

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij biologije

Antonio Šimić

**GENOTOKSIČNI BIOMARKERI – KARAKTERISTIKE I PRIMJENA**

**GENOTOXIC BIOMARKERS – CHARACTERISTICS AND  
APPLICATION**

**Završni rad**

Mentorica: doc.dr.sc. Mirna Velki

Osijek, 2019.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Završni rad**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za biologiju**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Biologija

## **GENOTOKSIČNI BIOMARKERI – KARAKTERISTIKE I PRIMJENA**

**Antonio Šimić**

**Rad je izrađen na:** Zavod za zoologiju

**Mentorica:** dr.sc. Mirna Velki, doc.

### **Sažetak:**

Genotoksikologija objašnjava utjecaj kemijskih i fizikalnih faktora na genetski materijal koji uzrokuju nasljedne promjene (mutacije) u strukturnom integritetu genoma (mutagenost). Provedbom odgovarajućih *in silico* (računalnih), *in vitro* (na staničnim kulturama ili bakterijama) ili *in vivo* (na živim organizmima) metoda dobivaju se podaci o genotoksičnom karakteru testiranog kemijskog spoja. *In silico* tehnike istraživanja genotoksičnosti kemikalija imaju primjenu u preliminarnim istraživanjima spojeva, dok se *in vivo* i *in vitro* metode koriste u svrhu dobivanja realnih rezultata o toksičnom karakteru kemikalije. U skupinu *in silico* tehnika pripadaju računalni softveri čije se predviđanje mutagenosti temelji na već provedenim istraživanjima čiji su rezultati pohranjeni u bazama podataka. *In vitro* i *in vivo* metode koriste različite metodologije koje omogućuju ispitivanje utjecaja kemijskih spojeva na DNA od kojih su najčešće Amesov test, MLA, MN i SCGE test.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** mutacije, mutageni, oštećenja DNA, detekcija genotoksičnosti

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD****Bachelor thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Biology****Undergraduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**GENOTOXIC BIOMARKERS – CHARACTERISTICS AND APPLICATION****Antonio Šimić****Thesis performed at:** Department of zoology**Supervisor:** Mirna Velki, PhD, Asst. Prof.**Abstract:**

Genetic toxicology evaluates the impact of chemical and physical agents on genetic material which cause hereditary changes (mutations) in structural integrity of the genome (mutagenicity). Use of suitable *in silico* (computational), *in vitro* (cell cultures or bacteria) or *in vivo* (living organisms) assays gives data on the genotoxicity of tested chemical or physical agent. *In silico* methods of investigation are used in preliminary investigations of the mutagenicity of tested chemical, while *in vivo* and *in vitro* techniques give realistic results on the genotoxic character of tested chemical. Group of *in silico* methods consists of softwares whose prediction of mutagenicity is based on existing data bases. *In vitro* and *in vivo* methods use various methodologies which allow testing of the chemicals impact on the DNA. The most used *in vivo* and *in vitro* methods are Ames, MN, MLA and SCGE assay.

**Original in:** Croatian**Key words:** mutations, mutagens, DNA damage, genotoxicity detection**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

## Sadržaj:

1. Uvod .....	1
2. Mehanizmi genetičkih oštećenja i njihova detekcija.....	4
2.1. Mehanizmi genskih mutacija i detekcija .....	4
2.2. Mehanizmi kromosomskih aberacija i detekcija.....	5
3. Testovi genotoksičnosti .....	7
3.1. <i>In silico</i> metode.....	7
3.2. <i>In vitro</i> metode.....	9
3.2.1. Amesov test.....	9
3.2.2. Test mutacije TK stanica limfoma miša (MLA) .....	13
3.2.3. Mikronukleus test (MN).....	14
3.2.4. Test detekcije kromosomskih aberacija (CA) .....	15
3.2.5. Komet test (SCGE).....	17
3.3. <i>In vivo</i> metode.....	18
4. Primjena genotoksičnih biomarkera .....	21
4.1. Primjeri primjene <i>in silico</i> metoda.....	21
4.2. Primjeri primjene <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> metoda.....	22
5. Zaključak .....	25
6. Literatura .....	26

## 1. UVOD

Genetička toksikologija (genotoksikologija) objašnjava utjecaj kemijskih i fizikalnih čimbenika, na genetski materijal, odnosno deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA), koji uzrokuju promjene u strukturnom integritetu genoma (Beedanagari i sur., 2014). Genetska tvar u svih živih bića je smještena u stanicama, te kod virusa unutar proteinske ovojnice – kapside (Švob i sur., 1991). Kod eukariota, DNA je od ostatka unutarstaničnog sadržaja odvojena jezgriinom ovojnicom, koja kod prokariota izostaje. Molekule DNA su unutar jezgre kondenzirane i kompleksirane s bazičnim proteinima – histonima (H2A, H2B, H3 i H4) te daju kompleks koji se naziva kromatin koji se dodatno kondenzira u kromatidu, a dvije takve strukture daju kromosom, morfološku organizaciju nasljedne tvari (Švob i sur., 1991). Nasljedna tvar je sklona promjenama. Kvalitativne i kvantitativne promjene nasljedne tvari nazivaju se mutacijama. Mutacije se ugrubo dijele na (1) točkaste mutacije; (2) kromosomske aberacije (kvantitativne i kvalitativne) i (3) mutacije izazvane transpozicijom (Robinson, 2003). Ovakve promjene su česte u prirodi te kako nastaju, tako se i uklanjaju mehanizmima popravaka DNA koji su prisutni u svim stanicama (Stryer, 2013). Međutim, ukoliko oštećenje postane preveliko za mehanizme popravka, lezije se akumuliraju što za posljedicu može imati niz ishoda, od bezazlenih mutacija (nema promjene u fenotipu), pa sve do apoptoze (programirane smrti stanica), te u nekim slučajevima i do izmijenjene (degenerirane) stanične diobe i proliferacije što može dovesti do karcinogeneze (Guyton i Hall, 2012). Sa stanične razine nastanak raka može se promatrati kao proces koji se sastoji od više koraka i uključuje mutacije i selekciju stanica sa sve izraženijim mogućnostima proliferacije, preživljavanja, širenja i metastaziranja. Smatra se da je prvi korak u ovom procesu, inicijacija, rezultat genetičke promjene koja dovodi do abnormalne proliferacije jedne jedine stanice (Cooper, 2004). U inicijacijskom se koraku, karcinogen, ili njegov aktivirani metabolit, kovalentno veže za DNA formirajući DNA adukt koji se može ili popraviti, ili fiksirati kao mutacija, vodeći do nasljedne promjene u DNA sekvenci (Beedanagari i sur., 2014). Drugi korak u nastanku raka je promocija, nakon čega slijedi progresija koja se nastavlja nakupljanjem dodatnih mutacija u populaciji tumorskih stanica. Genotoksikologija koristi mnoštvo *in silico*, *in vitro* i *in vivo* testova za evaluaciju oštećenja DNA uzrokovanih raznim stresorima<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Kemijski i fizikalni agensi koji oštećuju molekulu DNA putem umetanja unutar polinukleotidne sekvence ili epigenetičkim mehanizmima.

Genotoksikologija objedinjuje proučavanje različitih ishoda oštećenja DNA uključujući mutagenost, klastogenost i aneugenost. Mutagenost se odnosi na sposobnost agensa da izmjeni nukleotidnu sekvencu DNA (Beedanagari i sur., 2014). Glavna karakteristika mutacija je nasljednost i upravo zahvaljujući tom svojstvu, mutacije mogu biti dugotrajne, odnosno mogu imati dugoročan efekt na zdravlje stanice, tkiva, ili čak cijelog organizma zahvaćenog mutacijom (Beedanagari i sur., 2014). Većina mutacija koje nastaju prirodno se nalaze u regijama DNA koje ne kodiraju za sintezu proteina, niti sudjeluju u regulaciji ekspresije gena, pa nastanak mutacija na takvim mjestima nema nikakav učinak na organizam (Beedanagari i sur., 2014). Jednako tako, mutacija može nastati i u kodirajućoj ili regulatornoj regiji DNA koje mogu dovesti do alternacija u ekspresiji gena ili čak formiranja nefunkcionalnih ili izmijenjenih proteina i enzima, utječući na taj način i na fiziologiju same stanice (Beedanagari i sur., 2014). Točkaste mutacije su male izmjene u sekvenci DNA unutar gena, a u ovu kategoriju pripadaju supstitucije, transverzije, insercije i delecije jedne ili više baza (Robinson, 2003). Klastogene i aneugene mutacije obuhvaćaju strukturalne (kvalitativne) kromosomske aberacije koje se odnose na „kidanje“ strukture kromosoma, pri čemu dolazi do translokacija i izmjene čitavih krakova kromosoma i kvantitativne (numeričke) aberacije kod kojih dolazi do promjene broja kromosoma. Promjene broja setova kromosoma se jednom riječju nazivaju poliploidije. Mutacije uzrokovane transpozicijom se odnose na umetanje transpozona (segmenta DNA koji se mogu spontano premješati s jednog mjesta na drugo unutar DNA) unutar kodirajućih ili regulatornih sljedova DNA molekule (Robinson, 2003).

Postoji niz *in silico*, *in vitro* i *in vivo* tehnika koje se koriste za predviđanje jednog od tri tipa genotoksikološkog oštećenja: mutagenost, klastogenost i aneugenost (Beedanagari i sur., 2014). *In vitro* testovi su općenito dizajnirani kako bi ponudili visoku osjetljivost za oštećenja DNA uzrokovana kemijskim agensima. Visoka osjetljivost *in vitro* testova često dovodi i do smanjivanja specifičnosti karcinogenog potencijala ispitane kemikalije. *In vivo* testovi, s druge strane, imaju visoku specifičnost, ali nisku stopu osjetljivosti na koncentraciju kemikalije ispitane na karcinogeni potencijal (Beedanagari i sur., 2014). Zbog toga, kako bi se maksimizirale specifičnost i osjetljivost u detekciji oštećenja DNA, koriste se kombinacije *in vivo* i *in vitro* testova u takozvanom „battery“ pristupu (engl. *battery approach*) koji pokazuju specifičnost i senzibilnost i do ~85-90% (Kirkland i sur., 2005). Otkrivanje mutagenosti i karcinogenosti spojeva u genotoksikologiji se zasniva na razumijevanju mehanizama mutacija na molekularnoj, staničnoj, tkivnoj i sustavnoj razini,

te na razini organizma (Sycheva i sur., 2012). U svrhu otkrivanja takvih mehanizama, u istraživanjima se koriste genotoksični biomarkeri.

