

# Određivanje mogućeg mutagenog učinka monometinskih cijaninskih derivata

---

Medač, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:958109>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Petra Medač**

**ODREĐIVANJE MOGUĆEG  
MUTAGENOG UČINKA  
MONOMETINSKIH CIJANINSKIH  
DERIVATA**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Petra Medač**

**ODREĐIVANJE MOGUĆEG  
MUTAGENOG UČINKA  
MONOMETINSKIH CIJANINSKIH  
DERIVATA**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju u suradnji s Katedrom za mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad ima 36 stranica, 1 tablicu i 9 slika.

## Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Mutacije i njihov značaj.....	1
1.2. „Zelena“ kemija.....	2
1.3. Analiza nukleinskih kiselina.....	2
1.4. Fluorescentne boje i njihova vizualizacijska uloga.....	4
1.4.1. Cijaninske boje.....	6
1.4.2. Monometinski cijaninski derivati.....	8
<b>2. Hipoteza.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Ciljevi.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Materijali i metode.....</b>	<b>11</b>
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Ispitivani spojevi.....	11
4.3. Kemikalije.....	11
4.4. Ostali materijali.....	11
4.5. Genetički modificirani sojevi bakterija.....	12
4.5.1. <i>Salmonella typhimurium</i> .....	13
4.5.2. <i>Escherichia coli</i> .....	13
4.6. Amesov test mutagenosti.....	14
<b>5. Rezultati.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Rasprava.....</b>	<b>24</b>
<b>7. Zaključak.....</b>	<b>27</b>
<b>8. Sažetak.....</b>	<b>28</b>

<b>9. Summary</b> .....	29
<b>10. Literatura</b> .....	30
<b>11. Životopis</b> .....	36

## **Popis kratica:**

ddPCR – *digital droplet* PCR

DMSO – dimetil sulfoksid

EPA – Američka agencija za zaštitu okoliša

IPCS – International Programme on Chemical Safety

MCD – monometinski cijaninski derivati

$N_3Na$  – natrijev azid

NCI – Nacional Cancer Institute

OD – optička gustoća

PCR – lančana reakcija polimeraze

qPCR – kvantitativni PCR

RFLP – polimorfizmi duljine restrikcijskog fragmenta

TO – tiazol narančasta

TOTO – dimer tiazol narančaste boje

YO – oksazol žuta

YOYO – dimer oksazol žute boje

WHO – World Health Organization





## 1. UVOD

### 1.1. Mutacije i njihov značaj

Sposobnost izazivanja mutacija ili iznenadnih promjena genetičkog materijala predstavlja potencijalni zdravstveni rizik. Ovisno o vrsti stanica u kojima se odvijaju, mutacije se mogu klasificirati u dvije velike skupine: urođene i somatske mutacije (1). Urođene mutacije nastaju u germinativnim stanicama roditelja te se, nakon oplodnje, očituju u zigoti koja se dijeljenjem razvija u embrij. Takve mutacije prisutne su u svim stanicama embrija te su često letalne ili uzrokuju različite abnormalnosti fetusa. Somatske mutacije nastaju u bilo kojem trenutku od začeća i najčešće nastaju u jednoj stanici.

Geni su skloni mutacijama kao odgovor na zahtjeve evolucije kojima se održava i poboljšava prilagodba vrste okolišnim čimbenicima. Zbog toga su sve varijabilnosti među jedinkama posljedica mutacija u genetskom materijalu. Genske mutacije su točkaste mutacije koje nastaju spontano ili su inducirane. Spontane mutacije posljedica su pogreške tijekom replikacije deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid* – DNA) i najčešće se isprave procesom popravka koji posjeduje svaka stanica. Inducirane mutacije nastaju kao posljedica djelovanja različitih kemijskih i fizikalnih mutagena. Njihovo je djelovanje različito. Fizikalni mutageni poput ionizirajućeg zračenja uzrokuju lomove u molekulama DNA i drugim molekulama u stanicama te na taj način stvaraju slobodne radikale koji uzrokuju nizove lančanih reakcija u stanicama i mogu dovesti do promjena na molekulama DNA. Neionizirajuća zračenja utječu na integritet DNA i na taj način narušavaju uzvojitu strukturu DNA. Kemijski mutageni mogu uzrokovati promjenu specifičnosti vezanja baza i njihov gubitak. Analozi baza mogu se ugraditi umjesto neke baze i uzrokovati mutaciju jer se promijeni genetski slijed nukleotida. Neki, dovoljno mali, mutageni interkaliraju, a neki uzrokuju deaminaciju nukleotida (2). Kada stanični mehanizmi otkriju pogrešku, pokušaju je popraviti, a u slučaju neuspjeha pokrenu apoptozu. Međutim, stanični mehanizmi često previde pogreške nastale tijekom replikacije, ne pokrene se postupak popravka i nastane stanica s promijenjenom DNA koja može izgubiti nadzor nad staničnim umnažanjem, dobije sposobnost brzog dijeljenja, a kontrola staničnog ciklusa joj je poremećena. Nakon nekoliko ciklusa mitoze nastane niz takvih stanica s tumorskim obilježjima koje mogu progredirati u rak. U posljednjih nekoliko desetljeća, rak predstavlja velik javnozdravstveni problem. 2015. godine diljem svijeta umrlo je oko 8,8 milijuna ljudi od posljedica nekog oblika raka, a predviđa se da će taj broj porasti u budućnosti, između ostalog, i zbog starenja populacije (3).

Izazivanje kancerogenih promjena nije jedini razlog istaživanja mutagenih i ostalih štetnih svojstava kemikalija. Napredak znanosti i kemijske industrije rezultirao je brojnim štetnim procesima i produktima, kako prema čovjeku, tako i prema okolišu. Stoga je potrebno pronaći alternativne, manje štetne procese i kemikalije koji će zamijeniti postojeće (4).

## **1.2. „Zelena“ kemija**

Razvoj industrije i tehnologije donio je, osim gospodarskog porasta, degradaciju prirode te narušavanje ekološke ravnoteže što se očituje u klimatskim promjenama, nastajanju ozonskih rupa i nakupljanju nerazgradivih organskih tvari u svim dijelovima biosfere – atmosferi, vodi i tlu (4). Da bi se održala mogućnost življenja, potrebno je ponovno uspostaviti ravnotežu između ljudskog faktora i očuvanja okoliša. Polovicom dvadesetog stoljeća počela se buditi svijest među znanstvenicima o utjecaju čovjeka na okoliš i njegovim posljedicama te se rodila ideja o „zelenoj“ kemiji. Sve je počelo 1962. godine kada je Rachel Carson napisala knjigu *Silent Spring* koja govori o destruktivnim razmjerima kemikalija na lokalne ekosustave. 1970. godine osnovana je Američka agencija za zaštitu ljudskog zdravlja i okoliša, *U.S. Environmental Protection Agency*. Devedesetih godina osnovana je i pravno priznata „zelena“ kemija kao novo znanstveno polje, a svjetske razmjere ostvarila je 2001. godine kada je Green Chemistry Institute postao članom najveće profesionalne znanstvene zajednice u svijetu, American Chemical Society (5). Cilj je bio stvoriti nove generacije znanstvenika koji bi kreirali manje štetne ili bezazlene procese i kemikalije sa svrhom očuvanja okoliša. Prema definiciji Američke agencije za zaštitu okoliša (United States Environmental Protection Agency – EPA), „zelena“ kemija definirana je kao kemija koja dizajnira i konstruira produkte i procese neškodljive za okoliš te na taj način sprječava nastajanje zagađenja (6, 7). Potencijalna mutagenost velikog broja kemikalija može se utvrditi primjenom Amesova testa mutagenosti kako je prikazano u ovom radu.

## **1.3. Analiza nukleinskih kiselina**

Temelj je molekularne biologije i genetike, ali i ostalih područja medicinskih znanosti, analiza nukleinskih kiselina. Koristi se u dijagnostičke ili znanstveno-istraživačke svrhe. U dijagnostičkom smislu, to je metoda kojom se otkrivaju mutacije. Njezina primjena u kliničkoj praksi još nije dostatno zastupljena, iako su dokazani maligni procesi koji su povezani s mutacijama u točno određenim regijama DNA čije dokazivanje omogućuje prognozu tijeka i ishoda bolesti. Često se koristi u dijagnostici infekcija među kojima je najznačajnija molekularna dijagnostika virusnih infekcija, ali i bakterijskih za bakterije koje je

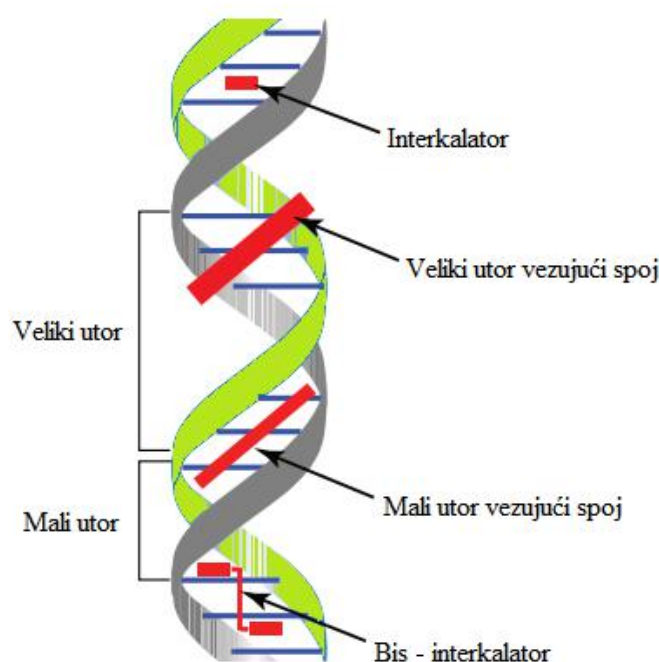
teško ili nemoguće uzgojiti tradicionalnim metodama kultivacije. Primjenu je našla i u području forenzike za dokazivanje očinstva i postmortalnih obiteljskih i rodbinskih veza. Analiza nukleinskih kiselina praktičnu ulogu nalazi i u znanstveno–istraživačkim svrhama. Omogućava istraživanje mutagenih i kancerogenih tvari sa svrhom prevencije nastanka malignih oboljenja. Isto tako, nepresušan je izvor u istraživanju antimikrobne i antitumorske terapije (8).

