zounková s sod., 2010).

Po drugi strani, Mednarodna agencija za raziskavo raka (IARC angl. International Agency for Research on Cancer) klasificira citostatik ET kot rakotvoren za ljudi (skupina 1), CP in IM kot verjetno rakotvorna (skupina 2A), medtem ko 5-FU še ni klasificiran kot rakotvoren za ljudi (skupina 3) (IARC, 2013).

Ne glede na te podatke, 5-FU se v terapiji uporablja v zelo visokih koncentracijah (400 – 500 mg/m²), zato je njegova koncentracija v odpadnih vodah visoka in posledično je tudi zelo toksičen za vodne organizme (Zounková in sod., 2007).

Potencialno genotoksično delovanje izbranih citostatikov smo ugotavljali tudi z analizo dvoverižnih prelomov s pretočno citometrijo, vendar samo na celicah HepG2, saj se primarna monoklonska IgG₁ protitelesa proti γ-H2AX na celice ZFL niso vezala. Rezultati so pokazali, da so vsi citostatiki, z izjemo IM, povzročil DSBs. Razlogi za ne-genotoksičnost IM so verjetno podobni, kot pri testu mikrojeder.

DSBs so zgodnji pokazatelji poškodb DNA, saj jih lahko dokažemo že po nekaj urni izpostavljenosti genotoksičnemu dejavniku (Bonner in sod., 2008). Meritev prisotnosti žarišč γ-H2AX velja za zelo občutljivo metodo ugotavljanja DSBs - po nekaterih navedbah je ta metoda 100x bolj občutljiva od drugih metod (Kuo in Yang, 2008). Uporablja se tudi za ugotavljanje uspešnosti terapije za zdravljenje raka, saj se normalne celice odzovejo popolnoma drugače, kot pa tumorske (Bonner in sod., 2008). Znano je, da radioterapija, kemoterapija (Rothkamm in Horn, 2009) ter citostatiki CP, ET, gemcitabin, doksorubicin, bleomicin, tirapazamin (Kuo in Yang, 2008) ter IM (Bonner in sod., 2008) povzročajo žarišča γ-H2AX oziroma DSBs. Po uporabi radioterapije, kot enemu izmed načinov zdravljenja raka, preverjajo ali je prišlo do nastanka žarišč γ-H2AX in kakšna količina je le-teh. Na osnovi tega lahko določijo intenziteto radioterapije. Pomen meritev žarišč γ-H2AX je lahko celo v usmeritvi terapije na točno določene celice ter v prilagoditvi oziroma zmanjšanju doze in pogostosti terapije (Kou in Yang, 2008). γ-H2AX se uporablja tudi pri testiranju novih zdravil za zdravljenje raka, tako pri modelnih organizmih kot pacientih (Bonner in sod., 2008; Kuo in Yang, 2008).

V magistrski nalogi smo ugotovili, da izbrani citostatki delujejo genotoksično na bakterije *S. typhimurium*, celice HepG2 in ZFL, vendar se moramo zavedati, da so celice HepG2 rakave celice in ne normalne, kot celice ZFL. Pomankljivost uporabe rakavih celic je v tem, da pridobljenih rezultatov ne moremo neposredno posplošiti na ljudi. Prav tako, ne moremo z dobljenimi rezultati ocenjevati tveganja za razvoj rakavih in drugih bolezni pri ljudeh. Vendar *in vitro* testi, ki smo jih uporabili in rakave celice imajo tudi svoje prednosti, saj tako lahko ugotovimo potencialno ogroženost zdravja.

Predvideva se, da se bo uporaba citostatikov in s tem tudi njihova vsebnost v okolju povečala. S tem se povečuje tudi tveganje, ki ga uporaba citostatikov s seboj prinaša. Zaradi tega je nujno potrebno še bolj poglobiti raziskave načinov odstranjevanja citostatikov iz odpadnih voda, kot tudi iskati nove načine nadgradnje čistilnih naprav, ki bi pri odstranjevanju citostatikov bile še bolj učinkovite. Zelo pomembna je tudi uporaba različnih testov, katerih občutljivost in specifičnost se dopolnjujeta ter različnih testnih sistemov, s katerimi bi lahko čim bolje predvidevali potencialni genotoksični učinek citostatikov na ljudi in ostale organizme v okolju. Rezultati naše raziskave pa bodo pomembno pripomogle k izpopolnjevanju splošnega znanja o škodljivosti citostatikov, kar je pomembno za ocenjevanje tveganj in načrtovanje ustreznih preventivnih ukrepov pri izpostavljenosti ljudi.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov smo oblikovali naslednje sklepe:

- Pri Amesovem testu je CP pri testiranih koncentracijah na bakteriji *Salmonella typhimurium*, pri sevu TA98 povzročil mutacijo-1 premika bralnega okvirja ter pri sevu TA100 zamenjavo baznih parov leucina (GAG/CTC) s prolinom (GGG/CCC). Citostatiki ET, IM in 5-FU pa niso delovali mutageno na bakterijo *S. typhimurium*, seva TA98 in TA100, saj niso povzročili nastanka induciranih revertant.
- S testom mikrojeder smo ugotovili, da citostatiki CP, ET in 5-FU delujejo genotoksično na celice HepG2, saj so povzročili statistično značilno povečanje števila celic z MNs, NPBs in NBUDs, prav tako so delovali tudi citostatično, saj so povzročili zmanjšanje NDI. IM pri nobeni testirani koncentraciji ni deloval genotoksično.
- S testom mikrojeder smo prav tako ugotovili, da citostatiki CP, ET, IM in 5-FU delujejo genotoksično na celice ZFL, saj so povzročili statistično značilno povečanje števila celic z MNs, NPBs in NBUDs. Izbrani citostatiki so v preizkušenih koncentracijah delovali prav tako citostatično na celice ZFL, saj je prišlo do zmanjšanja NDI.
- Z analizo dvoverižnih prelomov s pretočno citometrijo smo ugotovili, da citostatiki CP, ET in 5-FU delujejo genotoksično na celice HepG2, saj so vplivali na nastanek žarišč γ -H2AX, katerih število je sorazmerno s številom DSBs v razmerju 1:1. IM tudi v tem primeru ni deloval genotoksično. Pri celicah ZFL z izbrano metodo nismo mogli ugotoviti genotoksičnosti izbranih citostatikov, saj se primarna monoklonska IgG₁ protitelesa proti γ -H2AX niso vezala na celice.

Na podlagi navedenih sklepov smo z Amesovim testom potrdili genotoksično delovanje citostatika CP na bakterije *S. typhimurium*, med tem ko ostali citostatiki niso delovali genotoksično. S tem smo potrdili zastavljeni hipotezo, da izbrani citostatiki delujejo genotoksično na bakterije *S. typhimurium*.

Prav tako smo potrdili zastavljeni hipotezo, da pri izpostavitvi celic HepG2 in ZFL netoksičnim koncentracijam citostatikov CP, ET, IM in 5-FU, le-ti delujejo genotoksično - vplivajo na nastanek MNs, NPBs, NBUDs in na nastanek žarišč γ H2AX.

6 POVZETEK

Zaradi hitrega in nezdravega načina življenja število bolezni v razvitem svetu narašča. S tem narašča tudi uporaba farmacevtskih izdelkov, med drugim tudi citostatikov, ki jih uporabljam za zdravljenje raka. Z bolnišničnimi odpadnimi vodami in izločki (urinom in blatom) citostatiki zaidejo v okolje, kjer se načeloma nahajajo v nizkih koncentracijah ($\mu\text{g/l}$ ali ng/l). Odstranjevanje citostatikov in njihovih metabolitov v čistilnih napravah večinoma ni uspešno, tako da le-ti nespremenjeni zaidejo v okolje, predvsem v površinske vode (reke, jezera, morja) in podtalnico. Kljub nizkim koncentracijam v okolju, so citostatiki genotoksični, citotoksični in teratogeni za okoljske organizme. Citostatiki so v okolju zelo obstojni in iz čistilnih naprav večinoma izhajajo nespremenjeni. Vzrok za to so različne kemijske značilnosti, slaba biorazgradnja in absorpcija v aktivno blato čistilnih naprav.

Genotoksično delovanje izbranih citostatikov smo najprej ugotavljali z Amesovim testom na bakteriji *Salmonella typhimurium*, seva TA98 in TA100. Ugotovili smo, da je le citostatik cisplatin deloval mutageno.

