

**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**

**Disertační práce**

**Mutagenní a antimutagenní účinky látek zevního prostředí**

**Martina Langová**

**Školitel: RNDr. Ivo Bárta, CSc. †**

**MUDr. Pavel Vodička, CSc.**

**Rok obhajoby: 2008**

## Obsah:

1. Poděkování .....	1
2. Úvod .....	2
3. Specifikace cílů disertační práce .....	4
3.1 Charakteristika testovaných chemoprotektivních látek .....	5
3.2 Charakteristika testovaných mutagenů .....	12
4. Použité metody a postup .....	14
4.1 Testy <i>in vitro</i> .....	14
4.2 Testy <i>in vivo</i> .....	16
5. Výsledky .....	20
6. Diskuze .....	43
7. Závěr .....	49
8. Grantová podpora .....	51
9. Seznam publikací .....	51
10. Použitá literatura .....	52

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli MUDr. P. Vodičkovi, CSc. za to, že se po náhlém úmrtí RNDr. I. Bárty, CSc. ochotně ujal vedení mé disertační práce, přestože se její náplň odlišuje od jeho vlastního vědeckého zaměření. Dále chci poděkovat své kolegyni RNDr. Z. Polívkové za její stálou obětavou pomoc i celému kolektivu spolupracovníků, se kterými jsme na grantových projektech pracovali.



## 2. Úvod

Souvislost mezi složením stravy člověka a jeho zdravím je nepochybná. V centru zájmu je pochopení a hlavně ovlivnění procesu ateroogeneze a onkogeneze, protože kardioavaskulární a onkologická onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých zemích. Nutrice může souviset jak s iniciací a progresí karcinogeneze, tak s jejím potlačením. K negativním environmentálním faktorům patří především chemické karcinogeny, které z velké části vznikají jednak vlivem lidské činnosti, jednak v rámci endogenních procesů (Guernich, 2000). Kromě karcinogenních látek antropogenního charakteru existuje i velká skupina přirozených karcinogenů.

Tato práce je zaměřena na sledování mutagenních a antimutagenních účinků látek, které se v prostředí člověka respektive jeho potravě přirozeně vyskytují. Mezi kontaminanty potravin, vznikající například během skladování, patří produkty mikroskopických hub (plísní) označované jako mykotoxiny, mezi nejrizikovější patří aflatoxin B1. Ale i samotné nutriční složky mohou být zdrojem zvýšeného rizika karcinogeneze nebo se jejich rizikové vlastnosti projeví až následkem nevhodného postupu přípravy jídel například za použití vysokých teplot. Za jedny z nejzávažnějších jsou považovány pyrolyzáty aminokyselin (heterocyklické aminy) typu amino metyl imidazo chinolinu (IQ), vyskytující se v potravě člověka jako důsledek nevhodné tepelné úpravy živočišných bílkovin (Loprieno *et al.*, 1991). Mezi další významné karcinogenní sloučeniny patří N-nitroso-N-metylurea (MNU). Na rozdíl od předchozích se jedná o přímo působící karcinogen nevyžadující metabolickou aktivaci. Riziko je zvýšeno tím, že může vznikat i endogenně z prekursorů obsažených v potravě (Santarelli *et al.*, 2008).

Zmíněné látky se většinou vyskytují v potravě v nízkých dávkách, ale při pravidelné expozici představují zátěž organismu a z hlediska nutričně toxikologických procesů i zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění. Riziko karcinogeneze je snižováno ochrannými procesy probíhajícími v organismu zejména antioxidanty, detoxikací, snižováním metabolické aktivity karcinogenních látek, reparací DNA, apoptózou a obrannými schopnostmi imunitního systému (Go *et al.*, 2003).

Tyto přirozené procesy mohou být podpořeny antimutagenními a antikarcinogenními látkami přírodního původu a tak může být konzumovaná

potrava významným zdrojem ochranných faktorů. Ve většině druhů ovoce a zeleniny se vyskytuje řada látek, které vykazují takové účinky (Aggarval *et al.*, 2006). Jsou to mimo klasické vitamíny především: thiolové látky jako dialyl sulfid, flavonoidy a isoflavony, inositol hexafosfát, isothiokyanáty, kurkumin, saponiny, kapsaicin, rostlinné polyfenoly jako resveratrol, kyselina elagová, genistein a mnohé další (Ray, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

Rizikové faktory vycházející ze složení lidské stravy jsou nejčastěji dávány do souvislosti s nebezpečím rozvoje nádorových onemocnění trávicího traktu a v první řadě karcinomu tlustého střeva (Martínez *et al.*, 2008). V incidenci tohoto onemocnění má naše republika smutný primát. Na druhé straně by nádorová onemocnění trávicího traktu mohla být dobře ovlivnitelná právě protektivními látkami přírodního původu (Bray *et al.*, 2002).

Pokrok v oblasti poznání procesu karcinogeneze na buněčné a molekulární úrovni otevřel slibnou strategii prevence nádorů – chemoprevenci, která může účinně přispět k redukci incidence lidských zhoubných nádorů případně podpořit jejich léčbu (Bode and Dong, 2004). Složení potravy se tedy může stát efektivní strategií v prevenci různých onemocnění především nádorových a kardiovaskulárních. Je tendence jednotlivé účinné látky izolovat a poskytovat je jako potravinové doplňky v prevenci a podpůrné léčbě civilizačních chorob, ale často zůstává nedořešena otázka dávkování a vzájemných interakcí.

### 3. Specifikace cílů

Cílem práce bylo sledovat na prokaryotním i eukaryotním modelu antimutagenní účinky čtyř vybraných rostlinných látek na mutagenní aktivitu vybraných karcinogenních látek.

Byly sledovány čtyři bioaktivní látky rostlinného původu, vyskytující se v obvyklé potravě člověka, použité ve formě chemicky definovaných sloučenin: kyselina elagová (EA), resveratrol (RES), dialylsulfid (DAS) a fenetyl isothiokyanát (PEITC). Jejich účinek byl testován na inhibici mutagenní aktivity testovaných karcinogenních látek: aflatoxinu B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), 2-amino-3-methylimidazo[4,5,] chinolinu (IQ) a N-nitroso-N-methylurey (MNU).

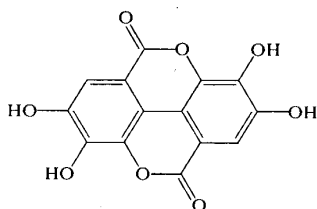
Testované látky byly vybrány tak, aby reprezentovaly obvyklé složky lidské potravy, které by se tak mohly podílet na snížení rizika účinků vybraných modelových mutagenů vyskytujících se jako kontaminanty v potravinách a u kterých nelze počítat s tím, že by se podařilo této kontaminaci zcela zabránit.

### 3.1. Charakteristika testovaných chemoprotektivních látek

**Kyselina elagová (EA)** patří mezi rostlinné polyfenoly s prokázanými antimutagenními, antikarcinogenními a antioxidačními vlastnostmi (Cerda *et al.*, 2005). V potravinách se vyskytuje zejména v drobném ovoci (jahody, maliny, hrozny, černý rybíz). Kvantitativní stanovení množství EA v různých rostlinách provedli Fraise *et al.* (1999).

#### Obr. 1: Kyselina elagová

(2,3,7,8-tetrahydroxy[1]benzopyrano[5,4,3-c,d,e][1]benzopyran-5,10-dion)



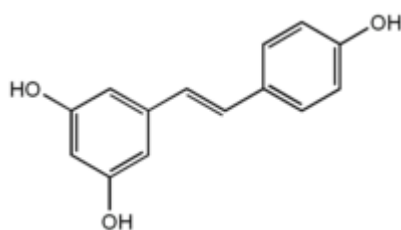
Signifikantní snížení aktivity jaterního P450 2E1 a zároveň zvýšení aktivity některých enzymů II. fáze bylo pozorováno po podání EA laboratorním potkanům. U experimentálních zvířat inhibovala EA chemicky indukovanou karcinogenezi v buňkách různých orgánů především trávicího traktu (Stoner and Morse, 1997). Siglin *et al.* (1995) studovali inhibiční efekt EA a PEITC na esofageální karcinom indukovaný N-nitrosometylbenzylaminem (NMBA) u laboratorních potkanů. EA byla schopna potlačovat vývoj esofageálního tumoru, jestliže její podávání následovalo po ovlivnění NMBA. Byla schopna rovněž inaktivovat elektrofilní produkty metabolismu polyaromatických uhlovodíků a N-nitrosaminů. Perorálně podávaná EA signifikantně snižovala u potkanů množství gamaglutamyl transpeptidáza-pozitivních lézí indukovaných AFB<sub>1</sub>, které předcházejí rozvoji hepatocelulárních neoplasií (Soni *et al.*, 1997).