U osnovi, analiza se sastoji od izolacije i karakterizacije nukleinskih kiselina, deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid* – DNA) ili ribonukleinske kiseline (eng. *ribonucleic acid* – RNA). Za kvalitetan i koristan produkt analize potrebno je na pravilan način izolirati nukleinsku kiselinu jer svega nekoliko lanaca stranih nukleinskih kiselina može kontaminirati uzorak i rezultati su nepovratno izgubljeni (9). Najčešća primjenjivana metoda analize nukleinskih kiselina je elektroforeza na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu koja služi za procjenu kvalitete izoliranih nukleinskih kiselina, detekciju PCR (eng. *polymerase chain reaction*) produkta ili detekciju fragmenata dobivenih RFLP (eng. *restriction fragment length polymorphism*) metodom. Međutim, u posljednjih nekoliko desetljeća takva analiza ne odgovara na zahtjeve osjetljivosti i specifičnosti u odnosu na vrijeme trajanja analize i cijenu pa su razvijene brojne druge metode. Ciljevi su novijih metoda skraćivanje trajanja analize uz znatno povećanje osjetljivosti i specifičnosti za minimalnu količinu uzorka u prihvatljivim ekonomskim rasponima. Posljedica toga su različiti pristupi analizi nukleinskih kiselina. Jedan od njih je kvantitativni PCR (eng. *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR) kod kojeg se jačina fluorescentnog signala povećava nakon svakog ciklusa što se bilježi i u svakom trenutku ciklusa poznata je količina PCR produkta. Najzastupljenije sekvence stvaraju najveću količinu signala i one se prve detektiraju. Ipak, qPCR je relativno kvantitativna metoda jer se PCR produkt stavlja u odnos s kontrolnom sekvencom. Osim toga, konačan rezultat ovisi o brojnim drugim faktorima koji utječu na učinkovitost metode poput primera, trajanja amplifikacije i sastava baza (10). Stoga je razvijena metoda koja omogućuje kvantifikaciju koja ne ovisi o efikasnosti amplifikacije, a to je ddPCR (eng. *digital droplet PCR*). Ova metoda razrjeđuje i razdjeljuje uzorak s ciljnom sekvencom u kapljice malih volumena sve dok svaka kapljica ne sadrži jednu ili ni jednu ciljnu sekvencu koja se zatim amplificira. Rezultat se očitava kao broj kapljica koje proizvode signale i na taj se način detektira broj pojedinačnih molekula (11). Opisane su i druge tehnologije u mikrosustavima koje se mogu prilagoditi za različite analize gena poput genotipizacije nukleotidnih polimorfizma, detekcije DNA metilacije i analize genske

ekspresije, a uključuju *BeadArrays*, tj. skup paramagnetskih čestica obloženih fluorescentnom bojom ili barcodom (12). Neke od takvih metoda su analiza alternativnog prekrivanja na optičkim vlaknima (13) i sekvenciranje genoma u pikolitarskim reaktorima (14). Iduća generacija sekvenciranja uključuje još kraće odsječke DNA kao što to opisuje ion torrent metoda (10), treća generacija sekvenciranja je na razini molekule, odnosno nanosustav u obliku usb sticka (15). U svakom postupku nužna je vizualizacija produkta analize.

Za vizualizaciju nukleinskih kiselina koriste se različite male molekule koje se za nukleinsku kiselinu mogu vezati na nekoliko načina:

- vezanje za mali ili veliki utor DNA
- umetanje između parova baza, tj. interkaliranje
- ostali načini vezanja (16, 17) (Slika 1).



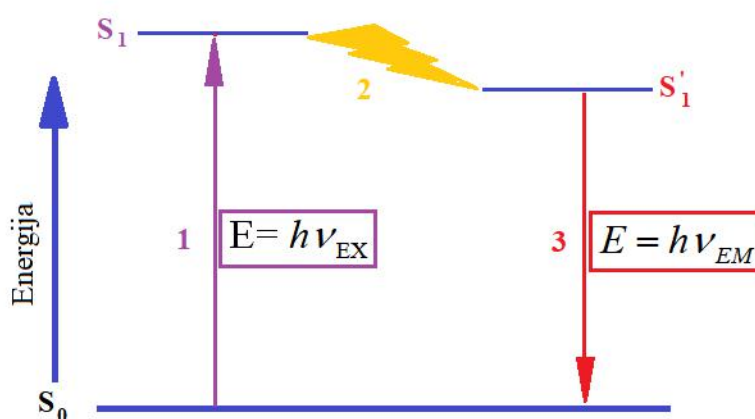
Slika 1. Princip vezanja boja na DNA (preuzeto (18) i prilagođeno).

#### 1.4. Fluorescentne boje i njihova vizualizacijska uloga

Sposobnost fluoresciranja molekula iskorištena je za vizualizaciju produkata različitih kemijskih reakcija te svojom širokom primjenom pridonosi u istraživanju bioloških i kemijskih reakcija. Fluorescentne boje su male molekule koje se specifično ili nespecifično vežu za nukleinske kiseline te se koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (17) (Slika 1).

Fluorescencija je biološka pojava koja se odvija u nekim molekulama, a to su uglavnom poliaromatski ugljikohidrati ili heterociklički spojevi koji se nazivaju fluorescentne boje ili fluorofori. Fluorescentna proba je boja dizajnirana tako da se specifično veže i reagira u točno određenom trenutku nakon pobuđivanja kao rezultat kemijske interakcije (19). Fluorescencija je rezultat procesa koji se odvija u tri stadija:

- Prvi stadij je stadij pobuđivanja ili ekscitacije u kojem foton energije  $E_1 = h\nu_{EX}$  iz vanjskog izvora (žarulja sa žarnom niti, laser) pogodi fluorofor koji potom prijeđe iz osnovnog,  $S_0$ , u pobuđeno,  $S_1$ , stanje.
- U drugom stadiju fluorofor se nalazi u pobuđenom stanju koje traje od 1 do 10 nanosekundi. U ovom stadiju fluorofor prolazi konformacijske promjene. Dio energije stvorene pobuđivanjem rasipa se pa fluorofor ostaje u pobuđenom stanju, ali s manjom energijom od energije pobuđivanja,  $S'_1$ .
- Treći stadij je stadij emisije u kojem fluorofor emitira energiju,  $E_2 = h\nu_{EM}$ . Emitirana energija uvijek je manja od ekscitacijske energije pa je shodno tome valna dulja emitiranog fotona veća. Fluorofor prelazi iz pobuđenog,  $S'_1$ , stanja u osnovno,  $S_0$ , stanje (Slika 2).



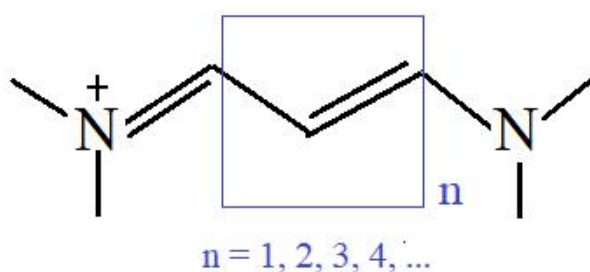
Slika 2. Ilustrirani princip fluorescencije (preuzeto (19) i prilagođeno).

Danas postoji puno komercijalnih boja za obilježavanje nukleinskih kiselina. Najbrojniji su derivati cijaninskih boja. Nakon otkrića i uvođenja u primjenu krajem 20. stoljeća, monometinski cijaninski derivati zauzimaju važno mjesto u vizualizaciji nukleinskih kiselina i velikim dijelom zamjenjuju etidijev bromid (20). Etidijev bromid je nakon otkrića 1967. godine zbog svojih karakteristika, među kojima prednjači velika sposobnost interkaliranja u

DNA, zauzeo mjesto osnovnog vizualizacijskog sredstva i time zamijenio gotovo sve ostale fluorescentne boje (21). Međutim, nekoliko desetljeća kasnije dokazano je da je iznimno genotoksičan što je potaknulo otvaranje novih smjerova u istraživanju fluorescentnih boja (22). Sintetizirane su brojne cijaninske boje od kojih su najpoznatije SYBR Safe, nemutagena alternativa za etidijev bromid, i SYBR Green, iznimno osjetljiva boja koja se koristi za vizualizaciju produkta kapilarne elektroforeze i Real-Time PCR-a (23). SYBR Safe koristi se za vizualizaciju DNA u agaroznom i akrilamidnom gelu, a svojom kemijskom strukturom je vrlo slična tiazol narančastoj (eng. thiazole orange – TO) cijaninskoj boji (24). Osim za vizualizaciju nukleinskih kiselina, postoji potencijal da se koristi za liječenje aspergiloze (25). Od ostalih cijaninskih boja poznate su PicoGreen, SYBR Green II, SYBR Gold i brojne druge (24).

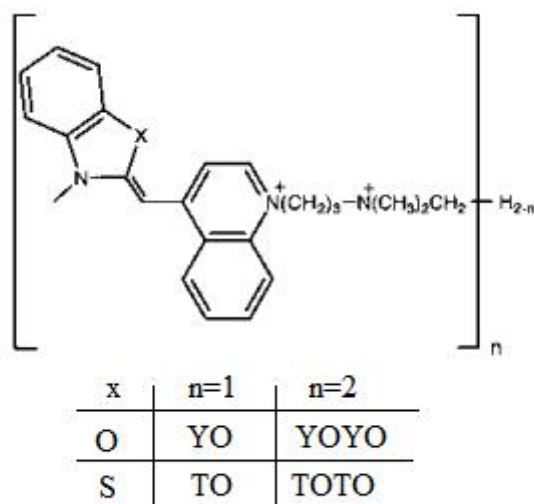
### 1.4.1. Cijaninske boje

Cijaninske boje jedne su od najstarijih sintetičkih boja sa širokom mogućnošću primjene u različitim područjima znanosti, tehnologije, farmakologije i medicine. Strukturno to su molekule koje sadrže polimetinski most između dva dušikova atoma s delokaliziranim nabojem (Slika 3).



Slika 3. Strukturna formula cijaninskih boja (preuzeto (26) i prilagođeno).