Biomarkeri se mogu općenito definirati kao indikatori signalnih događaja između bioloških sustava (uzoraka) i mjerljivih fizikalnih, kemijskih ili okolišnih čimbenika na molekularnim, biokemijskim, staničnim, fiziološkim, patološkim ili bihevioralnim razinama (Gupta, 2014).

Biomarkeri imaju široku primjenu u mnogim granama toksikologije, a pogotovo u područjima koji se bave proučavanjem djelovanja pesticida, mikotoksina, lijekova i metala (Gupta, 2014). U području toksikologije, biomarkeri se dijele na (1) biomarkere izloženosti (koriste se kod procjene količine kemijske tvari u tijelu); (2) biomarkere vjerojatnosti (čimbenici su koji neke jedinice čine osjetljivijima na izloženost kemijskim spojevima, a uključuju genetske faktore koji bi mogli utjecati na interakciju organizma i kemijskog spoja); (3) biomarkere učinka (indikatori su promjene u biološkoj funkciji kao odgovora na izloženost nekom kemijskom spoju) (EPA<sup>2</sup>, 2014).

Proučavanje biomarkera ima brojne prednosti: potvrđuju apsorpciju u organizam; mjere integriranu izloženost iz svih izvora; mogu se detektirati u jako niskim koncentracijama; služe za validaciju modela izloženosti kad predviđene doze odgovaraju izmjerenima; pomažu u praćenju izloženosti kad se pojedinci (ili grupa) prate tijekom vremena; pomažu u procjeni javnozdravstvenih intervencija gdje se može pratiti smanjenje izloženosti tijekom vremena (WHO<sup>3</sup>, 2011). Osim prednosti, imaju i nedostatke: ne mogu definirati toksičnu dozu; osjetljivi su na lošu laboratorijsku analizu; nedostatak referentnih vrijednosti; nedostatak toksikoloških i epidemioloških informacija o većini kemijskih spojeva (WHO, 2011).

Biomarkeri su korisni kad se pomoću njih može otkriti izloženost nekom čimbeniku, ali se za to mora koristiti pouzdana, točna i reproducibilna analitička tehnologija. Upotreba biomarkera u istraživanjima vezanima za procjenu izloženosti je dosta nova i još uvijek se razvijaju najbolje metode za njihovo korištenje. Glavni izazov je određivanje povezanosti između izmjerene razine markera i relevantnih kliničkih nalaza (Brljak, 2014).

---

<sup>2</sup> United States Environmental Protection Agency – Agencija za zaštitu okoliša

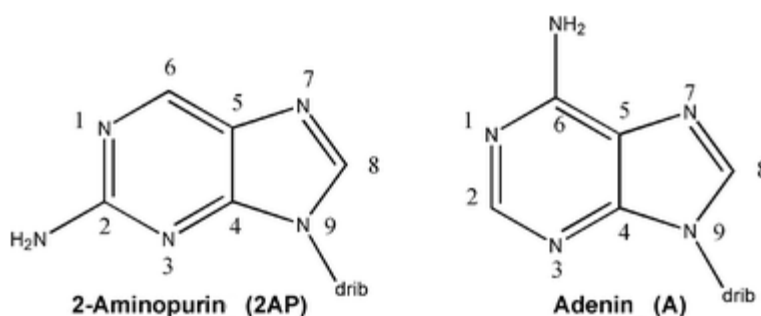
<sup>3</sup> World Health Organization – Svjetska zdravstvena organizacija

## 2. MEHANIZMI GENETIČKIH OŠTEĆENJA I NJIHOVA DETEKCIJA

Promjene koje su nastale na višoj razini (stanice, tkiva, organi, sustavi, organizam) su se pojavile kao posljedice promjena na molekularnim razinama (mutacije, kromosomske aberacije) koje se mogu detektirati pomoću različitih biomarkera. (Beedanagari i sur., 2014).

### 2.1. Mehanizmi genskih mutacija i detekcija

U uvodu je već naznačena definicija mutacija kao trajnih promjena u (kodirajućim ili nekodirajućim) regijama DNA, koje mogu biti korisne, neznčajne ili štetne za stanicu. Mutacije u kodirajućim regijama DNA uzrokuju kaskadu reakcija koje mogu imati utjecaja na stanične procese kao što su replikacija, transkripcija ili translacija, što može kao krajnji rezultat imati i apoptozu (staničnu smrt) (Beedanagari i sur., 2014). Izvori mutacija su razni: nuklearna radijacija, izloženost UV svjetlu, izloženost kemijskim mutagenima te pogreške tijekom procesa replikacije ili transkripcije, a veliki broj njih nastaje konstantno, ali zahvaljavući sofisticiranim mehanizmima popravka DNA, uspješno se i uklanjaju, no i sami mehanizmi popravka imaju granice, stoga su ponekad i nedostatni za učinkovit popravak nastalog oštećenja (Beedanagari i sur., 2014). Kemijski mutageni, kao što je naprimjer 2-amino purin, imaju kemijsku strukturu koja nalikuje strukturi dušične baze adenina (Slika 1) te su sposobni ugraditi se u DNA tijekom replikacije kao interkalatni agens koji može uzrokovati razmatanje dvostruke DNA uzvojnice što kao posljedicu ima inhibiciju mehanizama uključenih u replikaciju i transkripciju (Beedanagari i sur., 2014).



Slika 1: Usporedba kemijske strukture 2-aminopurina (2AP) i adenina (A). (Izvor: WEB2)

Postoje i brojni drugi analozi dušičnih baza koji imaju sličan učinak na replikacijski, transkripcijski ili translacijski aparat, stoga je provođenje testa na mutacije ključan i prvi korak u identifikaciji potencijala genotoksičnosti ili karcinogenosti (Beedanagari i sur., 2014). Amesov test (detaljnije objašnjen u nastavku) je jedan od inicijalnih testova koji se



koristi u svrhu predviđanja mutagenosti spojeva, iako nije nužno da su sve kemikalije okarakterizirane kao mutagene u ovom testu i karcinogene. Kemijski spojevi koji sadrže nitratnu funkcionalnu skupinu pokazuju mutagenost u Amesovom testu jer nitratne čestice generiraju signalnu molekulu NO (dušikov monoksid), koja je sveprisutna u višim eukariotskim organizmima kao parakrini signalizator (Beedanagari i sur., 2014; Cooper, 2004). Azidne soli se, također, često koriste u istraživanjima mutagenosti, pa se tako natrijev azid koristi kao pozitivna kontrola kod sojeva *Salmonella typhimurium* TA100 i TA1535 (Tablica 2). Natrijev azid, u ovakvim slučajevima revertira ispitane bakterijske kolonije u divlji tip inducirajući točkaste mutacije u GC baznim parovima (Mortelmans i Zeiger, 2000). Mutacija se događa u regiji *hisG46* markera u kojem dolazi do promjene u tripletu GAG/CTC u GGG/CCC što dovodi do zamjene aminokiseline leucin s prolinom (Beedanagari i sur., 2014). Ovakvi događaji su omogućeni djelovanjem bakterijskog enzima O-acetilserin(tio)liaze koja konvertira molekulu natrijevog azida u mutageni spoj azidoalanin (L-cistein) (Beedanagari i sur., 2014). S obzirom da viši organizmi nemaju konverzijski enzim, rezultati ispitivanja toksičnosti natrijevog azida na sisavcima su bili negativni, dok je mutagenost potvrđena kod jedinki *Drosophila*. Danas je natrijev azid široko rasprostranjen u proizvodnji pesticida i herbicida (Sadiq i Owais, 2000). Drugi primjer pozitivno mutagenog spoja u Amesovom testu je 2-nitrofluoren (Beedanagari i sur., 2014). 2-nitrofluoren se prevodi u N-hidroksi-2-amino-fluoren djelovanjem nitroreduktaze, a tijekom ove pretvorbe formira se prijelazni oblik hidroksilamin koji se reakcijom esterifikacije prevodi u elektrofil koji ima veliku tendenciju vezanja negativno nabijene molekule DNA (Beedanagari i sur., 2014). 2-nitrofluoren pomiče okvir čitanja blizu sekvence -C-G-C-G-C-G-C-G- što dovodi do revertiranja ovih bakterija u divlji tip (Beedanagari i sur., 2014; Mortelmans i Zeiger, 2000). Osim navedenih nitroznih derivata, i brojni aromatski spojevi s nitro-skupinom uzrokuju *frameshift* mutacije (kao naprimjer, 4-nitro-*o*-fenilendiamin) (Beedanagari i sur., 2014).

## 2.2. Mehanizmi kromosomskih aberacija i detekcija

Kako bi se dobio ispravan uvid o mutagenosti ili karcinogenosti nekog spoja, potrebno je prikupiti informacije o 3 tipa genetskog oštećenja: genske mutacije (Amesov test), promjene u strukturi kromosoma (klastogenost) i promjene u broju kromosoma (aneugenost) (Beedanagari i sur., 2014). Klastogen je kemijski spoj koji uzrokuje oštećenje strukture kromosoma što dovodi do delecije, adicije ili reorganizacije regija kromosoma

(Beedanagari i sur., 2014). Djelovanje klastogenih kemikalija se očituje, u većini slučajeva tijekom metafaze staničnog ciklusa kada se mogu lako detektirati lomovi u strukturi kromosoma ili translokacije pojedinih regija putem formiranja mikronukleusa ili testiranja kromosomskih aberacija (Beedanagari i sur., 2014). Spojevi kao što su mitomycin C, kadmijev klorid i 5-fluorouracil djeluju direktno na DNA (direktni klastogeni), dok neki djeluju i indirektno, putem intermedijera (indirektni klastogeni), kao što su benz-[a]-piren i 2-aminoantracen i svima je mutagenost utvrđena provođenjem *in vitro* mikronukleus testa (MN) (Shi i sur., 2010). Primjenom *in vivo* MN testa, utvrđena je klastogenost citotoksičnih terapeutika za rak, od kojih je značajan ciklofosfamid, čije je djelovanje omogućeno putem intermedijera fosforamid-mustard koji nastaje u stanicama u kojima je smanjena koncentracija aldehyd-dehidrogenaze. Fosforamid-mustard formira unakrsne poveznice između dvije, i unutar jedne molekule DNA na N-7 poziciji gvanina, što je ireverzibilno te dovodi do zaustavljanja replikacijskih procesa i apoptoze (Beedanagari i sur., 2014). *In vivo* MN test je dao uvid u spojeve koji imaju klastogeno djelovanje i bez da se kovalentno vežu na DNA, djelujući na enzime uključene u održavanje strukture DNA (inhibitori topoizomeraza) kao što je etopozid koji se koristi kao kemoterapeutik, a djeluje na način da formira ternarni kompleks s DNA i enzimom topoizomeraza II čime je onemogućeno kondenziranje (namatanje) DNA molekule što uzrokuje jednolančane i dvolančane lomove i brojne druge pogrješke koje dovode do apoptoze tumorske stanice (Beedanagari i sur., 2014). Neki drugi poznati klastogeni su akridin žuto, etilen oksid, arsen, fosfin mimosin, vinkristin i drugi.