Experimenty na buňkách T24 lidského karcinomu močového měchýře prokázaly, že EA je schopna navodit zastavení buněčného cyklu a apoptózu. Její vliv spočíval ve snížení životaschopnosti výše uvedených nádorových buněk, zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a navození apoptózy. U buněk byla prokázána zvýšená genová exprese p53 a p21 a snížená genová exprese CDK2 a zvýšená aktivita kaspázy 3 (Li *et al.*, 2005).



**Resveratrol** (RES) je rostlinný polyfenol, produkovaný některými semennými rostlinami jako obranná látka proti houbovým chorobám (především *Botrytis cinerea*) nebo při zvýšené expozici UV záření (Creasy and Cofee, 1998). Největší množství RES je ve slupce vinných bobulí, v dužině se prakticky nevyskytuje. Proto je obsažen v červených vínech obsahujících více extraktu ze slupek, v bílých vínech je jeho obsah minimální. Množství RES dále závisí na vinné odrůdě, geografickém původu a dalších faktorech (Frémont, 2000).

**Obr. 2: Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilben)**



RES jako antimutagen a antioxidant poprvé popsal Jang et al. (1997). RES se podílí na prevenci karcinogeneze inhibicí enzymů I. fáze CYP P450 a indukcí enzymů II. fáze metabolismu xenobiotik (Kundu a Surh, 2004). Dále inhibuje cyklooxygenázy, které skrze produkci prostaglandinů stimulují buněčnou proliferaci, angiogenezi a imunosupresi a tím se podílí na antipromočním procesu (Udenigwe *et al.*, 2008).

RES se podílí na zastavení buněčného cyklu na rozhraní G1/S fáze. Mechanismus spočívá v inhibici ribonukleotid reduktázy a DNA polymerázy, topoizomerázy II (Galati, 2000). Také může indukovat aktivaci p53 a následnou apoptózu. V buňkách se zachovalou funkcí genu p53 indukoval apoptózu preferenčně u nádorových buněk (Bode a Dong, 2004).

RES má schopnost obsazovat estrogenní receptory na membráně buněk a může tak inhibovat proliferaci estrogen senzitivních buněk nádoru prsu (Frémont, 2000). RES je efektivním inhibitorem CYP B1, který aktivuje mnoho chemických karcinogenů a katalyzuje hydroxylaci estrogenů, která je považována za důležitý stupeň v karcinogenezi vyvolané hormony nebo xenobiotiky. Také např. CYP 1B1, které jsou exprimovány v nádoru prsu, tlustého střeva, plic a CYP 3A4 exprimované v nádorech tlustého střeva a jater jsou RES inhibovány (Chang *et al.*, 2001). RES

byl podáván v denní dávce 5 a 25 mg/kg laboratorním myším a potkanům, kterým byl implantován karcinom plic. Podání RES sice nezabránilo růstu nádorové tkáně, ale výrazně zredukovalo počet metastáz (Busquets *et al.*, 2007).

Inhibicí oxidace LDL, která hraje významnou roli v procesu aterogeneze, se může významně podílet na prevenci kardiovaskulárních chorob u lidí. „French paradox“ - inverzní korelace mezi konzumací červeného vína a incidencí kardiovaskulárních chorob v jižní Evropě je, mimo jiné, připisována vlivu RES. RES je již využíván jako tzv. potravinový doplněk v doporučené denní dávce 200 až 600 mikrogramů a jako takový je již s oblibou užíván v USA (Vidavalur *et al.*, 2006).

**Diallylsulfid** (DAS) patří do skupiny thiolových fytochemikálií, vyskytujících se v různých druzích zeleniny rodu *Allium*: česnek, cibule, pór a některých dalších semenných rostlinách. Thiolové látky přírodního původu jsou schopny aktivně inhibovat iniciační stádium procesu karcinogeneze (Hermann *et al.* 2004). Riziko karcinogeneze je snižováno jednak inhibicí aktivace karcinogenu (Yang *et al.*, 2001), posílením procesu detoxikace (Thompson, *et al.*, 2003) a stimulací funkcí imunitního systému jako je aktivace makrofágů a proliferace T lymfocytů (Lamm *et al.*, 2000)

Antikarcinogenní efekt a další biologické vlastnosti této zeleniny jsou připisovány organickým sloučeninám obsahujícím síru, jako je např. diallylsulfid (DAS), dialyldisulfid, dialyltrisulfid (Seki *et al.*, 2008).

**Obr. 3: Diallylsulfid (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>S)**



Pozitivní účinek konzumace česneku a cibule v prevenci nádorů, zvláště karcinomů gastrointestinálního traktu, byl prokázán v epidemiologických studiích (Khanum, 2004). DAS měnil aktivitu detoxikačních enzymů v experimentech prováděných na laboratorních potkanech, kdy byl podán intragastricky sondou v jedné dávce. Došlo ke snížení hladiny hepatálního CYP2E1 a vzestupu CYP1A1 a CYP1A2 (Devenport a Wargovich, 2005).

CYP enzymy hrají klíčovou roli v metabolismu celé řady chemických karcinogenů. Jejich vliv na metabolismus karcinogenů závisí na typu CYP izoenzymů a na druhu karcinogenu. Některé typy izoenzymů jsou alylsulfidy indukovány (CYP1A, CYP2B), jiné inhibovány (CYP2E1). Alylsulfidy tedy mohou jak zvyšovat, tak i potlačovat mutagenitu různých karcinogenů, jak bylo prokázáno i v Amesově testu po *in vivo* modulaci enzymů I. fáze alyl a propylsulfidy (Guyonnet *et al.*, 2000).

Enzymy II. fáze jsou zahrnuty v detoxikačních pochodech, vedoucích k eliminaci reaktivních karcinogenů. Mezi těmito enzymy hraje klíčovou roli

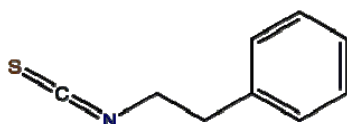
glutathion S-transferáza (GST). Organické sulfosloučeniny silně indukovaly GST aktivitu v buňkách různých orgánů experimentálních zvířat (Guyonnet *et al.*, 2001). Protektivní efekt těchto látek proti nádorům byl prokázán experimentálními studiemi na zvířecích modelech a tento efekt se uplatňuje pravděpodobně ve všech stádiích karcinogeneze (Thompson, 2003). Hong, (2000) zjistil, že tyto látky potencují apoptózu v buněčných kulturách plicního karcinomu zvýšením hladiny proteinu p53.

Antikarcinogenní účinky DAS a dialyldisulfidu ( DADS) byly sledovány na různých typech buněčných linií nádorových buněk. Například na buněčné linii PC-3 nádorových buněk prostaty DADS snižoval proliferaci nádorových buněk a způsoboval zastavení buněčného cyklu mezi G2 a M fází snížením exprese cyklin dependentní kinázy 1(CDK1) (Arunkumar *et al.*, 2006).

Jiná studie provedená na buňkách lidského nasopharyngeálního karcinomu ovlivněnými DADS prokázala zvýšené množství apoptotických buněk a pokles zastoupení buněk v S fázi buněčného cyklu. DADS indukoval apoptózu zvýšením fosforylace p38 MAPkinázy a p42/44 MAPkinázy (Zhang *et al.*, 2006).

**Fenetyl isothiokyanát** (PEITC) a ostatní isothiokyanáty jsou biologicky aktivní látky obsažené v různých druzích zeleniny čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*): zelí, květák, brokolice, růžičková kapusta, křen, tuřín, hořčice, řeřicha aj. (Hecht, 2000).

**Obr. 4 : Fenetyl isothiokyanát (C<sub>9</sub>-H<sub>9</sub>-N-S)**



Předpokládaným mechanismem chemoprevence je, podobně jako u dalších látek s antikarcinogenním účinkem, inhibice cytochromů P450 (včetně izoenzymů CYP1A1 a 1A2), indukce detoxikačních enzymů II. fáze, zejména GST (Wargowich 2006). Některé isothiokyanáty působí především inhibicí enzymů I. fáze, jiné aktivují přednostně enzymy II. fáze, další působí dokonce v obou stupních metabolismu xenobiotik, ty jsou pak neúčinnější. Konečný efekt je však vždy závislý na typu isothiokyanátu a typu karcinogenu (Hecht, 2000).

Široká škála isothiokyanátů působí jako účinná chemopreventivní agens proti nádorům plic, prsu, jícnu, jater, tenkého a tlustého střeva, močového měchýře, což bylo prokázáno především na chemicky indukovaných nádorech u experimentálních zvířat, ale i v populačních studiích byl prokázán protektivní účinek u karcinomu plic. Protože isothiokyanáty jsou zvláště účinné proti tabákovým nitrosaminům a proti dalším mutagenům tabákového kouře, předpokládá se, že jsou nadějnou chemoprevencí plicních nádorů, zvláště u kuřáků (Hecht *et al.*, 2002).