Zbog svoje strukture imaju vrlo visok koeficijent ekscitacije, a različiti supstituenti omogućuju promjenu svojstava kromofora kao što su apsorpcijska valna duljina i fluorescencija. Prva upotreba bila je za izradu fotografije u boji, visokoenergetske lasere i pohranu digitalnih fotografija (26). Osamdesetih godina dvadesetog stoljeća otkriveno je svojstvo fluoresciranja tiazol narančaste (TO), a ubrzo je isto svojstvo otkriveno i za oksazol žutu (eng. oxazole yellow – YO). Međutim, monomeri tih boja slabo su fluorescirali te je daljnjim istraživanjima dokazano da dimeri YOYO i TOTO stvaraju jači signal što je otvorilo niz studija u tom smjeru (27) (Slika 4).



Slika 4. Kemijska struktura osnovnih monometinskih cijaninskih boja YOYO i TOTO (preuzeto (28) i prilagođeno).

Cijaninske boje koje se koriste za analizu nukleinskih kiselina molekularne su probe i dijele nekoliko osobina po kojima se izdvajaju iz velike skupine cijaninskih boja:

- visoka molarna apsorbivnost s faktorom ekstincije većim od  $50\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  u vidljivom dijelu spektra
- vrlo mala intrizična fluorescencija s kvantnim prinosom manjim od 0.01 kada molekula boje nije vezana za nukleinsku kiselinu
- veliko povećanje fluorescencije nakon vezanja za nukleinsku kiselinu
- umjeren do vrlo visok afinitet za nukleinske kiseline s malim ili nikakvim afinitetom prema drugim molekulama (17, 29).

Raspon emisijskog spektra fluorescencije seže od vidljivog dijela spektra do gotovo infracrvenog dijela s dodatnim apsorpcijskim maksimumima u UV dijelu spektra što omogućava kompatibilnost s brojnim uređajima (30). Cijaninske boje razlikuju se po fizikalnim svojstvima među kojima se ističu različite sposobnosti prelaska kroz staničnu membranu i specifičnost za nukleinske kiseline (17, 30). U posljednjih nekoliko godina sintetizirane su brojne nove simetrične i asimetrične cijaninske boje koje imaju sposobnost različitog vezanja za DNA (Slika 1) (31). Osim za obilježavanje nukleinskih kiselina, dokazana je sposobnost specifičnog vezanja za viabilne bakterije čime je omogućeno razlikovanje živih od mrtvih bakterijskih stanica što je korisno za sanitarnu i prehrambenu



industriju (32). Cijaninske boje u ostalim znanstvenim sektorima imaju različite funkcije: indikatori su za kiseline, odnosno baze u kemijskim reakcijama, sudjeluju u razvijanju antitumorske, antibakterijske i antifungalne terapije te su obilježivači različitih bioloških molekula, koriste se u izradi fotografija i za optički snimljene diskove (CD, DVD) i neprekidan su izvor novih otkrića (33).

#### 1.4.2. Monometinski cijaninski derivati

Monometinski cijaninski derivati (eng. monomethine cyanine dyes – MCD) velika su skupina spojeva male molekulske mase koji se zbog drugačije kemijske strukture izdvajaju iz velike skupine cijaninskih boja. Za razliku od polimetinskih cijaninskih boja (Slika 3), monometinske imaju jedan metenski most između dvaju prstena cikličkih ugljikohidrata, odnosno između dvaju monomera (Slika 5).



Slika 5. Kemijska struktura monometinskih cijaninskih boja.

Devedesetih godina dvadesetog stoljeća, u potrazi za novim stabilnim interkalirajućim fluorescentnim bojama, objavljeni su brojni radovi o cijaninskim bojama. Od tada je sintetiziran velik broj novih cijaninskih boja koje su zamijenile etidijev bromid i ostale fluorescentne boje. Homodimeri monometinskih derivata sintetizirani su od dvije osnovne monomerske boje: tiazol narančaste (TO) i oksazol žute (YO) (Slika 4). Za DNA se vežu na različite načine, a najčešće je to nekovalentnom vezom za veliki ili mali utor ili se kao interkalator umeću među nukleotide. U posljednjih nekoliko desetljeća kreirani su različiti procesi sinteze MCD i sintetizirane su brojne simetrične i asimetrične monometinske cijaninske boje (34, 35). Neke se razlikuju u svega jednom supstituentu koji mijenja fizikalna svojstva boje s ciljem pronalaska idealne boje koja bi odgovarala na zahtjeve specifičnosti, dostupnosti, kvalitete i financijske pristupačnosti (35). Osim funkcije vizualizacijskog sredstva, zbog svojih osobina i mehanizama djelovanja istražuje se antiproliferativno djelovanje MCD koje bi se moglo primijeniti u antitumorskoj terapiji (36). Prije nego što se počnu primjenjivati u kliničkoj praksi, potrebno je istražiti postoje li eventualni štetni učinci na normalnim stanicama. Drugim riječima, potrebno je istražiti hoće li monometinski cijaninski derivati djelovati mutageno i time stvoriti nove mutacije koje nose potencijalni rizik za tumorogenezu.

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja je da razlika u kemijskoj strukturi ciljnih monometinskih cijaninskih derivata utječe na njihovu mutagenu sposobnost.

### 3. Ciljevi

Prvi od dva cilja ovog istraživanja je ispitati mutagena svojstva dvaju novih monometinskih cijaninskih derivata na genetički modificiranim sojevima bakterija *Escherichia coli* WP2 i *Salmonella typhimurium* TA100 i TA1535. Drugi cilj je utvrditi utječe li razlika u kemijskoj strukturi monometinskih cijaninskih derivata na sposobnost izazivanja mutacija.

## 4. Materijali i metode

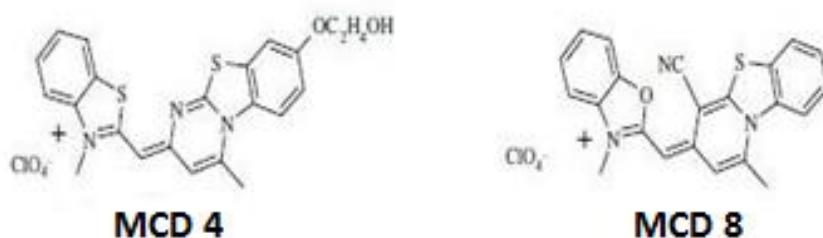
Rad je napravljen u sklopu projekta „Mutagenost monometinskih cijaninskih derivata" VIF-2016-MEFOS.

### 4.1. Ustroj studije

Studija je pokusno (eksperimentalno) istraživanje.

### 4.2. Ispitivani spojevi

U istraživanju se ispituje mogući mutageni učinak dvaju monometinskih cijaninskih derivata, MCD 4 (eng. Monomethine cyanine dye) i MCD 8. MCD 4 je kratica koja se u radu koristi za 2-[(3-metil-(3H)-benzotiazol-2-iliden)-metil]-4-metil-8-(2-hidroksietoksi)-benzotiazol-[3,2-a]-pirimidin-5-ium perklorat, a MCD 8 za 2-[(1-cijano-4-metil-(3H)-benzotiazolo-[3,2-a]-pirido-2-iliden)-metil]-3-metilbenzooksazolium perklorat (Slika 6). Ispitivani spojevi pripremljeni su u Institutu za organsku kemiju i Centru za fitokemiju u Sofiji (Bugarska). Za potrebe *in vitro* istraživanja, monometinski cijaninski derivati pripremljeni su kao koncentracije otopina molarne koncentracije  $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> (M). Za pripremu koncentrata ispitivanog spoja MCD 4 otopljeno je 0,0058 g MCD 4 u 1140  $\mu$ l sterilne destilirane vode. Za pripremu koncentrata ispitivanog spoja MCD 8 otopljeno je 0,0048 g MCD 8 u 1020  $\mu$ l sterilne destilirane vode.



Slika 6. Kemijska struktura MCD 4 i MCD 8.

### 4.3. Kemikalije

- hranjivi medij za umnažanje bakterija Oxoid br. 2; Molecular Toxicology, Inc (MOLTOX), Boone (Sjeverna Karolina, SAD)
- histidin/biotin top agar; Molecular Toxicology, Inc (MOLTOX), Boone (Sjeverna Karolina, SAD)
- natrijev azid; Acros Organics, Geel (Belgija)
- sterilna destilirana voda
- DMSO; Molecular Toxicology, Inc (MOLTOX), Boone (Sjeverna Karolina, SAD)
- ploče s minimalnim glukoznim agarom; Molecular Toxicology, Inc (MOLTOX), Boone (Sjeverna Karolina, SAD)
- ST Quad ploče za genotipizaciju; Molecular Toxicology, Inc (MOLTOX), Boone (Sjeverna Karolina, SAD)
- diskovi kristal violeta; Molecular Toxicology, Inc (MOLTOX), Boone (Sjeverna Karolina, SAD).

### 4.4. Ostali materijal

- 3 sterilne Erlenmeyerove tikvice
- pipete od 10 ml, 2 ml, 1000  $\mu$ l i 100  $\mu$ l
- odgovarajući nastavci za pipete
- 4 sterilne pincete
- termostat
- mikrovalna pećnica
- vodena kupelj
- nitrilne rukavice
- Eppendorf epruvete

- plastični držač za epruvete
- vaga
- laboratorijska žlica
- Vortex
- Falcon epruvete
- držač za epruvete
- flomaster
- inkubator namješten na 37 °C.

Prikupljene su kemikalije i materijal potrebni za izvođenje Amesovog testa mutagenosti prema postupku koji su opisali Maron i Ames (37), te Mortelmans i Zeiger (38) za ispitivanje na sojevima *Salmonellae*, odnosno za sojeve *E. coli* koji su opisali Mortelmans i Riccio (39).

#### **4.5. Genetički modificirani sojevi bakterija**

U Amesovom testu koristi se nekoliko bakterijskih sojeva koji su ovisni o različitim aminokiselinama, ali svaki soj ima drugačiju mutaciju u operonu za pojedinu aminokiselinu. Zajedničko im je da ne mogu rasti na hranjivoj podlozi s minimalnom količinom glukoze bez aminokiseline čiji je gen za sintezu isključen nekom mutacijom. Kolonije će se formirati samo ako se u podlogu doda aminokiselina koja je neophodna za rast ili tvar koja će izazvati reverznu mutaciju za esencijalnu aminokiselinu pa će mutirane bakterije biti sposobne same je sintetizirati. U testu se u podlogu dodaju tragovi za rast neophodne aminokiseline da se stvore uvjeti za umnažanje nekoliko bakterijskih generacija kako bi se stvorila mogućnost mutiranja.