Spojevi s aneugenim djelovanjem su oni spojevi koji induciraju aneuploidije u stanicama putem utjecaja na diobu stanica i migraciju kromosoma tijekom diobe (Beedanagari i sur., 2014). Aneuploidija se očituje kao abnormalan broj kromosoma gledajući bilo koji homologni par kromosoma. Aneugeni, kao što su, vinkristin, vinblastin, kolhicin i nokodazol su potvrdili mutageni karakter provođenjem MN testa, a istraživanja su pokazala da navedeni spojevi utječu na brojne stanične komponente i procese kao što su sinteza i funkcioniranje diobenog vretena, aktivnost centrosoma te izazivaju modifikacije centromera (Parry i sur., 2002). Dobro proučen primjer kemijskog spoja koji uzrokuje aneuploidiju je vinkristin (inhibitor mitoze) koji se koristi kao kemoterapeutik za liječenje raka. Vinkristin veže dimere tubulina inhibirajući na taj način njihovo kompleksiranje u mikrotubule. Disrupcija formiranja mikrotubula dovodi do aresta mitoze u metafazi na taj način inhibirajući proliferaciju mutiranih stanica (Beedanagari i sur., 2014).

### 3. TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI

Postoji mnoštvo *in vitro* i *in vivo* testova genotoksičnosti koji se koriste u procjeni oštećenja DNA, međutim, globalni zahtjev za smanjenjem korištenja pokusnih životinja u istraživanjima je doveo do rapidnog napretka *in vitro* i *in silico* tehnika (Beedanagari i sur., 2014).

#### 3.1. *In silico* metode

*In silico* toksikološke tehnike su računalne tehnike koje analiziraju, simuliraju, vizualiziraju i predviđaju toksičnost kemikalije (Myatt i sur., 2018). *In silico* tehnike objedinjuju metodologije analize kemijskih i bioloških svojstava što je bazirano na kemijskoj strukturi promatranog agensa (Myatt i sur., 2018). Cilj *in silico* metoda je primjena matematičkih, statističkih, kemijskih i računalnih alata u razvoju zadovoljavajućih i učinkovitih genotoksikoloških modela predviđanja iz postojećih baza podataka (Beedanagari i sur., 2014). Ove metode nude brzo, pouzdano i ekonomično rješenje za preliminarna istraživanja velikog broja kemijskih spojeva (Beedanagari i sur., 2014). Mnogi *in silico* alati koriste poveznice između kemijske strukture i aktivnosti spoja u predviđanju toksičnosti spoja (SAR – Structure Activity Relationship) ili kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (QSAR – Quantitative Structure Activity Relationship) u kojem se koristi statistička korelacija (Marchant, 2012). *In silico* alati su podijeljeni u tri glavne kategorije: (1) baze podataka; (2) programi za virtualno pretraživanje baza; i (3) sustavi predviđanja (Beedanagari i sur., 2014). Svi alati su „upakirani“ u računalne programe (*software*). Primarni korak u *in silico* istraživanjima je pretraživanje baza podataka, s ciljem pronalaženja već postojećih rezultata (Beedanagari i sur., 2014). Baze podataka prikupljaju i skladište informacije dobivene istraživanjima iz raznih izvora. Baze podataka su ili široko dostupne (besplatne za upotrebu), ili dostupne uz nadoplatu. Sustavi predviđanja su programski sustavi koji omogućuju predviđanje strukturno-specifičnih i test-specifičnih rezultata. Ovi programi koriste različite tipove algoritama za određivanje sklonosti određenog kemijskog agensa za indukcijom genotoksičnog odgovora (Beedanagari i sur., 2014). Navedeni algoritmi se dijele u tri kategorije: (1) sustavi temeljeni na znanju (KBS<sup>4</sup>); (2) statistički sustavi i (3) modeli analogije (Beedanagari i sur., 2014). **Prediktivni sustavi temeljeni na znanju** (KBS) su fokusirani na organizaciju postojećih značajnih

---

<sup>4</sup> Knowledge-based predictive system

genotoksikoloških podataka. Ovakvi softveri uspoređuju strukture ispitivanih kemikalija s postojećim bazama podataka (najrašireniji program je Derek<sup>5</sup>). Prikaz najznačajnijih i najčešće korištenih KBS prediktivnih sustava nalazi se u Tablici 1. **Statistički sustavi** utvrđuju stopu korelacije između navoda u bazi podataka i informacija koje se unose *de novo*, a zasniva se na metodi kvantitativne poveznice strukture i aktivnosti. Strukturna jedinica zaslužna za biološku aktivnost spoja naziva se **biofor** (Beedanagari i sur., 2014). U bazama podataka postoje razni biofori, a za njihov pronalazak su zaslužni statistički sustavi. Klopman i suradnici su 1984. godine proučavali mutagenost okolišnih nitrozarena. Šest godina kasnije su statistički utvrdili jaku pozitivnu korelaciju između prisutnosti nitrozaminske skupine u aromatskim i alifatskim spojevima i pojave mutagenosti, stoga je nitrozaminska skupina biofor ovakvih spojeva. Biofori zaslužni za toksikogena svojstva se nazivaju *toksikofori* (Beedanagari i sur., 2014). Ukoliko su statističkim testom ispitane molekule koje sadrže biofore, sustav će predvidjeti mutagenost (aktivnost), a ukoliko biofor nije pronađen, molekula je inaktivna (Rosenkranz i Klopman, 1990). U računalnim toksikološkim analizama koristi se i termin „rizična struktura“ (engl. *structural alert*) koja je zaslužna za toksikološka svojstva određenog kemijskog spoja (Klopman i sur., 1984). U **sustavima baziranim na analogiji**, rezultat istraživanja djelovanja jednog spoja se koristi za određivanje djelovanja strukturno sličnog spoja, a temelji se na tehnikama QSAR i AIM<sup>6</sup> (metoda identifikacije analogije).

Tablica 1: Besplatni *in silico* alati predviđanja mutagenosti i karcinogenosti (izvor: Beedanagari i sur., 2014).

Ime softvera	Predviđanje
T.E.S.T. (Toxicity Estimation Software Tool)	Mutagenost
Lazar	Mutagenost, karcinogenost
VEGA	Mutagenost, karcinogenost
ToxTree	Mutagenost, karcinogenost
Oncologic	Karcinogenost
Derek	Mutagenost
Toolbox	Mutagen za bakterije, karcinogeni i mutageni

*In silico* tehnike danas imaju brojne primjene: (1) kao alternativa za istraživanja na životinjama; (2) analiza metabolita; (3) ekotoksikološka istraživanja; (4) selekcija u proizvodnji kemijskih proizvoda; (5) racionalizacija rezultata *in vivo* i *in vitro* testova; i

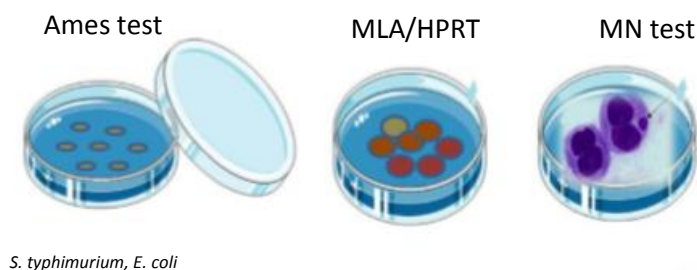
<sup>5</sup> Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge

<sup>6</sup> Analog Identification Method

brojni drugi (Myatt i sur., 2018). Iako postotak korištenja *in silico* metoda raste u raznim istraživanjima, nedostatak ovakvih istraživanja je nedovoljno jaka korelacija između softverskih pretpostavki i eksperimentalnih podataka (Beedanagari i sur., 2014).

### 3.2. *In vitro* metode

Genotoksikološka istraživanja su esencijalna u procjeni rizika za razne tipove kemikalija, uključujući farmaceutske spojeve, industrijske kemikalije, pesticide, biocide, aditive u prehrani, kozmetičke aditive i lijekove za životinje kako bi se omogućila njihova primjena bez štetnog utjecaja na zdravlje ljudi i životinja (Corvi i Madia, 2017). Općenito, procjena genotoksičnog učinka se sastoji od nekoliko faza istraživanja, od čega je prva *in silico* testiranje, nakon čega slijedi primjena kombinacije *in vitro* testova („battery approach“) (Slika 2), te na kraju (ukoliko je potrebno) *in vivo* testiranje određenog kemijskog spoja (ECVAM<sup>7</sup>, 2013). Danas postoji mnoštvo *in vitro* metoda određivanja genotoksičnog karaktera nekog spoja, no, i dalje se ne mogu smatrati adekvatnom zamjenom za *in vivo* testove. U proteklom desetljeću, provedeni su brojni projekti s ciljem optimizacije *in vitro* protokola s naglaskom na redukciju „lažno“ pozitivnih rezultata koji bi implicirali nužno korištenje *in vivo* testova (Corvi i Madia, 2017).