Velmi silně působí isothiokyanáty na apoptózu nádorových buněk. Xu a Thornalley (2000) zjistili, že PEITC a alyl isothiokyanát jsou 10 – 20x toxičtější pro leukemické buňky než pro normální lymfocyty, měly tedy selektivní protinádorový efekt, který se může uplatnit zvláště v preklinickém stadiu nádorů. Dalším mechanismem působení je zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi nádorových buněk pozorované v buněčné kultuře leukemických buněk (Fimognari *et al.* 2002).

Experimenty na linii buněk PC-3 lidského karcinomu prostaty a jejich xenotransplantátech na athymických myších prokázaly vliv PEITC na indukci Bax Bid proteinů s následnou apoptózou a redukcí objemu nádorové tkáně (Xiao *et al.*, 2006). Testování účinků PEITC na buňkách ovariálního karcinomu OVCAR-3 prokázalo jeho cytotoxicitu pro testované nádorové buňky a vyvolání apoptózy aktivací kaspázy 3 a 9, dále došlo ke snížení hladiny Bcl2 a zvýšení hladiny Bax proteinů (Satyan *et al.*, 2006).

### 3.2. Charakteristika testovaných mutagenů

**Aflatoxin B<sub>1</sub>** (AFB<sub>1</sub>) patří do skupiny toxinů produkovaných plísněmi rodu *Aspergillus*. Je významným karcinogenem (IARC, 1993). Míra kontaminace potravin závisí na teplotě a vlhkosti a dalších podmínkách při jejich výrobě a skladování.

Mykotoxin je mutagenní pouze po metabolické aktivaci. AFB<sub>1</sub> je v játrech metabolicky aktivován cytochromem P450 (CYP) 3A4. Reaktivní metabolit (8,9-dihydro-8,9-epoxy-aflatoxinB<sub>1</sub>), který vzniká touto cestou se kovalentně váže na N7 pozici guaninu a vytváří s ním adukt. Charakteristická mutace, která je výsledkem expozice AFB<sub>1</sub> a postihuje gen p53 v kodonu 249, je G – T transverze. Výsledkem poškození tohoto tumor supresorového genu je inhibice apoptózy a urychlení buněčné proliferace (Aguliar *et al.*, 1993, Wilda a Turner, 2002). Produkty metabolické přeměny AFB<sub>1</sub> se v organismu detoxikují prostřednictvím enzymů glutathion S-transferáz převážně konjugací s glutathionem (Guengerich, 2000). AFB<sub>1</sub> je rizikovým faktorem vzniku hepatocelulárního karcinomu u člověka, zvláště v kombinaci s infekcí virem hepatitidy B (Liu *et al.*, 2008).

**2-amino-3-metyl -3H-imidazo[4, 5-f]chinolin** (IQ), který rovněž vyžaduje metabolickou aktivaci, patří mezi pyrolyzáty aminokyselin (heterocyklické aminy) typu amino-metyl-imidazo-chinolinu, dalšími zástupci této skupiny jsou např. 2-amino-1-metyl-6-fenyl-imidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) a 2-amino-3,8-dimetyl-imidazo[4,5-f]chinoxalin (MeIQx). Heterocyklické aminy jsou mutagenní látky vznikající při přípravě potravin s vysokým obsahem proteinů za vysokých teplot. Vznikají reakcí kreatinu a kreatininu ve svalovině s aminokyselinami a cukry. Faktory, které ovlivňují jejich tvorbu jsou koncentrace prekurzorů, pH, výška teploty během přípravy a délka jejího působení (Robbana-Barnat *et al.* 1996). Genotoxicita heterocyklických aminů závisí na aktivaci detoxikačními enzymy, hlavně jaterním cytochromem P450 CYP IA2 (Gooderham, 1997).

IQ je IARC zařazeno do skupiny 2A (Smith *et al.*, 2001). IQ tvoří DNA adukty, indukuje zlomy DNA, mutace v savčích i lidských somatických buňkách, výměny sesterských chromatid, tvorbu mikrojader a indukuje různé druhy nádorů v orgánech experimentálních zvířat i u člověka. Heterocyklické aminy u člověka

prokazatelně zvyšují riziko nádorů prsu a kolorektálního karcinomu ( Ferguson, 1999).

**N-nitroso-N-metylurea** (MNU) patří mezi významné karcinogenní N-nitroso sloučeniny (IARC, 1978). MNU je přímo působící mutagen, nevyžaduje metabolickou aktivaci, reakcí s DNA tvoří stálé adukty. Zdrojem nitrosaminů v prostředí jsou tabákové produkty, z průmyslové výroby jde především o gumárenský průmysl, ale mohou se vyskytovat i v potravinách. Riziko karcinogeneze je zvýšeno tím, že MNU může vznikat i endogenně. Endogenní tvorba probíhá z prekurzorů v potravě jako jsou nitráty a aminy. Zdrojem jsou především uzené potraviny ale i např. nakládaná zelenina, ve které mikroorganismy redukuje nitráty na nitrity. Nitráty jsou také přidávány do masných výrobků jako antibakteriální látka a také k zlepšení vzhledu, protože reakcí s myoglobinem dodávají masnému výrobku přitažlivější barvu. N-nitrosloučeniny mohou vznikat v lidském těle na sliznicích zejména při bakteriálním zánětu při pH 3-7 (Hill, 1996).

Účinkem N-nitroso sloučenin dochází k alkylaci nukleových kyselin, tvorbě aduktů, zlomům DNA i tvorbě mikrojader (Wolf et al., 2003). U člověka se podílejí na vzniku maligních nádorů žaludku, jícnu, mozku a leukémií. Studie prokázaly zvýšený výskyt tumorů mozku u dětí, jejichž matky v graviditě konzumovaly nitrity ošetřené maso. Také výskyt leukémií je vyšší u dětí konzumujících uzeniny ve zvýšené míře ( Mirvish, 2002).



## 4. Použité metody a postup

Ke sledování antimutagenních účinků vybraných látek byl použit prokaryotní a eukaryotní model. Jde o krátkodobé testy, které se používají pro orientační stanovení genotoxických účinků xenobiotik.

### 4.1. Testy *in vitro*

Testování mutagenních účinků chemických látek na prokaryotním modelu, histidin-auxotrofní mutantě *Salmonella typhimurium*, bylo provedeno podle Ames (Maron and Ames, 1983). Kmeny *Salmonella typhimurium* mají arteficiálně porušený gen pro biosyntézu histidinu a proto vyžadují pro svůj růst jeho externí přívod. K testování sledovaných mykotoxinů byly použity indikátorové kmeny *Salmonella typhimurium* TA98 a TA100. Kmeny se od sebe liší typem mutace v histidinovém operonu a oba mají ještě další přídatné mutace. *HisG46* mutace u kmene TA100 je v genu *hisG*, který kóduje první enzym histidinové biosyntézy, u kmene TA98 je to *hisD3052* mutace v genu *hisD*. Tyto mutace jsou příčinou neschopnosti kmenů syntetizovat histidin.

Působením testovaného mutagenu dochází ke zpětné mutaci, která se fenotypově projeví návratem schopnosti tvorby histidinu s následným růstem i na mediu, které histidin neobsahuje (minimální medium). Pro detekci účinků nepřímých mutagenů se test provádí v přítomnosti savčích jaterních mikrozomálních enzymů (metabolická aktivace pomocí S9 frakce jaterního homogenátu), Kombinace dvou kmenů **TA98** a **TA100** (tato kombinace je v běžné praxi nejpoužívanější) je schopna detekovat 83% mutagenních látek (Bonneau *et al.*, 1991). Proto byly k pokusům zvoleny tyto kmeny.

Mutagenita AFB<sub>1</sub> byla ověřována v sériích pokusů v koncentracích 10μg, 1μg a 0,1μg na misku. U obou kmenů indukoval AFB<sub>1</sub> s metabolickou aktivací statisticky významně vyšší počet revertant ve srovnání s počtem spontánních revertant, bez metabolické aktivace byla účinná pouze dávka AFB<sub>1</sub> 10μg/misku. V sérii pokusů s koncentracemi 1,0μg, 0,5μg, 0,25μg, 0,1μg byly počty revertant

u obou kmenů statisticky vyšší pouze za metabolické aktivace, statisticky významný rozdíl počtu revertant byl mezi kmeny **TA98** a **TA100** zjištěn pouze v koncentraci 0,1 µg/misku ( u **TA98** byl vyšší). Obdobně byla testována dávková závislost s ohledem na toxicitu u dalších sledovaných látek.