##### **4.5.1. *Salmonella typhimurium***

Salmonele koje se koriste u testovima imaju mutacije u operonu za histidin koje su genetičkim inženjeringom precizno dizajnirane da na različite mutagene odgovore različitim mehanizmima. Svaka mutacija dizajnirana je da stvori vrlo osjetljiv soj bakterija na širok spektar različitih kemijskih supstancija (37, 38, 40).

U ovom istraživanju koristila su se dva soja *Salmonellae typhimurium*, TA100 i TA1535. Svaki soj nosi različit, ali poznat oblik mutacije u operonu za histidin. Soj TA100 posjeduje

mutaciju u *hisG46* alelu, tj. supstitucijom baza za leucin (GAG/CTC) posjeduje baze za prolin (GGG/CCC). Mutageni koje uzrokuju supstituciju parova baza primarno GC para, ovom soju omogućit će reverznu mutaciju čime će ponovno nositi gensku uputu za leucin (38). U ovom soju DNA meta je –G –G –G–regija.

Soj TA1535 posjeduje iste mutacije kao soj TA100, mutacije u *hisG46* alelu, međutim soj TA1535 nastao je uklanjanje plazmida pKM101. Plazmid pKM101 pojačava posljedice ultraljubičastog zračenja i kemijski inducirane mutageneze jer povećava broj pogrešaka tijekom rekombinacijskog DNA popravka. S obzirom da soj TA98 i TA100 posjeduju plazmid, on ih čini osjetljivijim na DNA oštećenja. Plazmid omogućuje rezistenciju na ampicilin što je vrlo pogodan način za njegovo otkrivanje (38). Osim toga, soj TA1535 ima promijenjen stanični zid (*rfa*) koji povećava staničnu permeabilnost za određene spojeve veće molekulske mase. Posjeduje oštećenje u genu koji kodira DNA popravak, *uvrB* gen, što rezultira povećanjem osjetljivosti na mutagene. S obzirom da to DNA oštećenje uključuje i gen za sintezu biotina, biotin je neophodan za uzgoj spomenutih sojeva.

#### 4.5.2. *Escherichia coli*

Osim sojeva salmonele, u istraživanju se koristi WP2 soj *E. coli*. Kako sojevi salmonele sadrže mutacije u operonu za histidin što ih čini ovisnim o histidinu, tako je WP2 soj *E. coli* ovisan o triptofanu. WP2 soj *E. coli* sadrži terminalnu mutaciju u *trpE* genu koja uključuje AT par baza čime se blokira biosinteza triptofana jer taj gen kodira antranilat sintazu koja prethodi biosintezi triptofana (39, 41). Ciljno mjesto mutagenog učinka kemikalija je besmislena (eng. nonsense, ochre) mutacija u UAA sekvenci (stop kodon) na mRNA koja služi za sprječavanje sinteze triptofana. Reverzna mutacija može nastati na izvornome mjestu promjenom jedne baze ili negdje na kromosomu tako da se potisne prva mutacija (39). Postoji nekoliko sojeva *E. coli* s mutacijom u *trpE* genu od kojih su najčešće korištene:

- WP2 (wild type)
- WP2 (pKM101)
- WP2 *uvrA*
- WP2 *uvrA* (pKM101).

Za WP2 *uvrA* soj dokazana je ekstremna osjetljivost na UV radijaciju kao i sposobnost reverzne mutacije u triptofan neovisan soj, a WP2 *wild type* soj korišten je za istraživanje DNA popravaka. Ako je u nekom soju prisutan plazmid pKM101 koji djeluje identično kao i

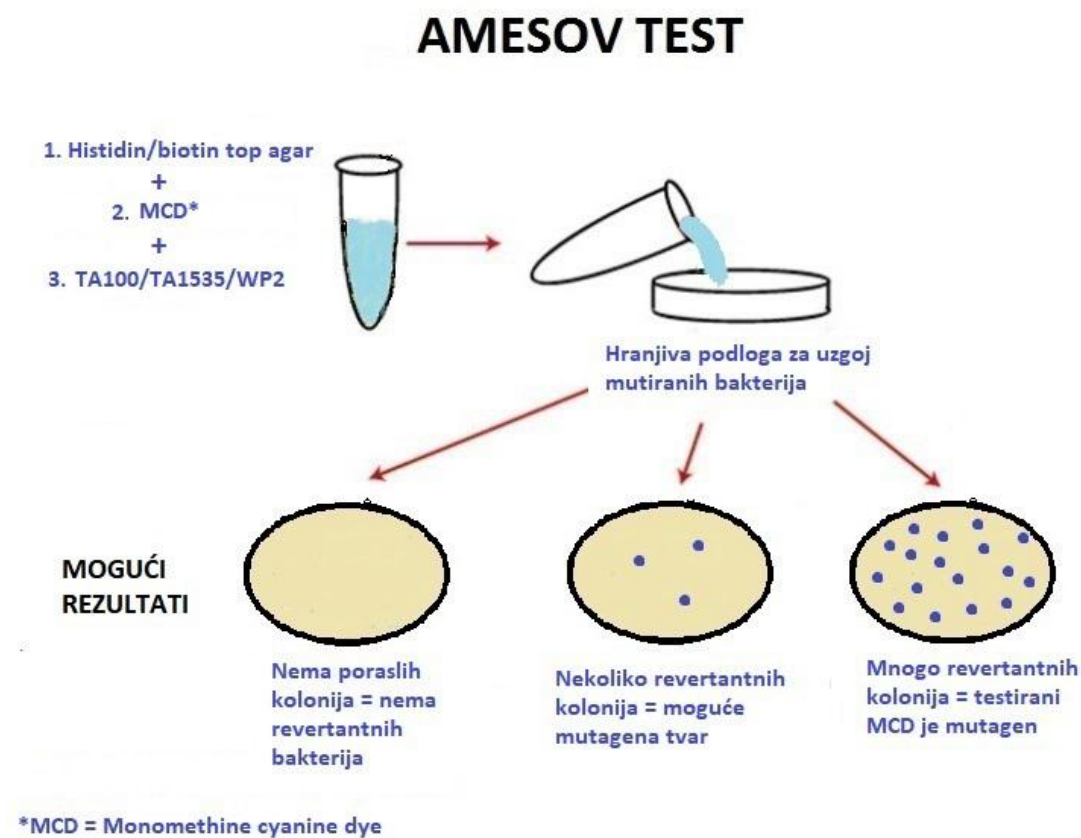
u sojevima salmonele, tada u medij treba dodati više triptofana za uzgoj triptofan ovisnih bakterija. Ako je u soju prisutan *uvrA* gen kojem nedostaje popravak izrezivanjem, izlaganje UV zračenju može biti letalno (41). Treba obratiti pažnju na prisutnost tih gena u sojevima jer o njima ovisi očitavanje rezultata pokusa.

#### **4.6. Amesov test mutagenosti**

Amesov test ili mikrosomski test mutagenosti (eng. *microsome mutagenicity test*) je kratkotrajni test utemeljen na reverznim mutacijama bakterija dizajniranih za detekciju genetskih mutacija. S obzirom da je test po otkriću primjenjivan na sojevima *Salmonelae* spp., a najčešće na soju *Salmonella typhimurium*, još se naziva Amesov Salmonela test ili Salmonela test mutagenosti. Dobio je naziv po američkom biokemičaru i znanstveniku koji je ga otkrio i uspješno primijenio, profesoru Bruceu Nathanu Amesu. Izvođenjem niza pokusa, otkriveni su i mapirani geni salmonele koji su odgovorni za sintezu histidina te oblici mutacija koji variraju od promjene jedne baze pa sve do delecije čitavog gena (37). Nakon toga otkriveno je da se mutacije, odnosno isključenje tih gena, mogu iskoristiti za komercijalnu proizvodnju sojeva bakterija koje će se koristiti u svrhu detekcije mutagenih svojstava različitih kemikalija. Zbog karakteristika bakterijskih sojeva, test je jedinstveno prilagođen za istraživanje mutagenih učinaka različitih kemijskih tvari. Nekoliko se sojeva razlikuje u odgovoru na DNA oštećenja uzrokovana kemijskim mutagenima i zato se test generalno izvodi paralelno na nekoliko različitih sojeva. Svaki soj specifično reagira na mutagene kemikalije prema specifičnom DNA oštećenju u operonu za neku aminokiselinu. U svakom slučaju, izlaganje mutagenim kemikalijama rezultirat će reverznim mutacijama u operonu za isključenu aminokiselinu tako da je opet mogu sintetizirati. Salmonela test mutagenosti zasniva se na razlikovanju između histidin ovisnih i histidin neovisnih sojeva. Prema tome, bakterije se nasaduju na hranjivu podlogu koja sadrži tragove histidina koji omogućuju nekoliko staničnih dioba da bi se mutacija „popravila“. Dodani histidin iz podloge ubrzo se potroši i time se zaustavlja rast nemutiranih bakterija, tj. o histidinu ovisnih bakterija dok će mutanti, odnosno o histidinu neovisne bakterije početi sintetizirati histidin i nastaviti rasti. Revertantne kolonije porasle na hranjivoj podlozi s tragovima histidina predstavljaju o histidinu neovisne bakterije koje su mutirale spontano ili uslijed mutagenog učinka. Zbog tog svojstva test se često naziva reverznim (38). Uvijek postoji određeni broj bakterija koje spontano mutiraju te porastu na podlogama siromašnim histidinom, međutim, broj tih kolonija relativno je mali i uglavnom stalan te u korelaciji s negativnom kontrolom dok je broj



revertantnih kolonija koje su posljedica mutagenog učinka kemijske tvari značajno povećan i u korelaciji s količinom mutagene tvari (39) (Slika 7).



Slika 7. Princip Amesova testa (preuzeto (42) i prilagođeno).

Nakon otkrića, funkcija ovog testa bila je široko prepoznata i danas se koristi u cijelom svijetu kao inicijalni probir za određivanje potencijalno mutagenog učinka novih kemijskih supstanci i lijekova. Iako je Amesov test primjenjiv na velik broj kemikalija i služi za detekciju genotoksičnosti, postoji nekoliko elemenata na koje valja obratiti pažnju prije i tijekom izvođenja testa te pri tumačenju rezultata:

- Test se izvodi na prokariotskim stanicama koje se razlikuju od eukariotskih po brojnim faktorima kao što su metabolizam, kromosomske strukture i biokemija DNA.
- Test se izvodi *in vitro* i ne može u potpunosti imitirati *in vivo* uvjete sisavaca.