Slika 2: Prikaz najčešće korištene kombinacije *in vitro* testova: Ames test; MLA/HPRT<sup>8</sup> i MN<sup>9</sup> test (koji se mogu provesti i *in vitro*, i *in vivo*) (izvor: Corvi i Madia, 2017)

#### 3.2.1. Amesov test

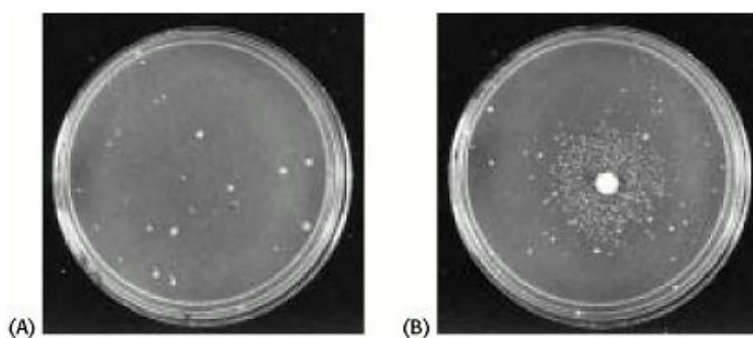
Amesov test je oblik testa koji mjeri formiranje revertiranih bakterijskih kolonija; ime je dobio po znanstveniku (Bruce Ames) koji je prvi identificirao i ukazao na korisnost

<sup>7</sup> European Centre for the Validation of Alternative Methods

<sup>8</sup> MLA/HPRT –Mouse Lymphoma Assay/Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase

<sup>9</sup> MN – Micronucleus test

ovakvog istraživanja u detekciji mutacija, 1974. godine (Beedanagari i sur., 2014). Bruce Ames je u svom eksperimentu stvorio soj genetički modificiranih bakterija *Salmonella typhimurium* s mutacijama na tripletu za sintezu aminokiseline histidina, pa su zbog toga ove kolonije za rast zahtijevale vanjski izvor histidina (hranjivi medij obogaćen ovom aminokiselinom). U Amesovom testu, genetski modificirane auktotrofne bakterije su tretirane s testiranom kemikalijom. Hranjiva podloga (agar) na kojoj su bakterijske kolonije rasle nije sadržavala histidin, pa su jedino bakterije, koje su povratno mutirale lokus za sintezu histidina u divlji tip, mogle na njoj rasti (Beedanagari i sur., 2014). Povećanje broja naraslih revertiranih kolonija na selektivnoj hranjivoj podlozi (bez histidina) se povezuje s mutagenim svojstvima spoja kojim su bakterije tretirane (Slika 3) (Beedanagari i sur., 2014).



Slika 3: (A) Petrijeva zdjelica s hranjivim agarom, na koji su nanešene bakterije *S. typhimurium* koje ne mogu sintetizirati histidin; (B) Petrijeva zdjelica s diskom filtrirnog papira u središtu, na koji je nanešen mutagen, taj mutagen potiče pojavu velikoga broja revertanata koji ne mogu sintetizirati histidin. Nakon dva dana revertanti se pojavljuju oko diska u obliku prstena kolonija. (Izvor: Stryer, 2013)

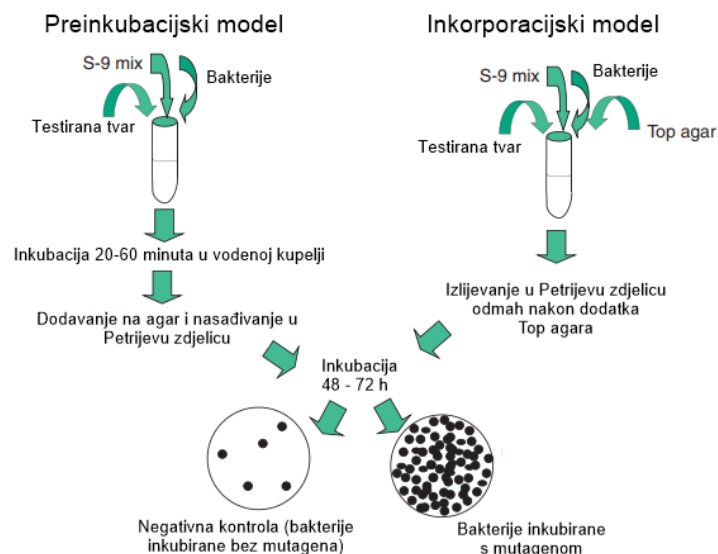
Amesov test je najčešće korišten inicijalni test u genotoksikološkim istraživanjima, prvenstveno zbog svoje točnosti (Guy, 2014a). Spojevi, koji su u Amesovom testu dali pozitivan rezultat, su, uglavnom, svoju mutagenost potvrdili i u *in vivo* testovima na miševima koji su se koristili radi mjerenja karcinogenog potencijala spoja (Beedanagari i sur., 2014). Smatra se zlatnim standardom u predviđanju karcinogenosti za ljude (s točnošću od 65%) (Kirkland i sur., 2005). U izvođenju Amesovog testa mogu se koristiti razni sojevi bakterija. Korištenjem *Salmonella typhimurium* detektira se supstitucija i pomak okvira čitanja („frame-shift“) u GC parovima baza, dok se korištenjem bakterija *Escherichia coli* otkrivaju oštećenja u AT dinukleotidima (Beedanagari i sur., 2014). Sve *S. typhimurium* bakterije imaju dodatne mutacije *rfa* i *uvrB* gena. Mutacija na *rfa* genu je zaslužna za

inaktivaciju enzima ključnog u sintezi dijela lipopolisaharidnog sloja stanične stijenke, što povećava permeabilnost stijenke za kemijske agense; a mutacija na *uvrB* genu uzrokuje inaktivaciju proteina ključnog u mehanizmu ekscizijskog popravka DNA što čini ovakve bakterije osjetljivima na mutacije (Guy, 2014a). Može se reći da se bakterije korištene u Amesovom testu dodatno genetski modificiraju kako bi postale osjetljivije na mutacije. Prikaz najčešće korištenih mutiranih sojeva bakterija u Ames testu je u Tablici 2.

Tablica 2: Svi prikazani sojevi su derivirani od *S. typhimurium* LT2. hisD6610 sojevi su osjetljiviji na reverziju pataknutu *frameshift* mutagenom od hisC3076. hisO1242: TA97 i TA97a dodatno sadrže mutaciju na operatoru hisO1242. hisD3052: mutacija u *hisD* regiji koja kodira za histidinol dehidrogenazu. hisG46: mutacija na *hisG* genu koji kodira za sintezu prvog enzima u biosintezi histidina. hisG428: TA012 i TA014 sadrže A-T bazne parove na krajevima mutiranih regija u *hisG* području, za razliku od TA100 i TA1535 koji u tim regijama sadrže G-C parove. *rfa*-mutacija koja uzrokuje permeabilnost stanične stijenke. *uvrB*-delecija u genu za sintezu proteina uključenog u ekscizijski popravak DNA. pKM101, pQA1: plazmidi koji povećavaju kemijski induciranu i spontanu mutagenezu povećanjem podložnosti sustava za popravak DNA pogriješcima. R-rezistentan, O-osjetljiv. (Izvor: Föllmann i sur., 2013)

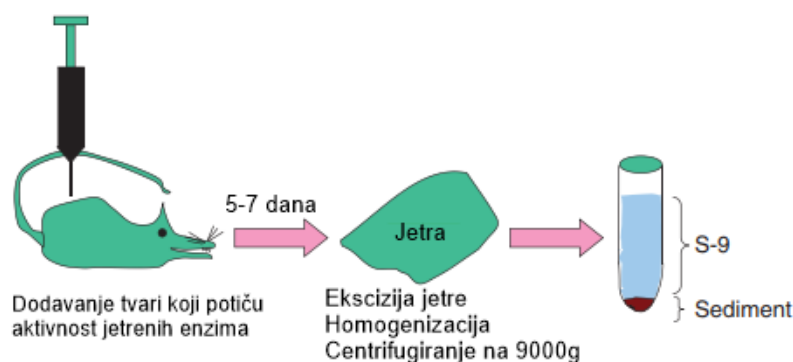
Soj	Mutacija	LPS	Popravak DNA	Rezistencija	
				Ampicilin	Tetraciklin
TA 97	<i>Frameshift</i> na hisD6610, hisO1242	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> , pKM101	R	O
TA 97a	<i>Frameshift</i> na hisD6610, hisO1242	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> , pKM101	R	O
TA 98	<i>Frameshift</i> na hisD3052	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> , pKM101	R	O
TA 100	Supstitucija baza na hisG46	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> , pKM101	R	O
TA 102	Supstitucija baza na hisG428	<i>rfa</i>	pKM101, pAQ1	R	O
TA 104	Supstitucija baza na hisG428 na kromosomu	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i> , pKM101 R	R	O
TA 1535	Supstitucija baza na hisG46	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	O	O
TA 1537	<i>Frameshift</i> na hisC3076	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	O	O
TA 1538	<i>Frameshift</i> na hisD3052	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	O	O

Najčešće se koriste dvije verzije Amesovog testa (Slika 4): model inkorporacije, u kojem se bakterije miješaju s testiranom tvari te se trenutačno nasađuju na agar; i preinkubacijski model u kojem se mješavina bakterija i testirane tvari inkubira u vodenoj kupelji na 37°C tijekom jednog sata prije izlivanja na agar (Föllmann i sur., 2013). Preinkubacijski model je osjetljiviji, ali zahtjeva više laboratorijske opreme.



Slika 4: Shematski prikaz provođenja dva modela Amesovog testa (1) Preinkubacijski i (2) Inkorporacijski model. (Izvor: Föllmann i sur., 2013)

S obzirom da brojne kemikalije zahtijevaju metaboličku aktivnost prije stjecanja mutagenih/karcinogenih svojstava, a kod bakterija takva metabolička aktivnost izostaje, Amesov test se provodi s dodatkom metaboličkog sustava sisavaca (Föllmann i sur., 2013). Koristi se 9000g supernatant (koji se naziva S9) dobiven iz homogenata jetre štakora koji su tretirani s tvari koja snažno inducira sintezu enzima za metabolizam ksenobiotika<sup>10</sup> (Slika 5) čiji dodatak katalizira reakcije konverzije promutagena u aktivne karcinogene ili mutagene.



Slika 5: Shematski prikaz dobivanja S9 ekstrakta iz jetre štakora. Nakon dodavanja ksenobiotika koji potiče sintezu enzima, jetra se iz štakora izvadi (nakon 5 do 7 dana), homogenizira i centrifugira na 9000g. Nakon centrifugiranja izdvaja se supernatant S9 otopine iznad sedimenta koji se odbacuje. (Izvor: Föllmann i sur., 2013).

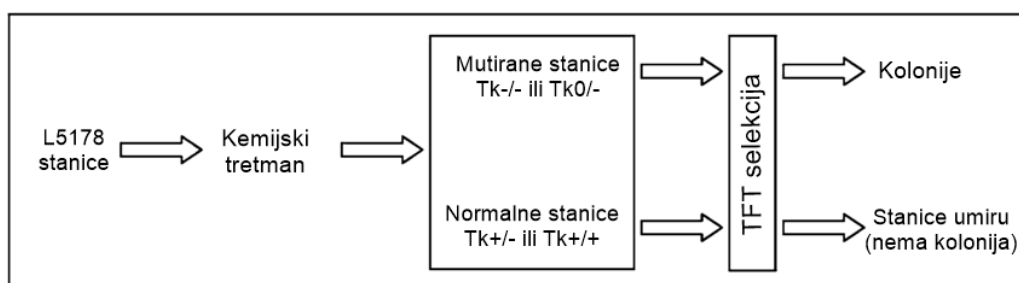
<sup>10</sup> Tvar koja se nalazi u organizmu, ali se u njemu ne proizvodi.