Mutagenní látky byly použity v následujících koncentracích:

**IQ** v koncentracích 0,1 µg, 0,01 µg a 0,001 µg na misku na kmeni **TA98**,  
v koncentracích 10 µg, 1 µg a 0,1 µg na misku na kmeni **TA100**.

**AFB<sub>1</sub>** v koncentracích 10 µg, 1 µg a 0,1 µg na misku na obou kmenech

**MNU** v koncentracích 1000 µg, 100 µg a 10 µg na misku pouze na kmeni **TA100**  
(uvedené koncentrace nevykazovaly mutagenní aktivitu na kmeni **TA98**).

Každá koncentrace jednotlivého mutagenu byla kombinována se 4 různými koncentracemi jednotlivých antimutagenů EA, RES, DAS a PEITC (300 µg, 30 µg, 3 µg a 0,3 µg na misku).

Látky byly ředěny tak, aby potřebné množství bylo rozpuštěno v 0,05 ml rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO). Ke vzorkům, ve kterých byl použit samotný mutagen, nebo pouze testovaný antimutagen, bylo přidáno stejné množství (0,05 ml) DMSO. Do kontrolních vzorků byl přidán pouze DMSO.

Pro metabolickou aktivaci nepřímých mutagenů (**IQ** a **AFB<sub>1</sub>**) byla použita S9 frakce jaterního homogenátu z jater potkanů stimulovaných směsí polychlorovaných bifenylnů – Delorem, připravená dle Marona a Amese (1983).

Den před experimentem byly testovací bakteriální kmeny naočkovány do tekutého media s přidavkem antibiotik, musí být připraveny i kultivační misky se svrchním agarem. V den experimentu byly ve vodní lázni při 41°C přidávány do sterilních zkumavek jednotlivé látky v pořadí: agar (2 ml), bakteriální kmen (0,1 ml), testovaná látka (0,05 ml), mutagen (0,05 ml). S9 směs s frakcí jaterního homogenátu (v pokusech s nepřímými mutageny **IQ** a **AFB<sub>1</sub>**) byla přidána v množství 0,5 ml těsně před vylitím suspenze na misku. Po zatuhnutí agaru proběhla kultivace 72 hodin při 37°C a odečtení výsledků. K odečtení byla použita počítačová analýza obrazu systém LUCIA – colony counting.

Každá koncentrace mutagenu, antimutagenu i jejich jednotlivé kombinace byly testovány vždy ve dvou nezávislých pokusech, v každém pokusu na třech miskách.

Statistické hodnocení bylo provedeno Studentovým t-testem, rozložení dat bylo spojité. Mutagenita jednotlivých látek a jejich směsí byla vyjádřena pomocí koeficientu K, jako poměr mezi počtem revertant indukovaných testovaným vzorkem a počtem spontánních revertant v kontrole. Antimutagenní účinek jednotlivých koncentrací testovaných látek byl vyjádřen jako procento inhibice mutagenity samotného mutagenu podle vzorce:

$$\text{počet revertant mutagenu} - \text{počet revertant (mutagenu+antimutagenu)} / \text{počet revertant mutagenu} \times 100$$

#### **4.2. Testy in vivo**

Na eukaryotním modelu byly látky testovány s použitím mikronukleus testu a u RES i metodou comet assay.

Ke sledování antimutagenních účinků látek na savčím modelu byli v experimentech použiti desetítýdenní samci bílé laboratorní myši kmene BALB/C, hmotnosti 22-26 g.

Zvířata byla ustájena ve zvířetníku na 3. lékařské fakultě UK (udělena akreditace pro uživatelské zařízení k provádění pokusů na zvířatech podle § 14 vyhlášky č. 311/1997 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat) ve skupinových boxech s regulovanou délkou světelného dne (12ti hodinový světelný den) ve standardních podmínkách (teplota: 20°C ± 2°C, relativní vlhkost vzduchu 60% ± 10%, výměna vzduchu 10x – 14x za 1 hod, standardní krmení extrudovanou peletovanou dietou.

Pracovníci provádějící pokusy jsou držiteli osvědčení o způsobilosti podle § 17 zákona ČNR č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání ve znění zákona č. 162/1993 Sb.

V souladu se zněním vyhlášky č. 311/1997 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat, byl v jednotlivých skupinách použit minimální počet zvířat, z něhož bylo možno získat statisticky hodnotitelné soubory dat, tj. 6-10 ks, přičemž minimální počet zvířat, z nichž byly získávány údaje o účincích testovaných látek byl 6 ks v každé experimentální skupině. Experimenty byly 3x opakovány.

Mutageny byly předběžně testovány v jednorázových dávkách, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl u samců a samic a tak jsou uvedeny průměrné hodnoty (**Tab I**). Vlastní pokusy pak byly prováděny na myších samcích. Jako pozitivní kontrola bývá u mikronukleus testu užívána pro navození klastogenních účinků např. MNU, CPP (cyklofosamid) (Gamer *et al.* 2004).

**Tab I.** Testování dávek jednotlivých mutagenů ve srovnání s negativní kontrolou.

Sledovaná látka	Dávka (mg/kg)	Počty mikrojadér $\pm$ SD
kontrola	7% DMSO	2,9 $\pm$ 1,4
AFB <sub>1</sub>	5	6,3* $\pm$ 1,9
	1	4,8* $\pm$ 1,7
IQ	20	6,3* $\pm$ 2,0
	2	3,6* $\pm$ 1,9
MNU	50	31,0* $\pm$ 6,0
	20	19,8* $\pm$ 3,3

X\* : statisticky významně vyšší počet mikrojadér oproti negativní kontrole, hodnoceno Studentovým t-testem

Rostlinné látky byly podávány 3x po sobě v jednodenních intervalech. Poslední den byl podán následně i mutagen. Látky byly aplikovány perorálně sondou do trávicího traktu myší.

EA byla podána v dávce 3 x 4 g/kg, RES 3 x 5 mg/kg, DAS 3 x 100 mg/kg, PEITC 3 x 50 mg/kg pro kombinaci se všemi mutageny. Mutageny byly podávány jednorázově třetí den, 1-1,5 hod po podání rostlinných látek: AFB<sub>1</sub> v dávce 1 mg/kg, IQ v dávce 20 mg/kg a MNU v dávce 50 mg/kg.

Ve všech pokusech byla příslušná látka podávána v objemovém množství 0,1 ml na 10 g tělesné hmotnosti myši. Příslušné látky byly rozpuštěny v 7% DMSO. Stejně množství rozpouštědla (7% DMSO) bylo aplikováno kontrolní skupině. Negativní kontrolou byly myši ovlivněné per os 7% roztokem DMSO, u nichž nebyla zjištěna signifikantně vyšší četnost mikrojadér ve srovnání s intaktními

zvířaty. Porovnáním frekvencí mikrojader po podání testované látky a kontrol byl získán základní údaj o mutagenní, resp. antimutagenní aktivitě testovaného vzorku.

V pokusech byla zvířata usmrcena cervikální dislokací, odebrána kostní dřeň femuru pro stanovení frekvence mikrojader a jednovláknových zlomů DNA a vzorek jater ke stanovení jednovláknových zlomů DNA.

**Mikronukleus test** je založen na sledování počtu mikrojader v těchto pokusech v polychromatofilních erythrocytech kostní dřene. Mikrojádra vznikají v důsledku chromozomálních zlomů a jsou tvořena fragmentem chromozomu (popř. celým chromozomem nezačleněným do nově vytvořeného jádra, pokud došlo k poruše funkce dělicího vřeténka). Metoda je založena na tomto principu: acentrické chromozomové fragmenty se v průběhu anafáze zpožďují za centrickými chromozomy, které se pohybují směrem k pólům dělicího vřeténka. Po telofázi tyto acentrické fragmenty dávají vznik jednomu nebo více útvarům, které jsou většinou mnohem menší, než hlavní jádro a proto jsou označovány jako mikrojádra. Ke vzniku mikrojader může dojít u různých typů buněk. Vždy je však nutné, aby buňky po předchozím mutagenním účinku, prošly jednou či několika mitózami. Mikrojádra mohou být založena např. v myeloblastech a erytroblastech.

Několik hodin po skončení poslední mitózy, kdy erythrocyty vyloučí svá jádra, mikrojádra zůstávají v cytoplazmě, kde jsou po obarvení dobře rozeznatelná. Nejvýhodnější pro zjišťování frekvence mikrojader jsou polychromatofilní erythrocyty, které se dají identifikovat podle reziduální RNA, která zůstává v nově vzniklých erythrocytech ještě asi 2 dny po enukleaci. Tyto mladé erythrocyty se barví odlišně od starších forem. Po dobu jejich dozrávání se barví modravě. Zralé formy erythrocytů se barví červenofialově. Mikrojádra musí být umístěna v cytoplazmě, a jejich velikost nesmí přesahovat velikost 1/3 velikosti jádra. Po expozici mutagenní látkou se počet mikrojader v těchto buňkách zvyšuje a je mírou genotoxicity testované látky. Mikronukleus test byl prováděn metodou podle Schmida (1975).