- Koristi se kao inicijalni *screening test* za ispitivanje genotoksičnosti i mutagene indukcije te stoga nije konačan dokaz mutagenosti kemikalija, nego upućuje na daljnja testiranja.
- Zbog razlike u metabolizmu prokariotskih i eukariotskih stanica, test može biti negativan na neke kemikalije koje su genotoksične za eukariotske stanice.
- Testom se ne mogu ispitivati kemikalije koje imaju baktericidno djelovanje ili specifično djeluju na replikacijski sustav eukariotskih stanica koji se razlikuje od replikacijskog sustava prokariotskih stanica.
- Rezultati testa nisu u apsolutnoj korelaciji s rezultatima na eukariotskim stanicama sisavaca i trebaju se provesti dodatna ispitivanja na staničnim kulturama sisavaca s ciljem potvrđivanja ili odbacivanja rezultata (43).

Evaluacija postupka obavljena je prema postupku koji su opisali Maron i Ames (37), a bakterijski sojevi primjenjeni su prema načinu koji su opisali Mortelmans i Zeiger za sojeve *Salmonellae* (38) te Mortelmans i Riccio za sojeve *E. coli* (39).

**Postupak:** Postupak je proveden prema MOLTOX-ovoj uputi bez S9 sustava aktivacije enzima.

Bakterijski sojevi s ispitivanim spojevima i kontrolama nasađeni su na minimalni glukozni agar s histidin/biotin top agarom (49 ploča za kultivaciju). Ispitivanje je izrađeno u duplikatima za svaki bakterijski soj. Ispitivani spojevi MCD 4 i MCD 8 pripremljeni su u tri različite koncentracije:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  M kako preporučuju Maron i Ames (39). Kao pozitivna kontrola korišten je  $N_3Na$  (natrijev azid) u koncentraciji od  $1,9 \cdot 10^{-2}$  M ( $\text{mol/dm}^3$ ) (0,012 g natrijeva azida otopljeno je u 9,7 ml sterilne destilirane vode) za sojeve *S. typhimurium*, TA100 i TA1535. Za testirani soj *E. coli*, WP2 nije korištena pozitivna kontrola. Kao negativna kontrola korišten je DMSO i sterilna destilirana voda za sva tri bakterijska soja. Nasađivanje bakterijskih kulutra odvijalo se prema istom obrascu. U Falcon epruvetu otpipetirana su 2 ml histidin/biotin top agara (otopljen je u mikrovalnoj pećnici, a zatim smješten u vodenu kupelj na 45 °C da bi zadržao tekuće stanje), dodano je 100  $\mu\text{l}$  ispitivanog spoja i 100  $\mu\text{l}$  koncentrata jednog bakterijskog soja. Uspješnosti umnožanja bakterija provjerena je spektrofotometrijski. Očitana je OD (eng. optical density) na 660 nm za što je utrošeno 3 ml bakterijskog koncentrata. Za pozitivnu kontrolu umjesto ispitivanog spoja

dodano je 100  $\mu$ l natrijevog azida, a za negativne kontrole 100  $\mu$ l DMSO ili 100  $\mu$ l sterilne destilirane vode. Kultivacija je trajala 48 h na 37 °C.

Umnažanje bakterijskih sojeva, tj. priprema koncentrata bakterijskih sojeva, odvijala se u aseptičnim uvjetima. U sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu sa sterilnim nastavkom otpipetirano je 20 - 25 ml hranjivog medija Oxoid br. 2 za umnažanje bakterija te su dodani diskovi liofiliziranih bakterija pomoću sterilne pincete. Stavlja se jedan disk liofiliziranih bakterija na zadani volumen hranjivog tekućeg medija. Erlenmeyerova tikvica s bakterijama stavlja se u inkubator s mućkalicom/tresalicom na 37 °C i 150 rpm. Inkubacija ne smije trajati duže od 16 sati radi postizanja optimalne vijabilnosti bakterijskih sojeva. Nakon inkubacije, koncentrat umnoženih sojeva pohranjuju se u hladnjaku na +4 °C do izvođenja testa.

Za provjeru genotipa bakterijskih kultura *S. typhimurium*, sojeva TA100 i TA1535, korištene su ST Quad ploče na koje su sterilnim brisom nasađeni bakterijski sojevi iz bakterijskih koncentrata. Sterilnom pincetom stavljeni su diskovi kristal violeta te su inkubirane 48 h na 37 °C.

Nakon 48 h inkubacije, očitani su i zabilježeni rezultati kao broja poraslih kolonija izbrojanih ljudskim okom. Očitani su i zabilježeni rezultati na ST Quad pločama na kojima se prema fenotipu određuje genotip nasađenih bakterijskih sojeva.

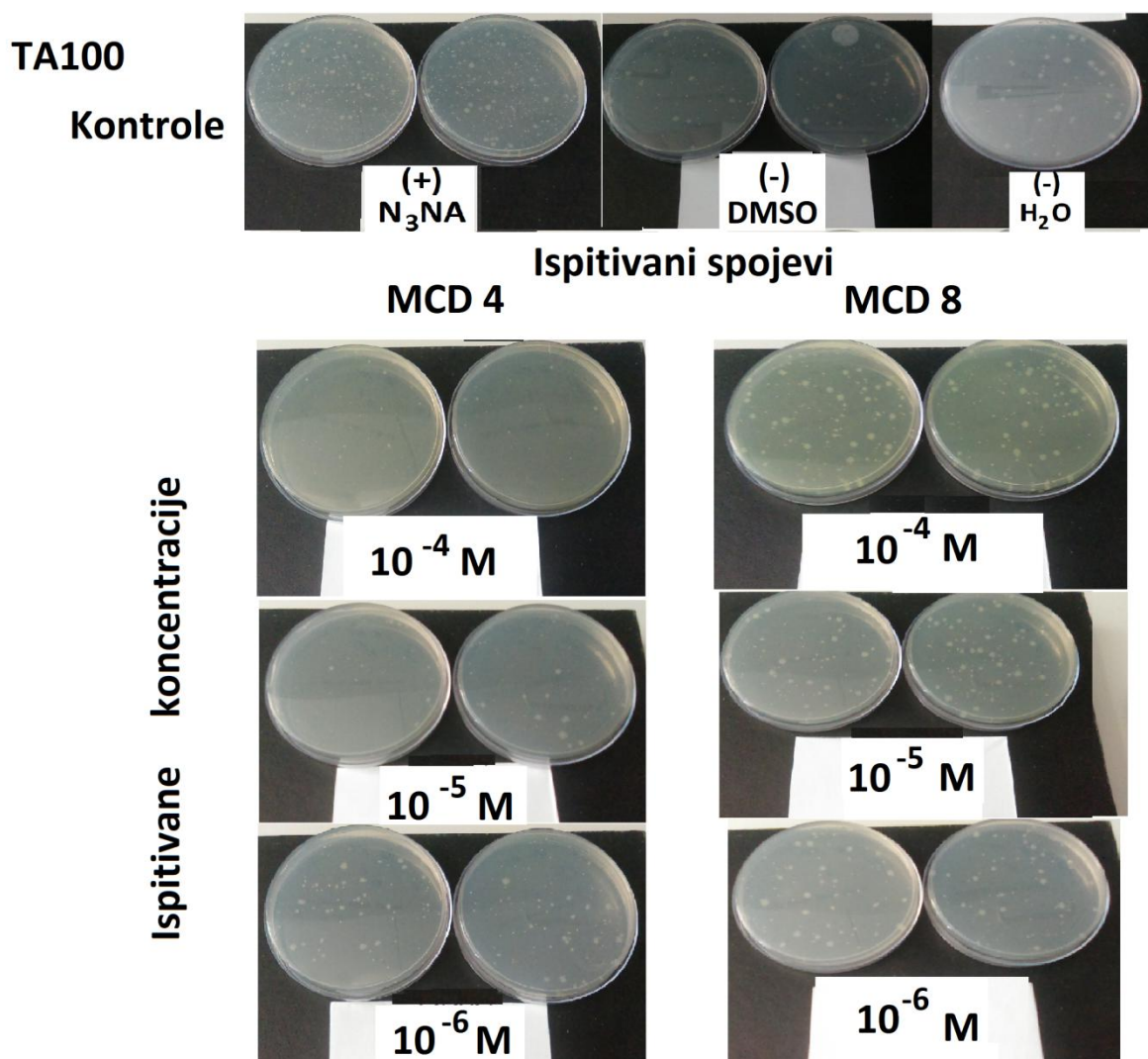
Test za provjeru genotipa na ST Quad pločama za TA100 i TA1535 sojeve korišten je prema uputi proizvođača. Analizom testa potvrđeno je da testirani sojevi bakterija doista imaju genotip kakav je proizvođač opisao što test čini vjerodostojnim (Tablica 1).

Tablica 1. Test za provjeru genotipa korištenih bakterijskih sojeva, TA100 i TA1535.

Sektor	Opaska od proizvođača	Rezultati		Genotip
		TA100	TA1535	
I	Nema porasta (za sve sojeve)	Nema porasta	Nema porasta	<i>his-</i>
II	Zona inhibicije oko diska kristal violeta (za sve sojeve)	Zona inhibicije oko diska kristal violeta	Zona inhibicije oko diska kristal violeta	<i>rfa</i>
III	Porast	Porast	Nema porasta	pKM101
IV	Nema porasta	Nema porasta	Nema porasta	pAQ1 (prisutan samo u TA102 soju)

## 5. Rezultati

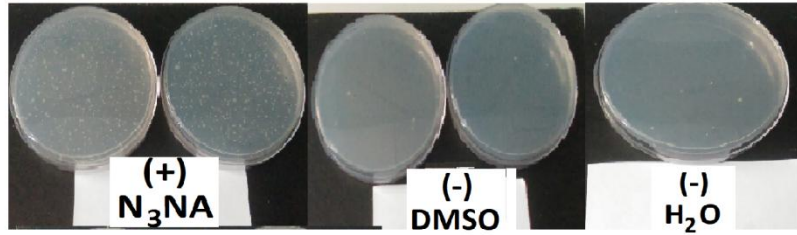
Mogući mutageni učinak monometinskih cijaninskih derivata MCD 4 i MCD 8 istražen je na trima genetski modificiranim bakterijskim sojevima kreiranim za provođenje Amesova testa mutagenosti: *Salmonella typhimurium* TA100 i TA1353 te *Escherichia coli* WP2. Svaki od navedena tri bakterijska soja bio je testiran na dva monometinska cijaninski derivata u tri različite koncentracije:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  M. Testiranje je provedeno u duplikatima. Rezultati su prikazani na slikama 8. a), 8. b) i 8. c), a prikazuju broj revertantnih kolonija, odnosno broj poraslih kolonija na minimalnom glukoznom agaru deficijentnom na isključenu aminokiselinu.