Mnoge tvari koje su Amesovim testom dale pozitivan rezultat su karcinogeni za sisavce, no ne postoji egzaktna korelacija (100%) između pozitivnih rezultata Amesovog testa i karcinogenosti. Čak i dodatkom sustava za aktivaciju metabolizma, Amesov test ne može precizno replicirati *in vivo* uvjete u stanicama sisavaca (Guy, 2014a).

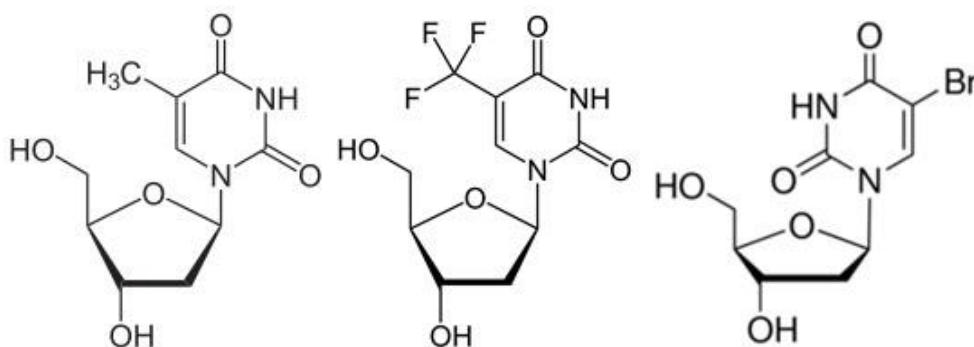
### 3.2.2. Test mutacije TK stanica limfoma miša (MLA)

Test mutacije Tk stanica limfoma miša prati genetske alteracije gena za timidin-kinazu (Tk), koji se nalazi na 11. kromosomu, koristeći  $Tk^{+/-}$  klonove stanične linije limfoma: L5178Y (Mei i sur., 2014). Metodu su osmislili Dr. Donald Clive i kolege koji su koristili polukruti agar za brojanje mutiranih stanica. Alternativna metoda se pojavila 1983. godine kada je tekući agar zamijenio polukruti, te se kao novost pojavilo prebrojavanje stanica u mikrotitarskim pločicama sa 96 jažica. Kao i druge *in vitro* tehnike, MLA ima prednost što se može provesti relativno brzo i bez velikih novčanih izdataka (Mei i sur., 2014). Tirozin kinaza (TK) je enzim koji omogućuje stanicama primanje timidina iz okolnog medija u svrhu inkorporacije u molekulu DNA (Guy, 2014b). Iako stanice sisavaca sadrže dvije funkcionalne kopije Tk gena, stanice limfoma miša sadrže samo jednu funkcionalnu jedinicu, te se ovakav fenotip označava kao  $TK^{+}/TK^{-}$  (Tchounwou, 2013). Test se zasniva na hipotezi da će ulaskom analoga timidina u stanicu i njegovom inkorporacijom u DNA doći do apoptoze stanice (programirane smrti) (Guy, 2014b). Kao analog timidina, najčešće se koristi TFT (trifluorotimidin) (Slika 6). Stanice  $TK^{+}/TK^{-}$  uslijed mutacije izazvane testiranim kemijskim agensom prelaze u  $TK^{-}/TK^{-}$  što se može pratiti njihovom proliferacijom na hranjivom mediju obogaćenom TFT-om, dok stanice, kod kojih nije došlo do mutacije, umiru (Slika 5).



Slika 6: Princip selekcije MLA testom. Stanična kultura mišjeg limfoma L5178Y se izlaže kemijskom tretmanu, nakon čega se radi selekcija TFT-om. Ukoliko su stanice djelovanjem kemijskog agensa mutirale, one će na hranjivoj podlozi obogaćenom TFT-om rasti, a ako do mutacije nije došlo, stanice umiru. (Izvor: Mei i sur., 2014).

Osim TFT-a, u MLA testovima se koristi i drugi supstituent za timidin, BUdR (5-bromo 2'-deoksiuridin) (Slika 7) (Guy, 2014b). BUdR je mutagen za stanice sisavaca, ali da bi se njegova genotoksikološka aktivnost u stanicama limfoma mogla pratiti, potrebno je proći nekoliko ciklusa stanične diobe.

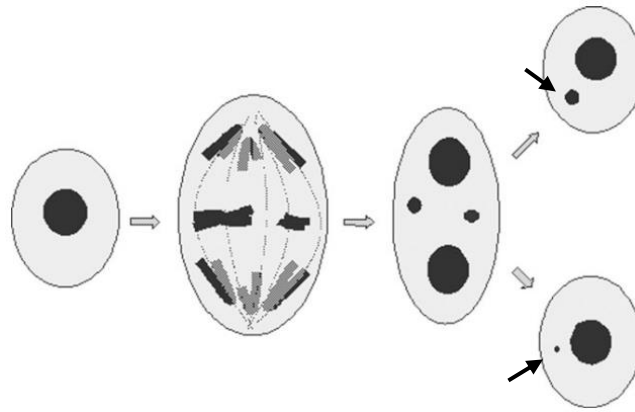


Slika 7: Kemijske strukture (redom s lijeva na desno) timidina, TFT-a i BUdR-a.

MLA se može koristiti i za evaluaciju foto-mutagenosti. Iz razloga što neke čestice mogu postati aktivne nakon apsorpiranja ultraljubičastog (UV) zračenja ili energije vidljivog spektra svjetlosti, no ovakva istraživanja nemaju primjenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, zbog čega su rijetko zastupljena (Mei i sur., 2014).

### 3.2.3. Mikronukleus test (MN)

Povećanje učestalosti formiranja mikronukleusa (MN) služi kao izvrstan biomarker genotoksičnog oštećenja, a bazira se na detekciji oštećenja u interfazi staničnog ciklusa (Beedanagari i sur., 2014). Mikronukleus je fragment DNA koji se odvojio od ostatka jezgrinih kromosoma (Slika 8), a njegovo formiranje je uvjetovano aneugenim ili klastogenim oštećenjem (Doherty, 2011). Inducirani mikronukleus je prvi put uočen u vršnim stanicama korijena boba (*Vicia faba L.*) korištenjem X-zraka (Doherty, 2011). MN test potvrđuje nasljednost mutacija i oštećenja jer detektira prijenos degeneriranih tvorevina s jedne stanice na stanice kćeri prilikom mitoze. Od 1985. godine se prilikom izvođenja MN testa koristi i inhibitor aktina, citohalasin B (CB), koji blokira citokinezu što dovodi do stvaranja binokularnih stanica. Primjena inhibitora citokineze je omogućila promatranje mikronukleusa tijekom njegova nastajanja (Doherty, 2011).



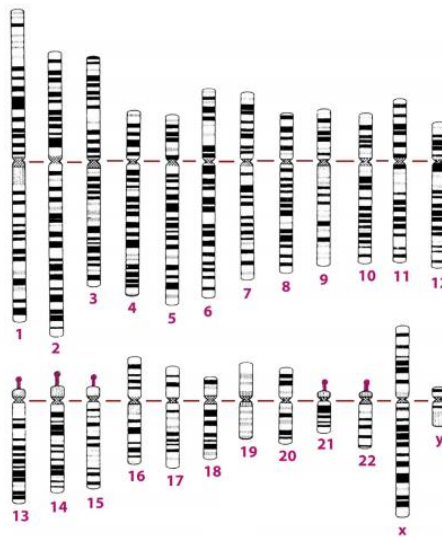
Slika 8: Proces formiranja mikronukleusa. Djelovanjem mutagena, kromosomi zaostaju u metafaznom položaju, te se nakon citokineze ne vraćaju u jezgru. (Izvor: Doherty, 2011)

Istraživanjima je uočeno i postojanje centromera u mikronukleusima što je znanstvenike navelo na zaključak da mikronukleus predstavlja cijele kromosome, a ne samo zaostale fragmente (Doherty, 2011). Nedavna istraživanja su potpomognuta primjenom fluorescentne *in situ* hibridizacijske tehnike (FISH) koja otkriva podrijetlo nastanka MN-a i tip oštećenja koji je doveo do njegovog formiranja (aneugeno/klastogeno). Kod mikronukleusa nastalog klastogenim oštećenjem izostaje centromera, dok oni nastali aneugenim oštećenjem sadrže centromeru, ali gube ili cijelu kromatidu, ili čak i kromosom (Beedanagari i sur., 2014). Osim FISH metode, u primjeni su protočna citometrija te nove tehnike oslikavanja stanica koje omogućuju kvalitetnije rezultate što čini ovaj test izuzetno popularnim u znanstvenim istraživanjima genotoksičnosti. Smatra se da u određivanju tipa oštećenja veliku ulogu igra i sama veličina (promjer) mikronukleusa, no o tome se i dalje raspravlja (Beedanagari i sur., 2014)

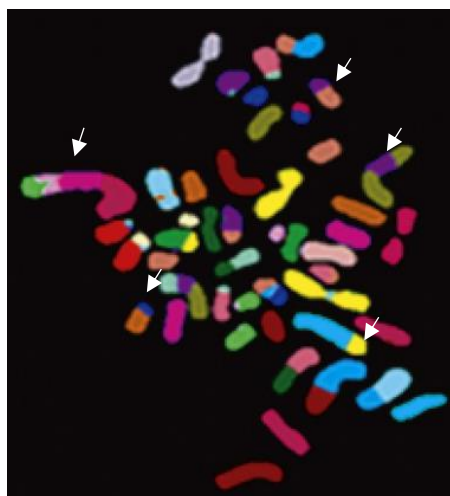
#### 3.2.4. Test detekcije kromosomskih aberacija (CA)

Jedna od tradicionalnih i direktnih citogenetičkih metoda za detekciju genotoksičnog oštećenja je bazirana na direktnom promatranju promjena u sastavu kromosoma u staničnim kulturama neposredno nakon izlaganja kemijskom agensu (Beedanagari i sur., 2014). U skupinu oštećenja kromosoma pripadaju razni tipovi nepravilnosti: insercije, delecije, translokacije, endoreduplikacije, poliploidije, aberacije kromatida, povećanje broja kromosoma, te smanjenje broja kromosoma (Beedanagari i sur., 2014). Proučavanje kromosomskih aberacija je potpomognuto upotrebom raznih histoloških boja koje specifično

bojaju DNA (npr. Giemsa) (Preston, 2014). Bojanje se vrši na način da se kromosomi prvo izlažu parcijalnoj kemijskoj denaturaciji nakon čega se primjenjuje boja koja se specifično veže za određene regije te ostavlja dojam ispruganosti kromosoma (Slika 9). Kromosomske aberacije se tada mogu vidjeti kao alteracije normalnog kariograma s kojim se uspoređuje ispitani uzorak (Preston, 2014). Osim bojanja Giemsa bojama, primjenjuje se i FISH metoda koja omogućuje fluorescentno obilježavanje određenih regija DNA molekule (Slika 10). Fluorescentna *in situ* hibridizacija koristi označene sonde (polinukleotidne sekvence DNA označene fluorescentnim proteinima) za obilježavanje molekule DNA koje se za nju vežu u komplementarnim regijama nakon čega se uzorci promatraju pod fluorescentnim mikroskopom.