Z výplachu kostní dřene femuru byl po homogeizaci a centrifugaci proveden nátěr na 3 podložní skla pro každé laboratorní zvíře. Nátěry kostní dřene na podložních sklech byly obarveny Giemsovým barvivem. U každého pokusného zvířete bylo hodnoceno 1000 polychromatofilních erythrocytů a frekvence mikrojader (při zvětšení 1000x pod imersí). Pro každou experimentální skupinu

zvířat byl vyjádřen průměrný počet mikrojader vztažený na 1000 hodnocených buněk. Statistické hodnocení výsledků mikronukleus testu bylo provedeno Studentovým t-testem na 5% hladině významnosti.

**Single cell gel electrophoresis (SCGE)**, častěji používaným názvem je **comet assay** nebo **kometový test** je rychlá, citlivá metoda určená k analýze DNA zlomů v jádrech buněk a je prakticky použitelná u všech eukaryotních buněčných populací, ze kterých může být získána suspenze jednotlivých buněk. S pomocí SCGE lze sledovat účinky známých genotoxických a mutagenních látek i testovat neznámé látky z hlediska jejich potenciální genotoxicity.

Metoda umožňuje detekci jednořetězcových zlomů DNA v jednotlivých buňkách vyšetřovaného biologického materiálu. Poškození DNA, které se manifestuje jako zlom, může být projevem genotoxických vlivů nebo může být přechodným jevem vznikajícím v důsledku oprav DNA. Detekce poškození DNA pomocí metody comet assay představuje tedy aktuální stav buňky.

Zlomy DNA nebo alkalilabilní místa indukovaná v molekule DNA chemickými látkami (adukty) umožňují uvolnění superspiralizovaných domén DNA a částečné rozpletení dvoušroubovice. Uvolněné domény DNA zůstávají ukotveny v jádře, ale během elektroforézy jsou vytaženy z jádra ven. Po obarvení (např. ethidiumbromidem) připomíná takováto buňka s fragmenty DNA mimo jádro svým tvarem ve fluorescenčním mikroskopu obraz komety, což také dalo této metodě název. Pomocí obrazové počítačové analýzy se obraz dále vyhodnocuje

Metoda byla prováděna podle Collinse (1997). Kostní dřev pro comet assay byla zpracována tak, že 15 µg suspenze bylo zředěno 18 µg PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a po smíchání s 85 µg svrchní nízkotuhnoucí LMP agarosy aplikována na upravené podložní sklo, na které byla nanesena standardní HMP agarosa.. Vzorek jater (cca 40 mg z *lobus hepatis dex.*) byl homogenizován a smíchán s 2 ml roztoku trypsinu, 10 min inkubován při 37°C. Trypsinizace byla zastavena roztokem PBS a suspenze po centrifugaci (1000 otáček po dobu 5 min) resuspendována v PBS s bovinním sérem a 35 µl suspenze bylo smícháno s 85 µl svrchní agarosy a naneseno na upravené podložní sklo. Další postup je u všech

vzorků společný a probíhá v chlazeném prostředí, kyvety i elektroforetické tanky jsou umístěny v lednici za stálé teploty 4°C. Buňky fixované v agarosovém gelu na podložních sklíčkách byly 60 min lysovány v lisačním roztoku. Po lysaci zůstává v agarosovém gelu fixovaná DNA se zachovanou superspirální strukturou. Následuje 40 min alkalické rozplétání DNA v elektroforetickém pufru pH 13,0, během kterého dochází k uvolnění spiralisace DNA v oblasti zlomů. Uvolněné části DNA mají přirozeně záporný náboj a v horizontálním elektroforetickém boxu migrují směrem k anodě. Rychlost jejich migrace závisí na velikosti a počtu fragmentů DNA. Po dokončení elektroforesy, která probíhá po dobu 30 min (25 V a 300 mA) a neutralisaci byly preparáty obarveny fluorescenčním barvivem (ethidium bromid) a hodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem za využití počítačové analýzy obrazu (LUCIA-G). U jednotlivých zvířat bylo randomisovaně hodnoceno 50 buněk z kostní dřeně i z jaterní tkáně. Ke statistickému hodnocení byl použit Mann-Whitney U-test. Tento test byl zvolen s ohledem na nespojitě rozložení dat.

## 5. Výsledky

### 5.1. Testování antimutagenních účinků kyseliny elagové (EA)

#### 5.1.1. Amesův test

V Amesově testu vykazovaly všechny mutageny (IQ, AFB<sub>1</sub> a MNU) v použitých koncentracích mutagenní účinky v závislosti na dávce. Samotná kyselina elagová, stejně jako resveratrol a dialylsulfid, nevykazovala na bakteriálních kmenech (TA98, TA100) mutagenní aktivitu.

#### Kyselina elagová v kombinaci s mutagenem IQ

Dvě nejvyšší koncentrace EA, tj. 30 a 300 µg na miskou vykazovaly statisticky významnou antimutagenní aktivitu na kmenech TA98 i TA100. Na kmeni TA98 snižovaly tyto dvě koncentrace mutagenní aktivitu dávky IQ 0,1 µg/misku o 56 a 72%, mutagenita IQ v koncentraci 0,01 µg/misku byla snížena o 75 a 86%, efekt nejnižší dávky IQ 0,001 µg/misku byl snížen o 57 a 62%.

Na kmeni TA100 dvě nejvyšší koncentrace EA snižovaly mutagenní aktivitu jednotlivých dávek IQ následujícím způsobem: mutagenita IQ v dávce 10 µg/misku

byla snížena o 90 a 86%, v dávce 1 µg/misku o 81 a 73% a v dávce 0,1 µg/misku o 41 a 29%. Na kmeni **TA100** byla koncentrace EA 30µg/misku účinnější než koncentrace EA 300µg/misku v kombinaci se všemi koncentracemi IQ, na kmeni **TA98** byla nejefektivnější koncentrace EA 300µg/misku. Efekt dvou nižších dávek EA na mutagenitu IQ nebyl statisticky významný (**Tab. 1**).

#### Kyselina elagová v kombinaci s mutagenem AFB<sub>1</sub>

U všech testovaných koncentrací AFB<sub>1</sub> na obou kmenech **TA98** i **TA100** byla pozorována vyšší účinnost koncentrace EA 30 µg/misku ve srovnání s koncentrací 300 µg/misku. Zde byla mutagenita AFB<sub>1</sub> v koncentraci 10 µg/misku snížena dávkami EA 30 a 300 µg/misku o 56 a 36% u kmene **TA98**, o 57 a 34% u kmene **TA100**. Mutagenita AFB<sub>1</sub> v koncentraci 1 µg/misku o 63 a 54% u kmene **TA98** a 73 a 57 % u kmene **TA100**. Nejnižší koncentrace AFB<sub>1</sub> 0,1 µg/misku byla redukována o 51 a 41% u kmene **TA98** a 47 a 23% u kmene **TA100** ve srovnání s aktivitou jednotlivých dávek samotného mutagenu. Výše uvedené výsledky představovaly signifikantní pokles.

Antimutagenní účinek dvou nižších koncentrací EA (0,3 a 3 µg/misku) nebyl statisticky významný, s výjimkou kombinace těchto koncentrací EA s AFB<sub>1</sub> 1µg/misku u kmene **TA100**, kde tyto dvě nejnižší koncentrace EA snižovaly mutagenitu AFB<sub>1</sub> o 34 a 44% a kombinace 3 µg EA a 10 µg AFB<sub>1</sub> u kmene **TA98** o 17% (**Tab. 2**).

#### Kyselina elagová v kombinaci s mutagenem MNU

Účinek přímého mutagenu MNU v nejvyšší koncentraci (1000 µg/misku) nebyl kyselinou elagovou ovlivněn, pouze aktivita nižších koncentrací 100 a 10 µg/misku byla nesignifikantně snížena v rozmezí 11-33 %. Antimutagenní aktivita byla celkově nižší než vůči nepřímým mutagenům a byla nejúčinnější v nejnižší koncentraci MNU (10 µg/misku), kde snížení mutagenity třemi vyššími koncentracemi EA bylo statisticky významné 23, 33 a 23% (**Tab.3**).