8. a)

TA 1535

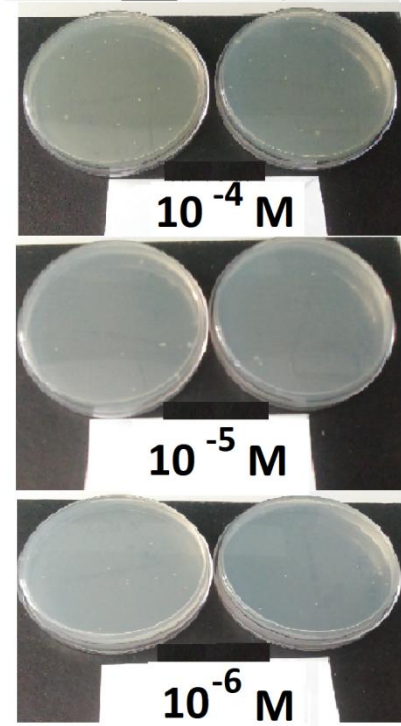
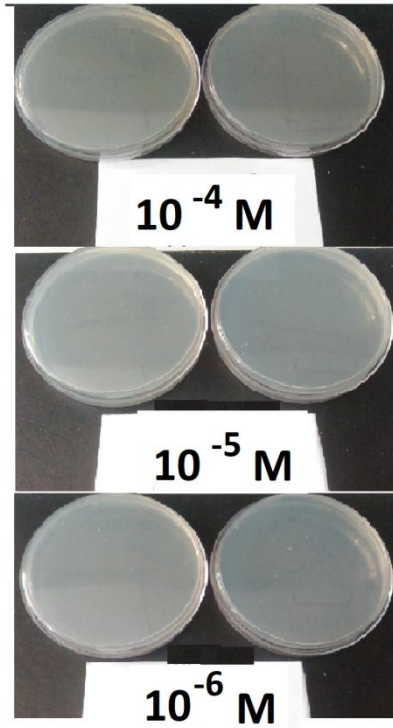
Kontrole



Ispitivani spojevi  
MCD 4

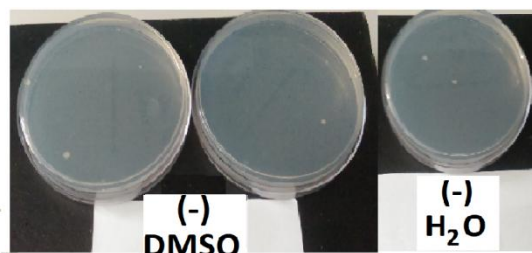
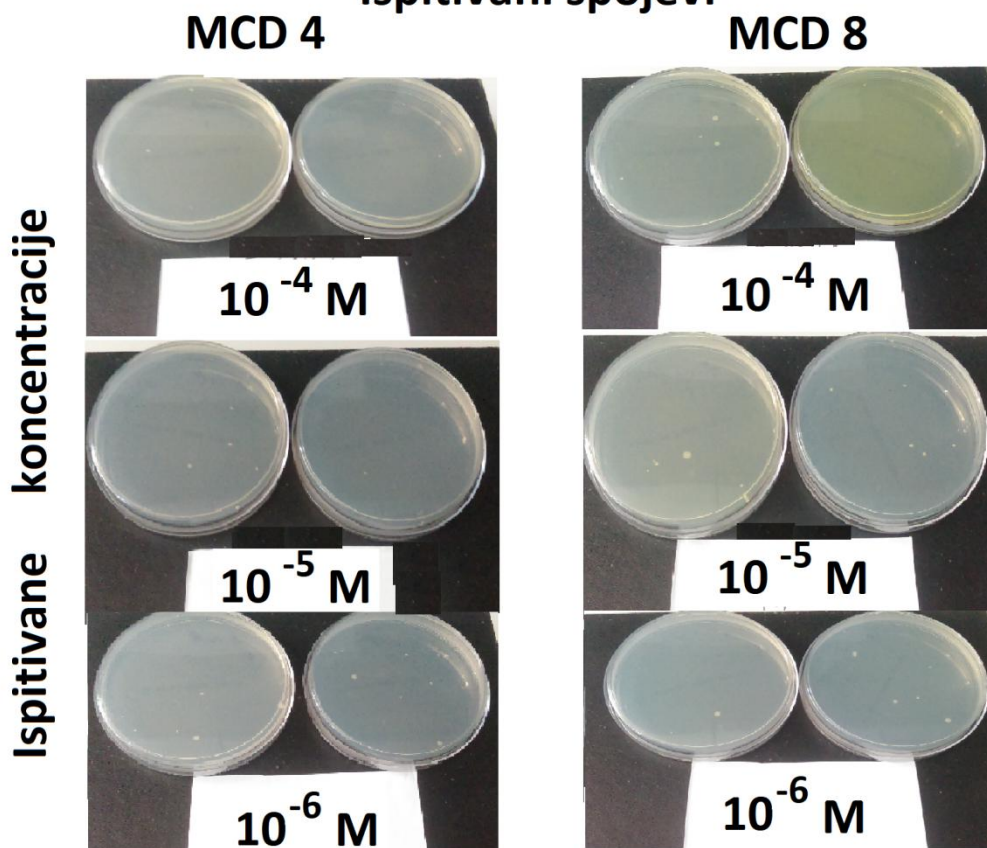
MCD 8

Ispitivane koncentracije



8. b)

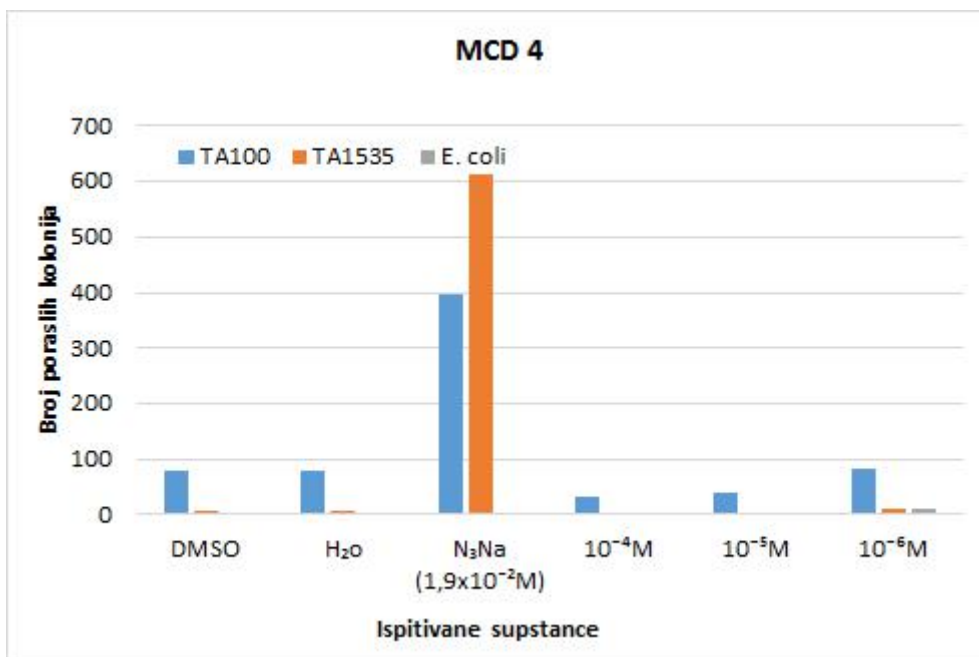


**E. coli WP2****Kontrole****Ispitivani spojevi**

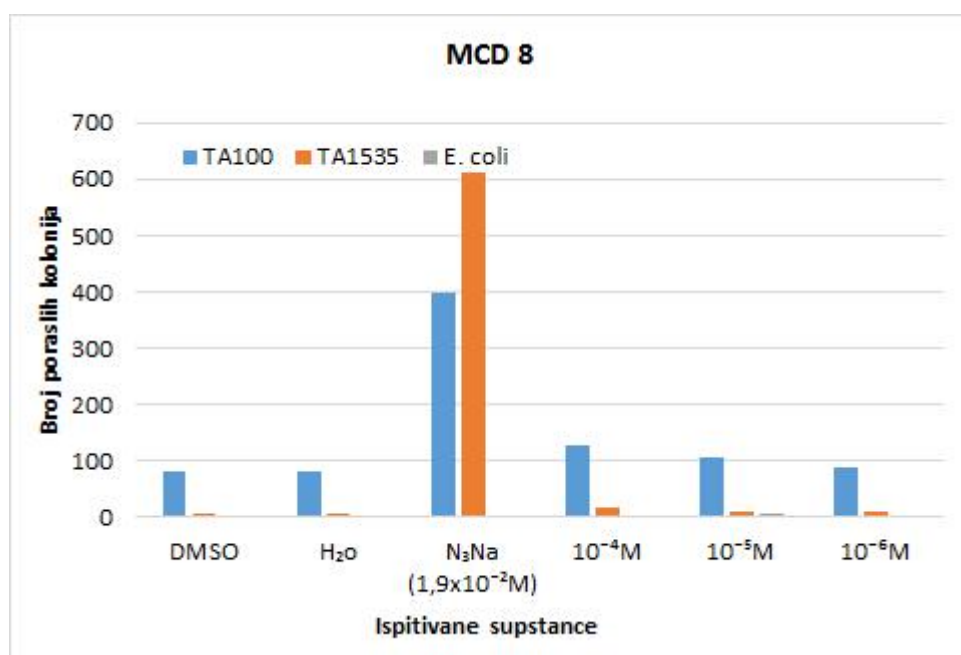
8. c)

Slika 8. Rezultati ispitivanja mogućeg mutagenog učinka MCD 4 i MCD 8. Spojevi su ispitivani na trima bakterijskim sojevima: a) TA100, b) TA1535 i c) WP2, u tri koncentracije, ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  M), u duplikatu prema Ames protokolu.

Odnos između broja poraslih kolonija, kontrola i koncentracija ispitivanih monometinskih cijaninskih derivata prikazan je na slici 9.