Slika 9: Humani kariogram nakon Giemsa-pruganja. (Izvor: Preston, 2014)



Slika 10: Kariogram humane stanice raka dojke na kojem su vidljive translokacije i aneuploidije za neke kromosome. (Izvor: Preston, 2014)

Kromosomske aberacije se najčešće proučavaju u metafaznim stanicama jer su tada kromosomi najviše kondenzirani i oštećenja su najlakše uočljiva (Beedanagari i sur., 2014). Zaustavljanje staničnog ciklusa u metafazi se postiže primjenom raznih kemijskih agensa koji će inhibirati dalje napredovanje staničnog ciklusa, ili kretanje kromosoma prema polovima.

Za ovakav tip testa, ekvivalentno MN testu mogu se koristiti razne kulture stanica, no najčešće se koriste CHO<sup>11</sup> stanice (stanice ovarija kineskog hrčka) zbog toga što su kromosomi veći, u manjem broju i stabilniji u odnosu na kromosome drugih stanica (Beedanagari i sur., 2014).

Iako su kromosomske aberacije dobar biomarker za određivanje numeričkih i strukturnih oštećenja kromosoma i imaju široku primjenu u istraživanjima, MN test je puno osjetljiviji na kemikalije koje uzrokuju genotoksične učinke (Beedanagari i sur., 2014).

### **3.2.5. Komet test (SCGE)**

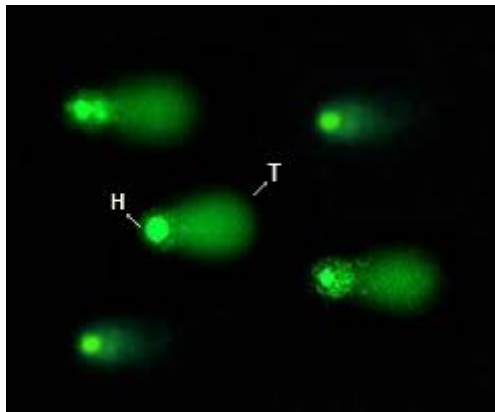
Komet test ili gel elektroforeza jedne stanice (SCGE<sup>12</sup>) je jednostavna i prilagodljiva metoda određivanja oštećenja i stope popravka DNA na razini samo jedne stanice (Costa i Teixeira, 2014). Zasniva se, kao i elektroforeza, na principu kretanja i razdvajanja nabijenih molekula kroz medij. Molekule DNA nose negativan naboj zbog čega se učinkovito kreću kroz gel prema pozitivno nabijenom polu u prisustvu napona. Na molekularnoj razini, formiranje „kometa“ u komet testu je posljedica genotoksičnog djelovanja, odnosno, oštećena DNA tvori „rep“ kometa jer se kreće drugačijim intenzitetom kroz elektroforetski gel u odnosu na neoštećenu DNA koja tvori tzv. „glavu“ (Slika 11) (Beedanagari i sur., 2014). Test su osmislili znanstvenici Ostling i Johanson 1984. godine. Njihov eksperiment je bio baziran na radu objavljenom u kasnim 1970-im godinama od strane Cook i suradnika koji su razvili metodu istraživanja nuklearne strukture eukariotskih stanica na temelju lize stanica pod utjecajem visoke koncentracije soli iz neionskih detergenata: u svom eksperimentu su dobili superuzvojnice DNA koje su „raspetljali“ dodatkom interkalatnog agensa, nakon čega je opuštena DNA izašla iz nuklearne strukture (nukleoida) i formirala oblik „aureole“ (Costa i Teixeira, 2014). Doprinos Ostlinga i Johnsona je u tome što su okarakterizirali „rep“ kojeg su opisali kao „aureolu relaksirane uzvojnice privučenu na

---

<sup>11</sup> Chinese Hamster Ovary

<sup>12</sup> Single Cell Gel Electrophoresis

stranu anode“ u elektroforetskom gelu. Singh i suradnici su 1988. promijenili uvjete testa i imenovali ga *alkalni komet test* (pH>13). Sama metoda je puno puta kroz povijest adaptirana i doradivana zbog čega se danas razlikuje nekoliko tipova komet testa (alkalni, enzimski, računalni...), ali je i dalje najznačajniji upravo alkalni (Costa i Teixeira, 2014). Zahvaljujući prilagodljivosti, *in vitro* komet test se može provoditi na bilo kojim animalnim stanicama u kulturi (Beedanagari i sur., 2014).



Slika 11: Kometi pod fluorescentnim mikroskopom. H-glava kometa (neoštećena DNA); T-rep kometa (oštećena DNA) (Izvor: WEB1)

Komet test ima brojne prednosti: (1) visoka osjetljivost na male količine oštećenja; (2) primjenjiv je za širok spektar stanica; (3) s obzirom da se provodi testiranje na jednoj stanici, moguće je test ponoviti više puta što povećava njegovu statističku značajnost; (4) ne zahtjeva velik broj uzoraka; (5) jeftin, brz i jednostavan za korištenje; (6) fleksibilan za korištenje i na svježim i smrznutim preparatima. No ovaj test ima i nekoliko limitirajućih čimbenika: (1) ne može detektirati aneugene utjecaje i epigenetske mehanizme (indirektna oštećenja DNA); (2) s obzirom da SCGE ne može detektirati DNA fragmente koji nastaju apoptozom ili nekrozom, citotoksična ispitivanja mogu dati lažne pozitivne ili negativne rezultate. (Costa i Teixeira, 2014). No, bez obzira na ograničenja, ovaj test se koristi u genotoksikološkim, ekotoksikološkim, biološkim, biomedicinskim i medicinskim istraživanjima u kombinaciji s drugim *in vitro*, *in vivo* i *in silico* testovima .

### 3.3. *In vivo* metode

Istraživanja na životinjama se najčešće koriste u temeljnim medicinskim istraživanjima, istraživanjima genetskih bolesti, razvoju novih dijagnostičkih metoda i

lijekova te terapijskih postupaka (HZZO, 2012). Istraživanja provedena na životinjama služe za identifikaciju toksičnih učinaka (za ljude) brojnih kemijskih spojeva (Gad, 2014a). Životinje su se stoljećima koristile kao modeli za ispitivanje kemijskih i okolišnih faktora na zdravlje i funkcije organizma. Najraniji zapis o korištenju životinja u svrhu istraživanja dolazi iz 1792. godine kad je znanstvenik Priestley proučavao plinove te dokazao postojanje kisika (Gad, 2014a). Od tada, do danas su se usavršile brojne alternativne tehnike i metodologije zahvaljujući 3R<sup>13</sup> principu (smanjiti, poboljšati i zamijeniti) kako bi se smanjilo upotrebljavanje životinja u svrhu istraživanja, ali u brojnim granama znanosti su takvi postupci i dalje neophodni (Beedanagari i sur., 2014).

*In vivo* genotoksikološki testovi mogu se provesti na sisavcima, ali i na biljkama, gljivama, kvascima, beskralježnjacima i prokariotima. Jedan od najznačajnijih modelnih organizama u molekularnim i toksikološkim istraživanjima je vinska mušica, *Drosophila*. Spolno-povezani recesivni letalni test se primjenjuje za otkrivanje letalnih mutacija na X kromosomu ženki *Drosophilae* (Landolph, 2014). U ovom testu se prati pojava ili izostanak mužjaka divljeg tipa u populaciji potomaka mutirane ženke te se na temelju ovakvog testa može zaključiti o mutagenosti određenog spoja. *In vivo* genotoksikološke tehnike na biljkama se svode na praćenje kromosomskih aberacija u kariogramu uslijed tretmana nekim potencijalnim mutagenom (Landolph, 2014). Modelne životinje u toksikološkim istraživanjima su najčešće viši sisavci (štakori, miševi, zamorci, hrčci, afrički tvorovi, psi, magarci i majmuni) (Gad, 2014b). Test koji se često primjenjuje je *spot test* na miševima izloženim mutagenu u kojem se prati točkasta alteracija pigmentacije kod miševa koji su heterozigoti na boju krzna što ukazuje na mutaciju u prekursorskim stanicama izmijenjenih regija (Landolph, 2014). Osim stanica životinjskih vrsta, mogu se promatrati i ispitivati humane stanice. Model za ispitivanje genotoksičnosti su stanice periferne krvi ili stanice koštane srži. Često se koriste limfociti prikupljeni iz periferne krvi čovjeka (ili nekog drugog sisavca) nakon izlaganja potencijalnom mutagenu (HZZO, 2012). Test se svodi na praćenje mutacija na *HPRT* genu koji kodira za hipoksantin-gvanin fosforibozil-transferazu. Slično MLA testu, u obzir se uzima proliferacija mutiranih stanica, nakon čega se izdvaja genom s ciljem sekvenciranja radi dobivanja što konkretnijeg podatka o mutaciji (Landolph, 2014). Osim *in vivo* verzije MLA testa, većina *in vitro* testova se može primijeniti na živim organizmima (Beedanagari i sur., 2014). Stanice se prikupljaju, te se može pratiti nastanak

---

<sup>13</sup> Reduce, Refine, Replace

mikronukleusa (MN test), kometa (SCGE) ili kromosomskih aberacija (CA), kao posljedica djelovanja nekog mutagena ili karcinogena.