**Tab.1:** Efekt kyseliny elagové na mutagenitu IQ-Amesův test, kmeny TA98, TA100

IQ + EA dávka ( $\mu\text{g}/\text{misku}$ )	<i>S. typhimurium</i> TA98 +S9				<i>S. typhimurium</i> TA100 +S9				
	Počet revertant	$\pm SD$	K	%	dávka ( $\mu\text{g}/\text{misku}$ )	počet revertant	$\pm SD$	K	%
0,1 + 0	1222	183	29,8	-	10 + 0	1076	189	11,3	-
0,1 + 0,3	1360	98	33,2	+11	10 + 0,3	1082	231	11,4	-1
0,1 + 3	1223	98	29,8	0	10 + 3	866	295	9,1	-20
0,1 + 30	538 $\blacklozenge$	209	13,1	-56	10 + 30	108 $\blacklozenge$	17	1,1	-90
0,1 + 300	343 $\blacklozenge$	82	8,4	-72	10 + 300	155 $\blacklozenge$	38	1,6	-86
0,01 + 0	583	136	14,2	-	1 + 0	578	207	6,1	-
0,01 + 0,3	578	151	14,1	-1	1 + 0,3	603	276	6,2	+4
0,01 + 3	562	210	13,7	-4	1 + 3	560	299	5,9	-3
0,01 + 30	144 $\blacklozenge$	43	3,5	-75	1 + 30	97 $\blacklozenge$	10	1,0	-81
0,01 + 300	82 $\blacklozenge$	20	2,0	-86	1 + 300	142 $\blacklozenge$	35	1,5	-73
0,001 + 0	126	37	3,1	-	0,1 + 0	169	43	1,8	-
0,001 + 0,3	143	55	3,5	+14	0,1 + 0,3	180	58	1,9	+7
0,001 + 3	131	26	3,2	+4	0,1 + 3	152	60	1,6	-10
0,001 + 30	54 $\blacklozenge$	10	1,3	-57	0,1 + 30	100 *	10	1,1	-41
0,001 + 300	48 $\blacklozenge$	7	1,2	-62	0,1 + 300	120 *	16	1,3	-29
Kontrola (DMSO)	41	5	-	-	Kontrola (DMSO)	95	5	-	-
0 + 0,3	40	7	1,0	-	0 + 0,3	120	20	1,3	-
0 + 3	37	5	0,9	-	0 + 3	106	7	1,1	-
0 + 30	33	9	0,8	-	0 + 30	102	18	1,1	-
0 + 300	43	7	1,0	-	0 + 300	135	23	1,4	-

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ ) $\blacklozenge$  : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagení efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu  $\times 100$ 

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab.2 :** Efekt kyseliny elagové na mutagenitu AFB<sub>1</sub> – Amesův test, kmeny TA98, TA100

AFB <sub>1</sub> + EA dávk (μg/misku)	<i>S. typhimurium</i> TA98 +S9				<i>S. typhimurium</i> TA100 +S9			
	počet revertant	±SD	K	%	počet revertant	±SD	K	%
10 + 0	1284	77	44,3	-	1573	74	15,3	-
10 + 0,3	1214	83	41,9	-6	1456	154	14,1	-7
10 + 3	1060 *	122	36,6	-17	1343	207	13,0	-15
10 + 30	568 ♦	151	19,6	-56	681 ♦	59	6,6	-57
10 + 300	824 ♦	147	28,4	-36	1033 ♦	213	10,0	-34
1 + 0	825	179	28,5	-	931	191	9,0	-
1 + 0,3	732	145	25,2	-11	613 *	148	6,0	-34
1 + 3	644	89	22,2	-22	522 ♦	125	5,1	-44
1 + 30	305 ♦	107	10,5	-63	255 ♦	73	2,5	-73
1 + 300	376 ♦	102	13,0	-54	404 ♦	90	3,9	-57
0,1 + 0	217	22	7,5	-	203	32	2,0	-
0,1 + 0,3	222	26	7,7	+2	197	27	1,9	-3
0,1 + 3	239	11	8,2	+10	165	21	1,6	-19
0,1 + 30	106 ♦	16	3,7	-51	107 *	11	1,0	-47
0,1 + 300	129 ♦	15	4,4	-41	157 *	9	1,5	-23
Kontrola (DMSO)	29	4	-	-	103	6	-	-
0 + 0,3	31	3	1,1	-	105	11	1,0	-
0 + 3,0	33	6	1,1	-	101	15	1,0	-
0 + 30,0	31	3	1,1	-	88	4	0,9	-
0 + 300,0	26	5	0,9	-	99	8	1,0	-

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu (p≤0,05)

♦ : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu (p≤0,01)

Antimutagení efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu x 100

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu  
se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab. 3:** Efekt kyseliny elagové na mutagenitu MNU – Amesův test – TA100

MNU + EA dávka (µg/misku)	<i>S. typhimurium TA100</i>			
	počet revertant	$\pm SD$	K	%
1000 + 0	1414	51	17,7	-
1000 + 0,3	1425	105	17,8	+1
1000 + 3	1406	96	17,6	-1
1000 + 30	1375	117	17,2	-3
1000 + 300	1539	139	19,2	+9
100 + 0	889	223	11,1	-
100 + 0,3	903	189	11,3	+2
100 + 3	989	189	12,4	+11
100 + 30	789	195	9,9	-11
100 + 300	672	185	8,4	-24
10 + 0	261	41	3,3	-
10 + 0,3	263	36	3,3	+1
10 + 3	202 *	22	2,5	-23
10 + 30	174 ♦	17	2,2	-33
10 + 300	201 *	25	2,5	-23
Kontrola (DMSO)	80	6	-	-
0 + 0,3	91	5	1,1	-
0 + 3	92	9	1,2	-
0 + 30	92	20	1,2	-
0 + 300	94	12	1,2	-

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ )

♦ : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

$\text{počet revertant mutagenu} - \text{počet revertant (mutagenu+antimutagenu)} / \text{počet revertant mutagenu} \times 100$

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu  
se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

### 5.1. 2. Mikronukleus test

U pokusných zvířat ovlivněných samotnou EA se počet mikrojaderek od kontrolní skupiny nelišil. U zvířat, kterým byly podávány mutageny, byl počet mikrojaderek na 1000 hodnocených polychromatofilních erytrocytů statisticky významně vyšší oproti kontrolní skupině. Při perorální aplikaci kombinace AFB<sub>1</sub> v dávce 1x1 mg/kg a EA 3x4 g/kg byly počty mikrojaderek v polychromatofilních erytrocytech statisticky významně nižší (3,8), než u skupiny laboratorních myší, kterým byl aplikován pouze AFB<sub>1</sub> (7,7). K podobnému efektu došlo i při použití IQ jako mutagenu v dávce 1x20mg/kg a EA 3x4 g/kg (snížení z 8 na 4,9). Rovněž po ovlivnění myší kombinací MNU 1x50 mg/kg a EA 3x4 g/kg došlo k výraznému snížení počtu mikrojaderek oproti počtu mikrojaderek, vyvolanému podáním samotné MNU (z 20,6 na 13,5) (**Tab. 4**).

**Tab. 4:** Počty mikrojaderek v polychromatofilních erytrocytech kostní dřeně myší ovlivněných kombinacemi kyseliny elagové se sledovanými mutageny.

Sledovaná látka	Počty mikrojaderek $\pm$ SD
Kontrola 7% DMSO	2,8 $\pm$ 1,6
Kyselina elagová	2,7 $\pm$ 1,2
AFB <sub>1</sub>	7,7* $\pm$ 2,2
AFB <sub>1</sub> + K. elagová	3,8** $\pm$ 2,4
IQ	8* $\pm$ 2
IQ + K. elagová	4,9** $\pm$ 2
MNU	20,6* $\pm$ 5,7
MNU + K. elag.	13,5** $\pm$ 2,7

X\* : statisticky významně vyšší počet mikrojaderek oproti negativní kontrole

X\*\* : statisticky významně nižší počet mikrojaderek oproti samotnému mutagenu

## 5.2. Testování antimutagenních účinků resveratrolu (RES)

### 5.2.1. Amesův test

RES snižoval mutagenní aktivitu všech koncentrací IQ pouze s výjimkou kombinace IQ s nejnižší dávkou RES 0,3 $\mu$ g/misku na kmeni **TA98**. Nejúčinnější byla nejvyšší koncentrace RES 300 $\mu$ g/misku, která snižovala zvláště výrazně mutagenitu vyšších koncentrací IQ (tj. 0,1 a 0,01  $\mu$ g na **TA98**, 10 a 1 $\mu$ g na **TA100**) v rozmezí o 85 až 96%. Mutagenita nejnižších koncentrací IQ (0,001  $\mu$ g na **TA98** a 0,1  $\mu$ g na **TA100**) byla snížena touto dávkou RES o 63% v obou případech. Nižší koncentrace RES (30 a 3  $\mu$ g/misku) snižovaly rovněž mutagenitu všech koncentrací IQ na obou kmenech **TA98** a **TA100** statisticky významným způsobem. Nejnižší koncentrace RES (0,3  $\mu$ g/misku) jevila nejslabší efekt, který se na kmeni **TA100** pohyboval v rozmezí 18-37%, v kombinaci s IQ 1 a 0,1 $\mu$ g/misku byl statisticky významný (**Tab.5**).