9. a)



9. b)

Slika 9. Odnos između broja poraslih kolonija na kontrolama i ispitivanim spojevima: a) MCD 4 i b) MCD 8. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost dvaju ponavljanja za svaku supstancu ((-)kontrola - DMSO, H<sub>2</sub>O; (+) kontrola – N<sub>3</sub>Na; testni derivati) u ispitivanim koncentracijama (10<sup>-4</sup> – 10<sup>-6</sup> M).



## 6. Rasprava

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization – WHO) i Američkog nacionalnog centra za rak (National Cancer Institute – NCI), rak je jedan od vodećih zdravstvenih problema, a posljedica je promjena u genetičkom materijalu koje su nasljeđene ili posljedica utjecaja faktora rizika između kojih su neke kemikalije (3,44). Krajem 20. stoljeća, IPCS (International Programme on Chemical Safety) objavio je preporuke za testiranje mutagenosti kemikalija (45) što je omogućilo, ispitivanjem genotoksičnosti, zamjenu mutagenih kemikalija nemutagenim. Danas je ta tema jedan od vodećih trendova u znanstvenim područjima, posebno u kemiji s visokim potencijalom razvoja industrije u tom smjeru.

Karakteristike monometinskih cijaninskih derivata, među kojima su MCD 4 i MCD 8, već su objavljene te je objašnjeno zašto su prikladne za korištenje kao nekovalentno vezujuće DNA fluorescentne probe (46). Veliki interes su pobudili zbog svojstva dobrog vezanja za nukleinske kiseline (jednolančane i dvolančane) i iznimnog svojstva fluorescencije što je iskorišteno za anлізу nukleinskih kiselina, ali i drugih bioloških molekula (32). Princip vezanja cijaninskih boja je različit. Jedan od njih je interkaliranje između parova baza (29). Bolje karakteristike pokazuju za veliki i mali utor vezujući spojevi (29, 32). Obzirom da isti princip vezanja imaju neki kemijski mutageni, potrebno je ispitati moguće mutageno djelovanje cijaninskih boja. Kako do sada nije istražena genotoksičnost monometinskih cijaninskih derivata, MCD 4 i MCD 8, Amesovim testom, istraživanje je prikazano u ovom radu.

Na temelju rezultata dobivenih Amesovim testom mutagenosti u ovom istraživanju, vidljivo je kako niti jedan od ispitivanih monometinskih cijaninskih derivata ne inducira značajan porast revertantnih bakterijskih kolonija.

Na slici 8. a) i 9. a) vidljiv je porast broja kolonija obrnuto proporcionalno porastu koncentracije ispitivanog spoja MCD 4 na TA100 bakterijskom soju. Štoviše, broj revertantnih kolonija na testiranom soju pri koncentracijama od  $10^{-4}$  i  $10^{-5}$  M, manji je od broja kolonija poraslih na negativnim kontrolama, DMSO i  $H_2O$ . Taj rezultat čini ispitivani monometinski cijaninski derivat potencijalno baktericidnim, jer se povećanjem razrjeđenja povećava i broj poraslih kolonija.

Na slici 8. a) i 9. b) uočeno je još jedno odstupanje u rezultatima od ostalih bakterijskih sojeva i njihovih kontrolnih vrijednosti. Naime, vidljivo je da na ispitivanom soju TA100 broj poraslih kolonija opada proporcionalno padu koncentracije ispitivanog spoja, MCD 8. Međutim, u sva tri razrjeđenja,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  M, broj poraslih revertantnih kolonija prelazi broj poraslih revertantnih kolonija na negativnim kontrolama, DMSO i  $H_2O$ , ali ne doseže broj revertantnih kolonija kao kod pozitivne kontrole. Taj rezultat upućuje na suspektu mutagenost MCD 8 u ispitivanim koncentracijama.

Isti spojevi, MCD 4 i MCD 8, na ostalim bakterijskim sojevima, TA1535 i WP2, u istim ispitivanim koncentracijama,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  M, ne induciraju porast revertantnih bakterijskih kolonija veći nego na kontrolama pa time ne stvaraju sumnju da bi imali mutagena svojstva.

Kako su opisali Maron i Ames (38), pozitivne i suspektne rezultate treba potvrditi ili odbaciti novim istraživanjem kojim bi se u odnos postavio broj revertantnih kolonija i veći broj različitih razrjeđenja u užem rasponu. Osim toga, svaki rezultat istraživanja treba ispitati na kulturi eukariotskih stanica. Kako je većina mutagenih kemikalija baktericidna pri određenim koncentracijama, rezultate treba oprezno tumačiti posebno ako se uoči povezanost između pada koncentracije ispitivanog spoja i povećanja broja poraslih kolonija kao što je to primjećeno kod rezultata ispitivanja učinka MCD 4. Također, prisutnost pKM101 plazmida, kako navode Mortelmans i Zeiger (39), utječe na rezultate. Prisutnost plazmida pojačava kemijski i UV induciranu mutagenezu što rezultira većim brojem revertantnih kolonija. Rezultati dobiveni na soju TA100 mogu se argumentirati kao posljedica prisutnosti pKM101 plazmida jer je testom za provjeru genotipa dokazana prisutnost tog plazmida (Tablica 1).

Prema rezultatima drugih istraživanja nije zabilježeno genotoksično djelovanje monometinskih cijaninskih derivata za razliku od karbocijaninskih boja koje induciraju značajan porast revertantnih bakterijskih kolonija (47) ili već spomenutog etidijevog bromida (22). Amesovim testom ispitani su mutageni učinci drugih cijaninskih boja. Singer i suradnici dokazali su da SYBR Green ne uzrokuje mutagenost (22). Također, Kirsanov i suradnici istražili su moguće mutageno djelovanje SYBR Gold i SYBR Green II Amesovim testom na sojevima TA98 i TA100. Dokazali su da nisu mutageni čak ni u, za bakterijske sojeve, toksičnoj koncentraciji kao što je prethodno dokazano i za SYBR Green (48). Važnost rezultata ovih istraživanja od velikog je značaja jer je do sada dokazano genotoksično

djelovanje različitih za mali utor vezujućih spojeva, ali ujedno je dokazano da neki za mali utor vezujući spojevi ne vode nužno mutagenim procesima (49).

Činjenica da monometinski cijaninski derivati nemaju mutageno djelovanje omogućava istraživanja u novim smjerovima ne samo samo u dijagnostičkom smislu već i u primjeni terapije oboljelih pacijenata. Obzirom da je do sada dokazano citotoksično i antiproliferativno djelovanje nekih monometinskih cijaninskih derivata među kojima su MCD 4 i MCD 8, na tumorskim staničnim linijama (50), postoji potencijal za razvoj protutumorske terapije. Također je dokazano *in vitro* antibakterijsko i antifungalno djelovanje pri čemu najveću osjetljivost pokazuju gram pozitivne bakterije, a najmanju gljive (51) što omogućava osmišljavanja terapije za infektivne bolesti.

## 7. Zaključak

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Nije dokazan mutageni učinak MCD 4 i MCD 8 na sojevima TA1535 i WP2.
- MCD 4 ima potencijalno baktericidan učinak.
- MCD 8 je potrebno dodatno ispitati budući da dovodi do porasta broja revertantnih bakterija.
- Djelovanje MCD 4 i MCD 8 na TA100 soj vjerojatno je posljedica prisutnosti pKM101 plazmida i razlike u kemijskoj strukturi ispitivanih spojeva.

## 8. Sažetak

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mutagena svojstva dvaju novih monometinskih cijaninskih derivata i utvrditi utječe li razlika u njihovoj kemijskoj strukturi na sposobnost izazivanja mutacija.

**Nacrt studije:** Studija je pokusno (eksperimentalno) istraživanje.

**Materijal i metode:** Proizvođači kemikalija je MOLTOX, Boone (SAD) i Acros Organics, Geel (Belgija). Kao negativna kontrola korišten je DMSO i H<sub>2</sub>O, a kao pozitivna N<sub>3</sub>Na (natrijev azid) otopljen u sterilnoj destiliranoj vodi u koncentraciji od 1,9·10<sup>-2</sup> M. Ispitivani spojevi, MCD 4 i MCD 8 pripremljeni su u koncentracijama od 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> i 10<sup>-6</sup> M. Inkubacija bakterijskih kultura trajala je 48 h na 37 °C. Amesov test mutagenosti proveden je prema MOLTOX-ovoj uputu bez S9 sustava aktivacije enzima.

**Rezultati:** Nijedan ispitivani spoj ne inducira značajan porast revertantnih bakterijskih kolonija ni na jednom bakterijskom soju. Štoviše, zabilježen je manji broj poraslih revertantnih kolonija na TA100 soju tretiranom MCD 4 nego na negativnoj kontroli. MCD 8 dovodi do povećanog broja revertantnih kolonija u odnosu na negativne kontrole.

**Zaključak:** Nije dokazan mutageni učinak MCD 4 i MCD 8 na sojevima TA1535 i WP2. MCD 4 ima potencijalno baktericidan učinak, a MCD 8 je suspektan mutagen što je potrebno dodatno istražiti. Djelovanje MCD 4 i MCD 8 na TA100 soj vjerojatno je posljedica prisutnosti pKM101 plazmida i razlike u kemijskoj strukturi ispitivanih spojeva.

**Ključne riječi:** Ames test; *E. coli*, WP2; monometinski cijaninski derivati; mutagenost; *Salmonella typhimurium*, TA100, TA1535.

## 9. Summary

### Determination of possible mutagenic effects of monomethine cyanine derivatives

**Objectives:** The aim of this study was to examine the mutagenic properties of two new monomethine cyanine derivatives and to determine whether the difference in their chemical structure affects the ability to induce mutations.

**Study design:** The study was an experimental research.

**Material and Methods:** The producer of materials was MOLTOX, Boone (USA) and Acros Organics, Geel (Belgium). DMSO and H<sub>2</sub>O were used as a negative control and N<sub>3</sub>Na (sodium azide) dissolved in sterile distilled water at a concentration of 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup> M was used as a positive control. The tested compounds, MCD 4 and MCD 8 were prepared at concentrations of 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup> M. Incubation of bacterial cultures lasted 48h at 37 ° C. Ames mutagenicity test was performed according to the MOLTOX instruction without S9 enzyme activation system.