Nadaljevali smo s testom mikrojeder, kjer smo ugotavljali ali citostatiki povečajo nastanek mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov, jedrnih brstov ter ali zmanjšajo delitveni indeks celice. Ugotovili smo, da so citostatiki cisplatin, etopozid in 5-fluorouracil pri celicah HepG2 povečali število mikrojeder, nukleoplazmatskih mostičkov, jedrnih brstov ter zmanjšali delitveni indeks celic, medtem ko imatinib mezilat pri nobeni koncentraciji ni deloval genotoksično. Celice ZFL so se pokazale kot bolj občutljive v primerjavi s celicami HepG2, saj so v tem primeru vsi citostatiki delovali genotoksično.

V zadnjem delu magistrske naloge smo z analizo dvočlenih prelomov s pretočno citometrijo preverjali ali citostatiki povzročajo nastanek žarišč γ -H2AX, katerih število je sorazmerno z dvočlenimi prelomi DNA. Genotoksičnost smo preverili samo na celicah HepG2, saj se primarna monoklonska IgG₁ protitelesa proti γ -H2AX niso vezala na celice ZFL. Vsi citostatiki, razen imatinib mezilata, so delovali genotoksično.

Naši rezultati so pokazali, da uporabljeni citostatiki na bakterije, človeške in ribje jetrne celice delujejo genotoksično v nizkih koncentracijah, podobnih predvidenim okoljskim koncentracijam. Zato so potrebne nadaljne raziskave škodljivega delovanja citostatikov na drugih testnih organizmih *in vitro* kot tudi *in vivo*. Prav tako je pomembno razvijati naprej učinkovite načine odstranjevanja citostatikov iz odpadnih voda, saj le z interdisciplinarnimi ukrepi lahko zmanjšamo tveganje in načrtujemo ustrezne preventivne ukrepe pri izpostavljenosti ljudi.

7 VIRI

Aden D. P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B.B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282: 615-616

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2003. Essential cell biology. 2nd ed. New York, Garland Science: 726-737

Antunović B., Barlow S., Chesson A., Flynn A., Hardy A., Jeger M.J., Knaap A., Kuiper H., Larsen J.C., Lovell D., Noerrung B., Pratt I., Rietjens I., Schlatter J., Silano V., Smulders F., Vannier P. 2011. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9: 2379, doi: 10.2903/j.efsa2011.2379: str. 69

Bromberg K.D., Burgin A.B., Osherooff N. 2003. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II α . *Journal of Biological Chemistry*, 9: 7406-7412

Buerge I., Buser H.R., Poiger T., Muller M.D. 2006. Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. *Environmental Science & Technology*, 40: 7242-7250

Castro M.A., Miguel del Corral J.M., Gordaliza M., Go'mez-Zurita M.A., Luz de la Puente M., Betancur-Galvis L.A., Sierra J., San Feliciano A. 2003. Synthesis, cytotoxicity and antiviral activity of podophyllotoxin analogues modified in the E-ring. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38: 899- 911

Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7: 3-18

Chowdhury D., Keogh M.C., Ishii H, Peterson C.L., Buratowski S., Lieberman J. 2005. γ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular Cell*, 20: 801-809

Claxton L.D., Stewart-Houk V., Warren S. 2001. Methods for the spiral *Salmonella* mutagenicity assays incuding specialized applications. *Mutation Research*, 488: 241-257

Eastmond D.A., Hartwig A., Anderson D., Anwar W.A., Cimino M.C., Dobrev I., Douglas G.R., Nohmi T., Phillips D.H., Carolyn Vickers C. 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*, 24: 341-349

Falck K., Grohn P., Sorsa M. 1979. Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. Lancet, 1: 1250-1251

Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1: 35-44

Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455: 81-95

Fenech M., Crott J. W. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutation Research, 504: 131–136

Fenech M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols, 5: 1084-104

Filipič M. 2004. Genotoksične snovi v vodovodni in embalirani vodi: ali se jim lahko popolnoma izognemo. V: Strokovno posvetovanje. Kakovost vodovodne in embalirane pitne vode. Pitne vode '04, Ljubljana, 24.-26.2004. Komac M. (ur.). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 93-101