Najveća prednost *in vivo* testova je što su žive stanice intaktni biološki sustavi sa svojstvenim metabolizmom, fiziologijom, strukturom, ekskrecijom, apsorpcijom i svim mehanizmima odgovora na stres i mutagene koji su karakteristični samo za žive organizme (Gad, 2014b). Unatoč brojnim metodologijama unaprjeđenja *in vivo* tehnika i dalje postoje određena ograničenja: (1) kompleksna fiziologija i molekularni mehanizmi živih stanica mogu toksikološka istraživanja učiniti teškim za praćenje; (2) odgovor se može pojaviti samo na određenim tkivima ili područjima, bez narušavanja funkcionalnosti okolnih stanica, tkiva ili organa; (3) strukturne i biokemijske razlike između animalnih stanica i humanih stanica otežavaju ekstrapolaciju dobivenih rezultata testova na životinjama; (4) manjkavost standardizacije u *in vivo* sustavima; (5) različitosti u funkcionalnosti pojedinih stanica između jedinki iste vrste; (6) etičko pitanje; i drugi (Gad, 2014b). Sukladno navedenim problemima, neadekvatno rukovođenje opremom, kemikalijama i kontaminacije su također veliki problemi, uslijed čega *in vivo* testovi (kao i *in vitro*) mogu dati lažne pozitivne rezultate.



## 4. PRIMJENA GENOTOKSIČNIH BIOMARKERA

Genotoksični biomarkeri primjenu imaju i u ekotoksikologiji, biomedicini, farmaciji, onkologiji i brojnim drugim granama znanosti. Koriste se različiti pristupi s obzirom na različite ciljeve i hipoteze istraživanja, a najčešći oblik upotrebe biomarkera je, ranije spomenuti, *battery* pristup koji kombinira *in silico*, *in vitro* Amesov, MLA, SCGE i MN, te *in vivo* testove kako bi se utvrdilo djelovanje i genotoksični potencijal istraživane tvari.

### 4.1. Primjeri primjene *in silico* metoda

E. J. Matthews je u svom radu iz 2018. godine upotrebom *in silico* tehnika evaluirao popis od 15 145 kemijskih spojeva koji se primjenjuju u prehrambenoj tehnologiji, farmaciji i kozmetici, te u procesima pripreme prehrambenih boja, aditiva i konzervativa. U svojem istraživanju koristio je skup softvera koji obrađuju poveznice između strukture i aktivnosti kemijskog spoja (SAR) te kvantitativnu analizu te korelacije (QSAR), kao što su *Nexus Derek*, *Lazar*, *T.E.S.T.* i brojni drugi. Testiranjem velikog broja kemijskih spojeva, dobiven je popis kemikalija koje imaju različite toksikološke profile, a česte su u svakodnevnoj upotrebi (Matthews, 2018). Također, ovim radom se pokušala skrenuti pažnja znanstvenika na važnost *in silico* metoda u istraživanju i procjeni genotoksičnosti ili karcinogenosti kemijskih spojeva.

Osim spojeva koji su odavno poznati javnosti, svakodnevno se otkrivaju i nastaju novi, kako umjetnom sintezom, tako i proučavanjem metabolizama različitih organizama (u prvom redu biljaka), pa je od velike važnosti i procjena toksičnosti biljnih metabolita, a ovakva istraživanja su često kompleksna i sadržajna. Primjer kompleksnog istraživanja je ono provedeno od strane Capdesuñera i sur. (2019) koji su istraživali povezanost između morfologije biljke duhana (*Nicotiana tabacum* L.) i koncentracije sintetiziranih terpena koji imaju antimikrobno i antioksidativno djelovanje. U svom eksperimentu su Capdesuñera i sur. (2019) proučavali različite sorte duhana te su na taj način dobili široku sliku o djelovanju različitih vrsta terpena, te o njihovoj mutagenosti. *In silico* tehnike su u ovom istraživanju poslužile kao inicijalna točka, no njihova točnost i preciznost je omogućila adekvatno provođenje daljnjih *in vitro* testova. Rezultati *in silico* eksperimenta su potvrdili nultu hipotezu, odnosno otkrivena je pozitivna korelacija između morfologije različitih sorti duhana i sinteze sekundarnih metabolita, dok su rezultati *in vitro* testiranja potvrdili njihovo antifungalno i antimikrobno djelovanje što se može iskoristiti u oplemenjivanju biljnih usjeva te u zaštiti obradivih površina (Capdesuñera i sur., 2019). Ovakvi eksperimenti danas sve više dobivaju na važnosti zbog velike primjene biljnih metabolita u svim granama

industrije, te u medicinskim istraživanjima ili istraživanjima lijekova i farmaceutskih pripravaka.

#### 4.2. Primjeri primjene *in vitro* i *in vivo* metoda

Za razliku od *in silico* tehnika, *in vitro* metode su u upotrebi puno duže i ove metode detekcije genotoksičnih biomarkera su puno puta doradivane. Ames test je, odmah nakon prve upotrebe u laboratoriju dr.sc. B. Amesa, zadobio pozornost prvenstveno zbog svoje jednostavnosti, ali i zbog točnosti (Zeiger, 2019). Test je mnogo puta dopunjavan, ali i dalje ne postoji standardizirani protokol za njegovo provođenje, nego uvelike ovisi o ciljevima istraživanja (Zeiger, 2019). Često se koristi u kombinaciji s drugim *in vitro* i *in vivo* tehnikama. Kombinacija koju su upotrijebili Du i sur. (2019) se sastojala od Amesovog i MLA testa u procjeni karcinogenosti (genotoksičnosti) nanočestica titanijevog dioksida ( $\text{TiO}_2\text{-NPs}$ ). Nanočestice titanijeva dioksida su često prisutne u raznim proizvodima, uključujući boje, kozmetiku i farmaceutske proizvode (Du i sur., 2019). U svom eksperimentu, Du i sur. (2019) su testirali različite koncentracije  $\text{TiO}_2$  u različitim vremenskim periodima (4 h i 24 h) te sa i bez metaboličkog aktivatora, a rezultati su upućivali na negativnu korelaciju između genotoksičnosti i primijenjene koncentracije te je potvrđena ne-genotoksičnost titanijevog dioksida u Amesovom i MLA testu. Njihovi rezultati su u kontradikciji s rezultatima istraživanja Lu i sur. (1998) te Di Virgillio i sur. (2010) koji su primijenili druge testove (MN test) kojima su dobili pozitivnu genotoksičnost ispitanoj spoja. Yang i sur. (2016) su ispitivali genotoksičnost lantanijevog nitrata ( $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ ) primjenom kombinacije Ames i MN testa. Rezultati su pokazali da lantanijeve soli nisu genotoksične za bakterijske kolonije, no izlaganje staničnih kultura sisavaca (u MN testu) ispitanoj spoju je povećalo učestalost formiranja mikronukleusa (Yang i sur., 2016). Još jedan primjer istraživanja genotoksičnosti nanočestica je proveden od strane Li i suradnika (2012) koji su ispitivali genotoksičnost srebrnih nanočestica primjenom kombinacije Amesovog i MN testa. Srebrne nanočestice su često prisutne u električnim, kućanskim i zdravstvenim proizvodima, zbog čega je od velike važnosti procjena njihove genotoksičnosti (Li i sur., 2012). Amesov test je dao negativne rezultate, što se može objasniti smanjenom mogućnošću penetracije nanočestica kroz staničnu stijenku bakterija, dok su rezultati MN testa ukazali na pozitivnu korelaciju između pojavljivanja mikronukleusa i povećanja koncentracije srebrnih nanočestica (Li i sur., 2012). Amesov test igra važnu ulogu i u istraživanjima lijekova i metabolita često korištenih lijekova, pa su tako Li i suradnici (2013) proučavali genotoksičnost aspirin-eugenol estera (AEE) primjenom

Amesovog i MN testa, čime je otkriveno da niti aspirin, niti eugenol, niti njihova kombinacija nemaju genotoksični karakter.

Osim u kombinaciji, u nekim slučajevima, Amesov test se može provesti i sam i dati važnu informaciju o toksičnom i mutagenom karakteru kemijskog spoja. Na ovaj način je evaluirana genotoksičnost hidroalkoholnog ekstrakta iz vrsta roda *Astronium* (medicinska biljka autohtona za Južnu Ameriku) te je potvrđena ne-mutagenost na bakterijske kolonije (čak je utvrđena i određena stopa antimutagenog djelovanja hidroalkoholnog ekstrakta) (Resende i sur., 2015). Važnost Amesovog testa u genotoksikologiji je potvrdilo i istraživanje provedeno od strane Harding i sur. (2015) koji su ispitivali genotoksičnost aromatskih amina različite čistoće i u različitim otopinama. Aromatski amini su vrlo bitni kemijski spojevi u farmaceutskoj industriji i u medicini (Harding i sur., 2015). U istraživanju je ispitan karakter ukupno 14 aromatskih spojeva različitih stupnjeva čistoće te otopljivih u različitim otapalima, od čega se samo jedan spoj (4-aminoacetanilid) pokazao kao genotoksičan (Harding i sur., 2015).

Kombinacija različitih tipova istraživanja se koristi iz razloga kako bi se usuglasili rezultati, te kako bi se povećala statistička značajnost dobivenih rezultata različitih testiranja. Nije rijetkost da su rezultati pojedinog testa za jedan spoj u kontradikciji, a o ovome su izvijestili i Gunther i sur. (2017) u svom istraživanju 4 farmaceutska proizvoda te utjecaja čistoće aktivnih tvari na genotoksičnost putem *in silico* metoda i Ames testa. Rezultati *in silico* istraživanja su ukazali na negativnu korelaciju između strukture ispitanih spojeva i mutagenog karaktera, dok su u Amesovom testu, izlaganjem istom reagensu, bakterijske kolonije revertirane u divlji tip (Gunther i sur., 2017). Kasnijim istraživanjima je ipak utvrđena ne-genotoksičnost ispitanih tvari, što direktno ukazuje na važnost sustavnih ispitivanja i primjene različitih testova u istraživanjima mutagenosti i karcinogenosti (Gunther i sur., 2017).

*In vivo* testovi, s druge strane, daju izuzetno kvalitetne podatke o genotoksičnosti pojedinih ispitanih kemijskih spojeva, no, danas se njihova upotreba drastično smanjuje uslijed brojnih, ranije u ovom radu navedenih, razloga. Ipak su nekad nezaobilazna metoda zbog nepodudarnosti rezultata ranije provedenih *in silico* i *in vitro* metoda. Najčešći *in vivo* testovi u primjeni su *in vivo* MN test, *in vivo* CA test i *in vivo* MLA test. Korištenje kombinacije različitih *in vitro* i *in vivo* testova doprinosi važnosti rezultata (Beedanagari i sur., 2014). Jedno od važnijih istraživanja provedenih kombinacijom *in vitro* i *in vivo* tehnika

je istraživanje toksičnosti aspartama (ne-nutritivnog zaslađivača koji je 200 puta slađi od konzumnog šećera), gdje su korišteni Ames test i *in vivo* verzija MN testa (Otabe i sur., 2018). Ovim istraživanjem je potvrđena negativna mutagenost i karcinogenost aspartama, što je u suglasnosti s ranije provedenim istraživanjima (Otabe i sur., 2018). No ipak, svijest o štetnom djelovanju aspartama i dalje postoji među ljudima, unatoč svim negativnim rezultatima istraživanja mutagenosti (EFSA, 2013).