Také vůči AFB<sub>1</sub> byla antimutagenní aktivita RES nejsilnější v nejvyšší koncentraci tohoto antimutagenu v pokusech na obou kmenech (v rozmezí 62 – 93% inhibice). Nejnižší koncentrace RES 0,3  $\mu$ g/misku prakticky neovlivňovala mutagenitu většiny koncentrací AFB<sub>1</sub> u obou kmenů (s výjimkou kombinace 1  $\mu$ g AFB<sub>1</sub> a 0,3  $\mu$ g RES kmen **TA100**), koncentrace 3  $\mu$ g RES zvyšovala mírně efekt dávky 10  $\mu$ g AFB<sub>1</sub> rovněž na obou kmenech a koncentrace 30  $\mu$ g RES zvýšila nevýznamně efekt této dávky pouze u kmene **TA100**. Až na tuto výjimku však koncentrace RES 30 $\mu$ g/misku snižovala statisticky významně mutagenitu AFB<sub>1</sub> v rozmezí o 15 - 65%. Statisticky významné snížení mutagenity bylo pozorováno také v kombinaci RES 3  $\mu$ g/ miskou a AFB<sub>1</sub> 1  $\mu$ g/ miskou u kmene **TA 100** (**Tab. 6**).

Podobně jako EA i RES nejevil výrazný antimutagenní efekt vůči přímému mutagenu MNU. Ve všech kombinacích tohoto mutagenu a RES bylo snížení mutagenní aktivity velmi slabé (3-11%), pouze v kombinaci 10  $\mu$ g MNU a 300  $\mu$ g RES na miskou byla mutagenita snížena o 21%. Toto snížení však nebylo statisticky významné (**Tab.7**).

**Tab. 5:** Efekt resveratrolu na mutagenitu IQ – Amesův test - TA98, TA100

IQ + RES dávka ( $\mu\text{g}/\text{misku}$ )	<i>S. typhimurium</i> TA98 +S9				<i>S. typhimurium</i> TA100 +S9				
	počet revertant	$\pm SD$	K	%	dávka ( $\mu\text{g}/\text{misku}$ )	Počet revertant	$\pm SD$	K	%
0,1 + 0	830	143	39,5		10 + 0	1877	73	18,4	
0,1 + 0,3	702	150	33,4	-15	10 + 0,3	1584	244	15,5	-18
0,1 + 3	508 $\blacklozenge$	87	24,2	-39	10 + 3	1400 *	264	13,7	-25
0,1 + 30	219 $\blacklozenge$	16	10,4	-74	10 + 30	592 $\blacklozenge$	126	5,8	-69
0,1 + 300	30 $\blacklozenge$	7	1,4	-96	10 + 300	129 $\blacklozenge$	11	1,3	-93
0,01 + 0	174	44	8,3		1 + 0	1100	157	10,8	
0,01 + 0,3	181	47	8,6	+4	1 + 0,3	734 $\blacklozenge$	170	7,2	-33
0,01 + 3	115 *	24	5,5	-34	1 + 3	401 $\blacklozenge$	67	3,9	-64
0,01 + 30	57 $\blacklozenge$	15	2,7	-67	1 + 30	174 $\blacklozenge$	11	1,7	-84
0,01 + 300	26 $\blacklozenge$	6	1,2	-85	1 + 300	106 $\blacklozenge$	8	1,0	-90
0,001 + 0	67	31	3,2		0,1 + 0	278	51	2,7	
0,001 + 0,3	65	32	3,1	-3	0,1 + 0,3	176 $\blacklozenge$	51	1,7	-37
0,001 + 3	44 *	8	2,1	-34	0,1 + 3	150 $\blacklozenge$	39	1,4	-46
0,001 + 30	36 *	7	1,7	-46	0,1 + 30	108 $\blacklozenge$	15	1,0	-61
0,001 + 300	25 *	6	1,2	-63	0,1 + 300	104 $\blacklozenge$	14	1,0	-63
Kontrola (DMSO)	21	3				102	15		
0 + 0,3	27	4	1,3		0 + 0,3	112	17	1,1	
0 + 3	24	5	1,1		0 + 3	110	7	1,1	
0 + 30	24	2	1,1		0 + 30	110	12	1,1	
0 + 300	23	4	1,1		0 + 300	115	14	1,1	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ ) $\blacklozenge$  : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagení efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu  $\times 100$ 

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab. 6:** Efekt resveratrolu na mutagenitu AFB<sub>1</sub> - Amesův test, kmeny TA98, TA100

AFB <sub>1</sub> + RES dávk ( $\mu\text{g}/\text{misku}$ )	<i>S. typhimurium TA98 +S9</i>				<i>S. typhimurium TA100 +S9</i>			
	počet revertant	$\pm SD$	K	%	počet revertant	$\pm SD$	K	%
10 + 0	1407	144	38,0		1540	236	13,3	
10 + 0,3	1460	103	39,5	+4	1550	273	13,4	+1
10 + 3	1561	49	42,2	+11	1835	205	15,8	+19
10 + 30	1195 *	71	32,3	-15	1850	318	15,9	+20
10 + 300	177 $\blacklozenge$	26	4,8	-87	586 $\blacklozenge$	33	5,1	-62
1 + 0	896	242	24,2		1490	417	12,8	
1 + 0,3	902	152	24,4	+1	1084	371	9,3	-27
1 + 3	757	88	20,5	-16	869 *	341	7,5	-42
1 + 30	324 $\blacklozenge$	21	8,8	-64	626 $\blacklozenge$	241	5,4	-58
1 + 300	67 $\blacklozenge$	9	1,8	-93	205 $\blacklozenge$	33	1,8	-86
0,1 + 0	252	130	6,8		504	124	4,3	
0,1 + 0,3	275	103	7,4	+9	511	175	4,4	+1
0,1 + 3	217	56	5,9	-14	397	92	3,4	-21
0,1 + 30	87 *	13	2,4	-65	225 $\blacklozenge$	17	1,9	-55
0,1 + 300	36 $\blacklozenge$	5	1,0	-86	145 $\blacklozenge$	6	1,3	-71
Kontrola (DMSO)	37	7			116	19		
0 + 0,3	36	2	1,0		139	4	1,2	
0 + 3	33	2	0,9		139	8	1,2	
0 + 30	31	5	0,8		139	7	1,2	
0 + 300	29	5	0,8		142	15	1,2	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ ) $\blacklozenge$  : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu x 100

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab. 7:** Efekt resveratrolu na mutagenitu MNU – Amesův test, kmen TA100

MNU + RES dávka (μg/misku)	<i>S. typhimurium TA100</i>			
	počet revertant	±SD	K	%
1000 + 0	2675	187	18,3	
1000 + 0,3	2577	237	17,7	-4
1000 + 3	2591	208	17,7	-3
1000 + 30	2590	140	17,7	-3
1000 + 300	2496	179	17,1	-7
100 + 0	2356	65	16,1	
100 + 0,3	2098	305	14,4	-11
100 + 3	2103	172	14,4	-11
100 + 30	2185	131	15,0	-7
100 + 300	2160	183	14,8	-8
10 + 0	452	191	3,1	
10 + 0,3	439	74	3,0	-3
10 + 3	429	83	2,9	-5
10 + 30	408	109	2,8	-10
10 + 300	357	64	2,5	-21
Kontrola (DMSO)	146	35		
0 + 0,3	151	32	1,0	
0 + 3	142	31	1,0	
0 + 30	144	29	1,0	
0 + 300	151	31	1,0	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu  $\times$  100

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu



### 5. 2. 2. Mikronukleus test

Perorální aplikace AFB<sub>1</sub> v dávce 1x1 mg/kg statisticky významně zvýšila počty mikrojadern v polychromatofilních erytrocytech ve srovnání s počtem mikrojadern u kontrolních skupin, kterým byl podán DMSO nebo RES (z 0,6 resp. 0,8 na 3,8). Aplikace mutagenu IQ v dávce 1x20 mg/kg zvýšila počet mikrojadern na 4 a MNU jako nejúčinnější mutagen v dávce 1x50 mg/kg zvýšil počet mikrojadern na 42,4 na 1000 hodnocených polychromatofilních erytrocytů.