Folkman J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nature Reviews. Drug Discovery, 6: 273-286

Ghosh C., Zhou Y.L., Collodi P. 1994. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. Cell Biology and Toxicology, 10: 167-176

Han R., Yang Y.M., Dietrich J., Luebke A., Mayer-Pröschel M., Noble M.. 2008. Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system. Journal of Biology, 7:12, doi: 10.1186/jbiol69: str.22

Harper B.W., Anwen M., Krause-Heuer A.M., Grant M.P., Manohar M., Garbutcheon-Singh K.B., Aldrich-Wright J.R. 2010. Advances in Platinum Chemotherapeutics. Chemistry, 16: 7064 – 7077

IARC. 2013. Agents classified by the IARC monographs. Pariz, International Agency for Research on Cancer, 33 str.

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (marec, 2013)

Ishihara Y., Matsunaga K., Iijima H., Hasegawa G., Suzuki T., Sato A., Kobayashi T., Yang M., Hoffman R.M. 2010. The combination of 5-FU, leucovorin and CPT-11 (FOLFIRI) prolongs survival through inhibition of metastasis in an orthotopic model of colon cancer. Anticancer Research. 30: 403-8

IVZ. 2013. L – zdravila z delovanjem na novotvorbe in imunomodulatorji. Ljubljana,
Inštitut za varovanje zdravja: 4 str.

http://www.ivz.si/register/RZ_ATCL.HTM (marec, 2013)

Johnson A.C., Jürgens M.D., Williams R.J., Kümmerer K., Kortenkamp A., Sumpter J.P. 2007. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. Journal of Hydrology, 348: 167– 175

Knasmüller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W.W., Hoelzl C., Bichler J., Majer BJ. 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. Toxicology, 198: 315–328

Kopjar N., Želježić D., Kašuba V., Rozgaj R. 2010. Antineoplastični lijekovi kao čimbenik rizika u radnom okolišu: mehanizmi djelovanja na razini stanice i pregled metoda za odkrivanje njihovih genotoksičnih učinaka. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju, 61: 121-146

Kosjek T., Heath E. 2011. Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. Trends in Analytical Chemistry, 7: 1065–1087

Kralj E., Žakelj S., Trontelj J., Berginc K., Pajič T., Preložnik Zupan I., Černelč P., Ostanek B., Podgornik H., Marc J., Kristl A. 2012. Določanje privzema imatinibja v levkocite kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja KML. Zdravstveni vestnik, 2: 188-196

Kümmerer K. 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. Chemosphere, 45: 957-969

Kuo L.J., Yang L.X. 2008. γ -H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks, In Vivo, 22: 305-309

Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 2003. 5- fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews. Cancer, 5: 330-8

Maron D.M., Ames B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 113: 173–215

Maron D.M., Ames B.N. 1984. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test V: Handbook of mutagenicity test procedures. Kilbey B. J., Legator M. S., Nochols W., Ramel C. (eds.). Elsevier, Amsterdam: 93–140

Mortelmans K., Zieger E. 2000. The Ames *Salmonella* microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455: 29-60

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

Nikolaou A., Meric S., Fatta D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1225–1234

Novaković S., Hočevar M., Novaković B.J., Strojan P., Žgajnar J. 2009. Onkologija-raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. 1. izd. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 425 str.

Obreza A. 2009. Sintezne zdravilne učinkovine v onkologiji. *Farmacevtski vestnik*, Strokovno glasilo slovenske farmacije, 60, 2: 40-60

Pabla N., Huang S., Mi Q. S., Daniel R., Dong Z. 2008. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 6572-6583

Rošker P. 2011. Vpliv imatinib mesylata na delovanje tirozin kinaz rakastih celic pri kronični mieloični levkemiji. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 55 str.