## 5. ZAKLJUČAK

Genotoksični biomarkeri imaju široku primjenu u toksikološkim i ekotoksikološkim istraživanjima kao i u prehrambenoj, kozmetičkoj ili farmaceutskoj industriji. Detekcija biomarkera sve više napreduje te se razvijaju nove tehnologije kojima bi se potencijalno omogućilo smanjenje korištenja životinja, a povećalo korištenje staničnih kultura u istraživanjima. *In silico* metode detekcije se koriste u preliminarnim istraživanjima toksičnosti čije je rezultate, i dalje, potrebno provjeriti putem *in vitro* ili *in vivo* metoda jer isključuju stanični metabolizam spojeva, te naknadnu aktivaciju potencijalnih toksina. *In vitro* metode se najviše koriste u istraživanjima zahvaljujući svojoj brzini, jednostavnosti i točnosti, ali, niti one ne mogu replicirati egzaktne uvjete unutar žive stanice što otvara mnogo mjesta za napredak ovih metoda. *In vivo* metode daju najtočnije podatke o toksičnosti određenih spojeva, međutim, zahtjev za smanjenjem upotrebe živih organizama u istraživanjima, te napredak *in silico* i *in vitro* tehnika dovode do redukcije korištenja *in vivo* metoda.

## 6. LITERATURA

- Beedanagari, S., Vulimiri, S. V., Bhatia, S., Mahadevan, B. (2014) *Biomarkers in toxicology: Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility*. Academic press, 1st edition, pp. 729-742
- Brljak, M. (2014) *Okolišni biomarkeri kao rano upozorenje bolesti – poznati endokrini disruptori*. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu. Medicinski fakultet. Zagreb
- Capdesuñer, Y., García-Brizuela, J., Mock, H. P., Hernández, K. V., de la Torre, M. H., i Santiesteban-Toca, C. E. (2019). *Accessing to the Nicotiana tabacum leaf antimicrobial activity: In-silico and in-vitro investigations*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **139**: 591-599
- Cooper, G. M., Hausman, R. R. (2004) *Stanica: Molekularni pristup*. Medicinska naklada, Zagreb, 3. izdanje, pp. 631-673
- Corvi, R., Madia, F. (2017) *In vitro genotoxicity testing: Can the performance be enhanced?* *Food and Chemical Toxicology* 106 (2017) 600-608
- Costa, S. i Teixeira, J.P. (2014) *Comet Assay*. *Encyclopedia of toxicology 3<sup>rd</sup> Edition*. LLC, Lake Forest, IL, USA Vol1: 1020-1023
- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., Fernandez Lorenzo de Mele, M. (2010) *Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells*, *J. Hazard. Mater.* 177: 711–718
- Doherty, A. T. (2011) *The In Vitro Micronucleus Assay*. *Genetic Toxicology, Methods Mol Biol.*; 817:121-141
- Du, X., Gao, S., Hong, L., Zheng, X., Zhou, Q., & Wu, J. (2019). *Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838, 22–27
- ECVAM, 2013. *EURL ECVAM Strategy to Avoid and Reduce Animal use in Genotoxicity Testing*. (2013) JRC Scientific and Policy Report. <http://dx.doi.org/10.2788/43865> (pristup: 28.5.2019.)
- EFSA, 2013. *Scientific opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive (EFSA panel on food additives and nutrient sources added to food/ANS)*. *EFSA J* 11 (4), 3496. (263 pp.)

- EPA (2014) Pesticides. Defining Biomarkers - <http://www.epa.gov/pesticides/science/biomarker.html> (pristup: 14.5.2019.)
- Föllmann, W., Degen, G., Oesch, F., Hengstler, J.G. (2013) *Ames test. Brenner's Encyclopedia of Genetics 2<sup>nd</sup> Edition*. Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors (IfADo), Dortmund, Germany: 104-107
- Gad, S.C. (2014a) *Animal models. Encyclopedia of toxicology 3<sup>rd</sup> Edition*. LLC, Lake Forest, IL, USA, Vol1: 243-245
- Gad, S.C. (2014b) *In vivo tests. Encyclopedia of toxicology 3<sup>rd</sup> Edition*. LLC, Lake Forest, IL, USA, Vol2: 1103-1104
- Gunther, W. C., Kenyon, M. O., Cheung, J. R., Dugger, R. W., & Dobo, K. L. (2017). *Resolution of contradiction between in silico predictions and Ames test results for four pharmaceutically relevant impurities*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 91, 68–76.
- Gupta, R. (2014) *Biomarkers in toxicology: Introduction*. Academic Press, 1st edition, pp. 3-5
- Guy, R.C. (2014a) *Ames test. Encyclopedia of toxicology 3<sup>rd</sup> Edition*. LLC, Lake Forest, IL, USA, Vol1: 187-188
- Guy, R.C. (2014b) *Mouse Lymphoma Assay. Encyclopedia of toxicology 3<sup>rd</sup> Edition*. LLC, Lake Forest, IL, USA, Vol3: 397-398
- Guyton, A. C., Hall, J. E. (2012) *Medicinska fiziologija – udžbenik*. Medicinska naklada, Zagreb, 12. izdanje, pp. 3-41
- Harding, A. P., Popelier, P. L. A., Harvey, J., Giddings, A., Foster, G., & Kranz, M. (2015). *Evaluation of aromatic amines with different purities and different solvent vehicles in the Ames test*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2), 244–250.
- HZZO (2012): *Praktična smjernica za rad s karcinogenim i mutagenim tvarima*. <http://hzzzsr.hr/wp-content/uploads/2016/11/Prakticna-smjernica-za-rad-s-karcinogenim-i-mutagenim-tvarima-1.pdf> (pristup: 30.5.2019.)
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., Muller, L. (2005) *Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity*. *Mutant Res* 584: 1-256
- Klopman, G. i Rosenkranz, H. S. (1984) *Structural requirements for the mutagenicity of environmental nitroarenes*. *Mutat Res* 126: 227-238

- Landolph, J. R. Jr. (2014) *Genetic toxicology. Encyclopedia of toxicology 3<sup>rd</sup> Edition*. LLC, Lake Forest, IL, USA, Vol2: 715-725
- Li, Y., Chen, D. H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R. A., Zhang, Y., ... Chen, T. (2012). *Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1-2), 4–10
- Li, J., Kong, X., Li, X., Yang, Y., & Zhang, J. (2013). *Genotoxic evaluation of aspirin eugenol ester using the Ames test and the mouse bone marrow micronucleus assay*. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 805–809
- Lu, P.J., Ho, I.C., Lee, T.C. (1998) *Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells*, *Mutat. Res.* 414: 15–20
- Marchant, C. (2012) *In silico systems for the prediction of genotoxicity*. Lhasa Limited (<https://www.lhasalimited.org/Public/Library/2013/In%20Silico%20Systems%20For%20The%20Prediction%20Of%20Toxicity%202013.pdf>) (pristup: 27.5.2019.)
- Matthews, E.J. (2018) *In silico scaling and prioritization of chemical disposition and chemical toxicity of 15,145 organic chemicals*, *Computational Toxicology Vol 9*:100-132
- Mei, N., Guo, X., Moore, M.M. (2014) *Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity*. *Methods in Pharmacology and Toxicology* · October 2014. 561-592
- Mortelmans, K. I Zeiger, E. (2000) *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. *Mut Res* 455: 29-60
- Myatt G. J. (2018) *In silico toxicology protocols*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2018 Vol.96: 1-17
- Otabe, A., Ohta, F., Takumi, A., & Lynch, B. (2018). *Mutagenicity and genotoxicity studies of aspartame*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 103: 345-351
- Parry, E.M., Parry, J.M., Corso, C. i sur. (2002) *Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals*. *Mutagenesis* 17: 509-521
- Preston, R.J. (2014) *Chromosome aberrations. Encyclopedia of toxicology 3<sup>rd</sup> Edition*. LLC, Lake Forest, IL, USA, Vol1: 955-958
- Resende, F. A., Campos, D. L., da Silva, V. C., De Grandis, R. A., Souza, L. P., Leonardo Junior, C. S., Varanda, E. A. (2015). *Mutagenicity and chemopreventive activities of*



*Astronium species assessed by Ames test. Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(3), 506–513

- Robinson, R. (2003) *Genetics, Volume 3 K-P*. Macmillian Reference and Thomson Learning, USA, New York, Vol. 3., pp. 93-98
- Rosenkranz, H.S., Klopman, G. (1990) *Structural basis of carcinogenicity in rodents of genotoxicants and non-genotoxicants*. *Mutat Res* 228: 105-124
- Sadiq, M. F., & Owais, W. M. (2000). *Mutagenicity of sodium azide and its metabolite azidoalanine in Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(2), 253–257
- Shi, J., Bezabhe, R. i Szudlinska, A. (2010) *Further evaluation of a flow cytometric in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies*. *Mutagenesis* 25: 33-40
- Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L. (2003) *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb, 1. izdanje na hrvatskom jeziku, pp. 783-820
- Sycheva, L. P., Zhurkov, V. S., Rakhmanin, Yu. A. (2012) *Actual Problems of Genetic Toxicology*. *Russian Journal of Genetics*, 2013, Vol. 49, No. 3, pp. 255–262
- Švob, Tvrtko i suradnici (1991) *Osnove opće i humane genetike*. Školska knjiga, Zagreb, 2. izdanje, pp. 20-34; 78-85
- Tchounwou, P. B. (2013). *Genotoxic Stress. Brenner's Encyclopedia of Genetics 2<sup>nd</sup> Edition*. Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors (IfADo), Dortmund, Germany:, 313–317.
- WHO (2011) *Biomarkers and Human Monitoring, Children's Health and the Environment* - <http://www.who.int/ceh/capacity/biomarkers.pdf> (pristup: 21.5.2019.)
- Yang, H., Zhang, X., Liu, H., Cui, W., Zhang, Q., Li, Y., ... Jia, X. (2016). *Lanthanum nitrate genotoxicity evaluation: Ames test, mouse micronucleus assay, and chromosome aberration test*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 810, 1–5
- Zeiger, E. (2019). *The Test that Changed the World: The Ames Test and the Regulation of Chemicals*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 841: 43-48
- WEB1: <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-354-comet-assay-control-cells.pdf> (pristup: 30.5.2019.)
- WEB2: <https://alchetron.com/2-Aminopurine> (pristup: 8.6.2019.)