**Results:** No test compound induces a significant increase in revertant bacterial colonies in any bacterial strain. Moreover, a smaller number of revertant colonies on the TA100 strain treated with MCD4 was recorded than for negative control, which is why it is concluded that it has a potentially bactericidal effect, but additional studies are needed. MCD 8 treatment leads to an increased number of revertant colonies compared to negative control.

**Conclusion:** No mutagenic effect of MCD 4 and MCD 8 on TA1535 and WP2 strains was demonstrated. MCD 4 has a potentially bactericidal effect, and MCD 8 is susceptible to mutagenicity which needs to be further investigated. The action of MCD 4 and MCD 8 on Ta100 strain is likely to be due to the presence of plasmid pKM101 and the difference in the chemical structure of the tested compounds.

**Keywords:** Ames test; E. coli, WP2; monomethine cyanine derivatives; mutagenicity; Salmonella typhimurium, TA100, TA1535.

## 10. Literatura

1. U.S. National library of medicine. Genetics Home Reference. Dostupno na adresi: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/genemutation>. Datum pristupa: 28.7.2017.
2. Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Mrežni udžbenik iz genetike. Dostupno na adresi: <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl14.html>. Datum pristupa: 28.7.2017.
3. World Health Organization. Cancer. Dostupno na adresi: <http://www.who.int/cancer/en/>. Datum pristupa: 28.7.2017.
4. Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. „Zelena” kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kem Ind.* 2004;53:217-24.
5. American Chemical Society. History of Green Chemistry. Dostupno na adresi: <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry/history-of-green-chemistry.html>. Datum pristupa: 30.8.2017.
6. Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Kovač V., Vorkapić-Furač J. Dominantni trendovi „zelene” kemije. *Kem Ind.* 2005;54:255-72.
7. American Chemical Society. ACS Green Chemistry Institute. Dostupno na adresi: <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry.html>. Datum pristupa: 30.8.2017.
8. Kalenić S. i sur. *Medicinska mikrobiologija*. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
9. Christopoulos T. K. Nucleic Acid Analysis. *Anal Chem.* 1999;71:425-38.

10. Cohen L., Wali D. R. Single-Molecule Arrays for Protein and Nucleic Acid Analysis. *ARI*. 2017;10:11.1-11.19.
11. Pinheiro L. B., Coleman V. A., Hindson C. M., Hermann J., Hindson B. J., Bhat S. i sur. Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Anal Chem*. 2012;84:1003-11.
12. Fan J. B., Gunderson K. L., Bibiova M., Yeakley J. M., Chen J., Garcia E. W. i sur. Illumina Universal Bead Arrays. *Methods in Enzymology*. 2006;410:57-73.
13. Yeakley J. M., Fan J. B., Doucet D., Lou L., Wickham Eliza, Ye Zhen i sur. Profiling alternative splicing on fiber-optic arrays. *Natur Biotechnology*. 2002;20:353-58.
14. Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A. Genom sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Natur*. 2005;437:376-80.
15. Mikheyev A. S., Tin M. M. Y. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Molecular ecology resources*. 2014;14:1097-102.
16. Demeunynck M., Bailly C., Wilson W. D. DNA and RNA Binders. 1. izd. Winheim: WILEY-VCH. 2003.
17. Johnson I, Spence MTZ, ur. Molecular probes handbook. A guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11. izd. Waltham: Invitrogen; 2010.
18. ThermoFisher Scientific. Molecular probes the handbook. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/nucleic-acid-detection-and-genomics-technology/nucleic-acid-stains.html#head1>. Datum pristupa: 29.7.2017.



19. ThermoFisher Scientific. Fluorescence fundamentals. Dostupno na adresi:  
<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>. Datum pristupa:  
30.8.2017.
20. Timceva I. I., Maximova V. A., Deligeorgiev T. G., Gadjev N. I., Sabnis R. W., Ivanov I. G. Fluorescence spectral characteristics of novel asymmetric monomethine cyanine dyes in nucleic acid solutions. *FEBS*. 1997;405:141-4.
21. LePecot J. B., Paoletti C. A fluorescent complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* 1967;27:87-106.
22. Singer V. L., Timothy E. L., You S. Comparison of SYBER Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella/mammalian* microsome reverse mutation assay (Ames test). *Dyes and pigm.* 1999;439:37-47.
23. ThermoFisher Scientific. DNA Stains. Dostupno na adresi:  
<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains.html>. Datum pristupa:  
30.8.1017.
24. Evenson W. E., Boden L. M., Muzikar K. A., O'Leary D. J.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Assignments for the Cyanine Dyes SYBR Safe and Thiazole Orange. *J Org Chem.* 2012;77:10967-71.
25. Canela H. M. S., Takami L. A., Ferreira M. E. S. SYBR Safe efficiently replaces ethidium bromide in *Aspergillus fumigatus* gene disruption. *Genet Mol Res.* 2017:16.
26. Lumiprobe. Cyanine dyes. Dostupno na:  
<https://www.lumiprobe.com/tech/cyanine-dyes>. Datum pristupa: 29.7.2017.

27. Rye H. S., Dabora J. M., Quesada M. A., Mathies R., Glazer A. N. Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and singlestranded DNA and RNA with picogram sensitivity. *Anal Biochem.* 1993;208:144-150.
  
28. ResearchGate. Single- and double-strand photocleavage od DNA by YO, YOYO and TO, TOTO. Dostupno na adresi:  
[https://www.researchgate.net/publication/14596896\\_Single-\\_and\\_double-strand\\_photocleavage\\_of\\_DNA\\_by\\_YO\\_YOYO\\_and\\_TOTO](https://www.researchgate.net/publication/14596896_Single-_and_double-strand_photocleavage_of_DNA_by_YO_YOYO_and_TOTO). Datum pristupa: 30.8.2017.
  
29. Biver T., De Biasi A., Secco F., Venturini M., Yarmoluk S. Cyanine dyes as intercalating agents. *Biophysical Journal.* 2005;89:374-83.
  
30. Pisoni DS, Todeschini L, Borges AC, Petzhold CL, Rodembusch FA, Campo L. Symetrical and asymetrical cyanine dyes. Synthesis, spectral properties and BSA association study. *JOC.* 2014;79:5511-20.
  
31. Tropcheva R, Lesev N, Danova S, Stoitsova S, Kaloyanova S. Novel cyanine dyes and homodimeric styryl dyes as fluorescent probes for assessment of lactic acid bacteria cell viability. *J Photochem Photobiol B.* 2015;143:120-9.
  
32. Shindy HA. Basics, Mechanisms and Properties in the chemistry of cyanine dyes: A review paper. *Mini-reviews in Organic Chemistry.* 2012;9:352-60.
  
33. Kurutos A, Ryzhova O, Trusova V, Tarabara U, Gorbenko G, Gadjev N i sur. Novel asymmetric monomethine cyanine dyes derived from sulfobetaine benzothiazolium moiety as potential fluorescent dyes for non-covalent labeling of DNA. *Dyes Pigm.* 2016;130:122-8.
  
34. Alganzy HH, El-Sayed w, Arief MH, Amine MS, Ebeid EM. Microwave synthesis and fluorescence properties of homo- and heterodimeric monomethine cyanine dyes TOTO and their precursors. *Green Chemistry.* 2017;10:10-22.

35. Kaloyanova S, Crnolatac I, Lesev N, Piantanida I, Deligeorgiev T. Synthesis and study of nucleic acids interaction of novel monomethine cyanine dyes. *Dyes Pigm.* 2012;92:1184-91.
36. Glavaš-Obrovac Lj, Piantanida I, Marzi S, Mašić L, Timcheva II, Deligeorgiev TG. Minor structural differences of monomethine cyanine derivatives yield strong variation in their interaction with DNA, RNA, as well as on their in vitro antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem.* 2009;17:4747-55.
37. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983;113:173-215.
38. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000;455:29-46.
39. Mortelmans K, Riccio ES. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutat Res.* 2000;455:61-9.
40. Ames BN, Whitefield HJ. Frameshift mutagenesis in *Salmonella*. *CSH Symposia.* 1966;31:221-5.
41. Hsu CH, Stedeford Todd, ur. *Cancer risk assessment.* New Jersey: Wiley; 2010.
42. Academic Brooklyn. Ames test. Dostupno na: <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/molecular%20biology/mutation-amestest.html>. Datum pristupa: 2.8.2017.
43. OECD. Guideline for testing chemicals. 1997.
44. National Cancer Institute. Dostupno na: <https://www.cancer.gov/>. Datum pristupa 4.9.2017.

45. Ashby J, Waterson MD, Preston J. IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogen. *Mutat. Res.* 1996;352:153-57.
46. Deligeorgiev TG, Gadjev NI, Vasilev AA, Maximova VA, Timcheva I, Katerinopoulos HE, Tsikalas GK. Synthesis and properties of novel asymmetric monomethine cyanine dyes as noncovalent labels for nucleic acids. *Dyes and Pigm.* 2007;75:466-73.
47. Matselyukh BP, Matselyukh DY, Kovalski VB, Volkova KD, Kryvorotenko DV, Yarmoluk SM. Studies of mutagenic activity of fluorescent DNA – sensitive monomethinecyanine and carbocyanine dyes in Ames test. *Ucrainica Bioorganica Acta.* 2005;2:27-34.
48. Kirsanov KI, Lesovaya EA, Yakubovskaya MG, Belitsky GA. SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in Ames test. *Mutat Res.* 2010;699:1-4.
49. Turner PR, Denny WA. The mutagenic properties of DNA minor-groove binding ligands. *Mutant Res.* 1996;355:141-69.
50. Uremis MM, Yaghoglu AS, Budak Y, Ceylan M. Synthesis, characterization, in vitro antiproliferative and cytotoxicity effects of a new class of 2-((1R,2S)-2-((E)-4- substitutedstyryl) cyclooctyl)benzo[d]thiazole derivatives. *ACG publications.* 2017;1307-6175. doi: <http://doi.org/10.25135/acg.oc.18.17.02.009>.
51. Abd El-Aal RM, Younis M. Synthesis and antimicrobial activity of certain novel monomethine cyanine dyes. *Dyes and Pigm.* 2004;60:205-14.

## **11. Životopis**

Petra Medač rođena je 29. 6. 1995. godine u Bjelovaru. Od 2002. do 2010. pohađala je Osnovnu školu u Ivanskoj. 2010. upisala je Opću Gimnaziju u Bjelovaru i maturirala 2014. Iste godine upisala je preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.