Rothkamm K., Horn S. 2009. γ -H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Annali dell`Instituto Superiore di Sanita*, 45: 265-271

Savage D.G., Antman K.H. 2002. Imatinibe mesylate: A new oral targeted therapy. *New England Journal of Medicine*, 9: 683-693

Serša G. 2009. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. *Farmacevtski vestnik*, Strokovno glasilo slovenske farmacije, 60, 2: 43-47

Straub J.O. 2010. Combined environmental risk assessment for 5-fluorouracil and capecitabine in Europe. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6, Suppl 1: 540-566

Tabak H.H., Brunch R.L. 1970. Steroid hormones as water pollutants I. Metabolism of natural and synthetic ovulation inhibiting hormones by micro-organism of activated-sludge and primary settled sludge. *Developments in Industrial Microbiology*, 11: 367-376

Zounková R., Odráška P., Doležalová L., Hilscherová K., Maršálek B., Bláha L. 2007. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 2208-2214

Zounkova R., Kovalova L., Blaha L., Dott W. 2010. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. *Chemosphere*, 2: 253-260

Žegura B., Health E., Černoša A., Filipič M. 2006. Toxicity and genotoxicity studies of surface and waste water samples using a bacterial SOS/umu test and mammalian MTT and comet assay. V: Environmental toxicology: 1st international conference on environmental toxicology, 11-16 September 2006, Mykonos, Greece, Kungolos A. G. (ed.). Southampton, Boston, WITPress: 159-168

Quillardet P., Hofnung M. 1993. The SOS chromotest: A review. *Mutation Research*, 297: 235-279

Wang D., Lippard S.J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 307-320

Wilkening S., Stahl F., Bader A. 2003. Comparison of primary hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, 31: 1035–1042

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila dr. Jani Nunić, da me je navdušila za opravljanje magistrskega dela, za prijazno in potrežljivo vodenje tekom laboratorijskega dela, za pomoč pri iskanju literature in nadaljnem usmerjanju pri pisanju naloge. Hvala tudi doc. dr. Bojani Žegura, za nasvete in pomoč pri nadalnjem laboratorijskem delu in pisanju naloge. Bojana, hvala tudi za enkratno priložnost za nadaljevanje študija. Hvala tudi prof. dr. Metki Filipič, vodji oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka na NIB-u.

Hvala mentorici prof. dr. Darji Žgur Bertok, za prevzem mentorstva.

Rada bi se zahvalila tudi predsedniku komisije prof. dr. Tomu Turku in recenzentki prof. dr. Maji Čemažar, za hiter pregled naloge.

Lepo se zahvaljujem Alji Štraser za dobro voljo, pomoč v laboratoriju in številne nasvete pri analizi rezultatov. Hvala tudi ostalim, ki ste mi pomagali pri delu v laboratoriju, predvsem Matjažu. Lepa hvala tudi Ani Rotter za statistično obdelavo podatkov.

Največja zahvala gre moji družini, za vso podporo v času študija. Mami, hvala za vse spodbude in nasvete. Brez tebe bi bila moja življenjska in študijska pot drugačna.

PRILOGE

Priloga A: Priprava 0.1 % tripsina za celice HepG2.

Sestavine	Za 1000 ml
Tripsin	1 g
EDTA	0.1 g
NaCl	8 g
KCl	0.4 g
Glukoza monohidrat	1 g
NaHCO₃	0.84 g

Priloga B1: Priprava minimalnega glukoznega gojišča.

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

Priloga B2: Priprava Vogel – Bonner medija (VB medij).

Sestavine	Za 500 ml
Destilirana voda	335 ml
Magnezijev sulfat (MgSO₄)	5 g
Citronska kislina monohidrat	50 g
Kalijev fosfat anhidrid (K₂HPO₄)	250 g
Natrijevamonijevfosfat (NaNH₄PO₄·4H₂O)	87.5 g

Priloga B3: Priprava 40 % glukoze

Sestavine	Za 100 ml
Destilirana voda	100 ml
Glukoza	40 g

Priloga B4: Priprava top agarja

Sestavine	Za 500 ml
Agar	3 g
NaCl	2.5 g
Destilirana voda	500 ml

Priloga B5: Priprava raztopine histidin/biotina

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

Priloga B6: Priprava hrnilnega gojišča

Sestavine	Za 500 ml
Nutrient broth N°2 oxoid Oxoid	12.5 g
Destilirana voda	500 ml

Priloga B7: Priprava fosfatnega pufera

Sestavine	Za 500 ml
0.2 M natrijev dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄·H₂O); 13.8 g/500	60 ml*
0.2 M dinatrijev hidrogen fosfat (Na₂HPO₄); 14.2 g/500 ml	500 ml*

*približni volumen raztopin