Při perorální aplikaci kombinace RES 3x 5 mg/kg a AFB<sub>1</sub> v uvedené se zjištěné počty mikrojadern v polychromatofilních erytrocytech statisticky významně odlišovaly (2,8) od skupiny laboratorních myší, kterým byl aplikován pouze AFB<sub>1</sub>. Při použití IQ jako mutagenu snižoval RES v dávkách 3x5 mg/kg v kombinaci s mutagenem IQ v dávce 1x20 mg/kg statisticky významně jeho klastogenní účinky - počty mikrojadern byly signifikantně sníženy oproti počtu mikrojadern skupiny, ovlivněné samotným IQ (snížení z 4 na 2,5). Rovněž po ovlivnění myší kombinací RES v dávce 3x5 mg/kg s MNU 1x50 mg/kg došlo k výraznému snížení počtu mikrojadern oproti počtu mikrojadern, vyvolanému podáním MNU ( snížení z 42,4 na 31,8) (**Tab. 8**).

**Tab. 8:** Počty mikrojadern v polychromatofilních erytrocytech kostní dřeně myší, ovlivněných kombinacemi resveratrolu se sledovanými mutageny.

Sledovaná látka	Počty mikrojadern ± SD
Kontrola 7% DMSO	0,6 ± 0,4
Resveratrol	0,8 ± 0,7
AFB <sub>1</sub>	3,8* ± 1,1
AFB <sub>1</sub> + resveratrol	2,8** ± 0,9
IQ	4* ± 1,6
IQ + resveratrol	2,5** ± 1,6
MNU	42,4* ± 5,7
MNU + resveratrol	31,8** ± 9,3

X\* : statisticky významně vyšší počet mikrojadern oproti negativní kontrole

X\*\* : statisticky významně nižší počet mikrojadern oproti samotnému mutagenu

### 5.2.3. Comet assay

Antimutagenní účinek RES byl testován i pomocí metody *comet assay* za použití stejné dávky RES (3x5mg/kg) a mutagenů IQ (1x20mg/kg) a MNU (1x50mg/kg) jako v mikronukleus testu.

AFB<sub>1</sub> nebyl v této části pokusu testován, protože v předběžných pokusech vyvolával v jaterní tkáni pokusných zvířat pouze nesignifikantní zvýšení počtu zlomů DNA a také z důvodů kapacitních.

Počítačová analýza obrazu LUCIA-G hodnotí větší množství parametrů, které vyjadřují míru poškození DNA. Parametrem s dobrou výpovědní hodnotou je procentuální vyjádření DNA obsažené v „chvostu komety“, protože představuje relativní hodnotu, která umožňuje vzájemné srovnání výsledků získaných z buněk různého typu. % DNA v chvostu komety je parametr lineárně závislý na počtu zlomů přítomných v DNA. Proto jsou výsledky experimentů uváděny v %DNA mimo jádro buňky.

Již u kontrolní skupiny pokusných zvířat, které byl podáván pouze antimutagen, podání RES statisticky významně snižovalo % DNA uvolněné mimo jádra buněk. V kontrolní skupině, která nebyla ovlivněna podáním mutagenu nebo antimutagenu dosahovalo množství DNA mimo jádra buněk 3,86% v jaterní tkáni a 5,91% v buňkách kostní dřeně. Při podání RES bylo toto množství 1,17% v játrech a 1,53 % v kostní dřeni. Po podání mutagenu IQ dosáhlo množství DNA mimo jádra 19,67% v buňkách jater a 12,45% v kostní dřeni a ve skupině pokusných zvířat ovlivněné současně podáním RES bylo v játrech dosaženo 3,77% v jaterních buňkách, což je množství srovnatelné s kontrolou ( 3,86%) a 2,10% v kostní dřeni, tedy méně než u kontroly (5,91%). Po podání přímo působícího mutagenu MNU byl nárůst poškození DNA výrazně vyšší, než u nepřímých mutagenů tj. 25,38% v jaterních buňkách a 20,9% v buňkách kostní dřeně. Po podání RES byl efekt v jaterních buňkách minimální (24,43%), zatímco v buňkách kostní dřeně bylo snížení výrazné (9,42%) (**Tab. 9**).

Výsledky testování RES jsou uvedeny v publikaci č.1.

**Tab. 9:** Efekt RES na mutagenitu IQ a MNU- comet assay

	Kontrola		RES			IQ			RES + IQ				MNU			RES + MNU			
	M	SD	M	SD	p	M	SD	p	M	SD	p	p	M	SD	p	M	SD	p	p
Játra	3.86	0.88	1.17	1,24	*** 0.008	19.67	8,95	* 0.008	3.77	1,22	1.00	** 0.008	25.38	8.70	* 0.008	24.43	5.76	# 0.008	0.69
Kostní dřeň	5.91	2,00	1.55	0,20	*** 0.008	12.45	2,46	* 0.008	2.10	1,05	# 0.008	** 0.008	20.90	3.60	* 0.008	9.42	5.83	0.22	** 0.008

SE- standardní chyba

M - průměrné procento DNA mimo jádro

\* - statisticky významné zvýšení % DNA mimo jádro mezi kontrolou a skupinou s mutagenem

\*\* - statisticky významné snížení % DNA mimo jádro mezi skupinou s mutagenem a kombinací mutagenu a RES

\*\*\* - statisticky významné snížení % DNA mimo jádro mezi kontrolou a skupinou s RES

# - statisticky významný rozdíl v % DNA mimo jádro mezi kontrolou a skupinou s kombinací mutagenu a RES

### 5.3. Testování antimutagenních účinků dialylsulfidu (DAS)

#### 5.3.1. Amesův test

DAS vykazoval statisticky významnou antimutagenní aktivitu vůči nepřímému mutagenu IQ v dávce 300 $\mu$ g/misku na kmeni **TA98**, kde tato dávka snižovala mutagenní aktivitu dávky IQ 0,1 $\mu$ g/misku o 61%, dávky IQ 0,01 $\mu$ g/misku o 68% a dávky IQ 0,001  $\mu$ g/misku o 47%. Nižší koncentrace DAS (30  $\mu$ g/misku) snižovala mutagenitu uvedených dávek IQ o 31, 27 a 24%, koncentrace DAS 3  $\mu$ g/misku vykazovala pouze statisticky nevýznamné snížení mutagenity IQ na tomto kmeni. Nejnižší dávka DAS (0,3 $\mu$ g/misku) vykazovala rovněž statisticky nevýznamnou změnu mutagenity IQ. Ještě slabší efekt DAS vůči mutagenitě IQ byl pozorován na kmeni TA100. Zde nejvyšší dávka DAS 300 $\mu$ g/misku snižovala mutagenitu dávek IQ 10, 1,0 a 0,1  $\mu$ g/misku o 21, 30 a 26%, dávka DAS 30 $\mu$ g/misku byla účinná v rozmezí 10-23% inhibice těchto dávek IQ. Nejnižší dávka (0,3 $\mu$ g/misku), velmi slabě antimutagenní vůči dvěma vyšším dávkám IQ, dokonce slabě zvyšovala mutagenitu IQ 0,1 $\mu$ g/misku. Statisticky významný efekt byl pozorován na kmeni **TA100** pouze v kombinaci IQ 1 $\mu$ g/misku a DAS 30 a 300 $\mu$ g /misku (**Tab. 10**).

Ještě méně výrazný antimutagenní efekt DAS byl pozorován vůči dalšímu nepřímému mutagenu AFB<sub>1</sub>. Na kmeni **TA98** nejvyšší koncentrace AFB<sub>1</sub> (10  $\mu$ g/misku) byla redukována statisticky významně pouze v kombinaci s nejvyšší dávkou DAS (300 $\mu$ g/misku) o 35%. Nižší dávka AFB<sub>1</sub> 1 $\mu$ g/misku byla redukována statisticky významně koncentracemi DAS 300 a 30 $\mu$ g/misku o 39 a 15% a nejnižší dávka AFB<sub>1</sub> 0,1 $\mu$ g/misku o 42 a 32%, nižší dávky DAS (3 a 0,3 $\mu$ g) nejevily antimutagenní aktivitu. Na kmeni **TA100** při stejných použitých koncentracích mutagenu nejevily antimutagenní aktivitu vůči nejvyšší koncentraci AFB<sub>1</sub> všechny použité koncentrace DAS. Proti dvěma nižším koncentracím tohoto mutagenu byl efekt slabý, nejvyšší byl v kombinaci AFB<sub>1</sub> 0,1 $\mu$ g/misku a DAS 300 $\mu$ g/misku, kde byla mutagenita snížena o 26%. Avšak i toto snížení však bylo statisticky nevýznamné (**Tab.11**).

Nevýrazný antimutagenní efekt tří nižších dávek DAS (30, 3 a 0,3  $\mu$ g/misku) byl pozorován vůči přímému mutagenu MNU, použitému v dávkách 1000, 100 a 10  $\mu$ g/misku. Pouze dávka DAS 300 $\mu$ g/misku vykazovala statisticky významné snížení mutagenity v kombinaci s nejvyšší dávkou MNU o 21%, v kombinaci s MNU 100 $\mu$ g/misku o 27% a v kombinaci s nejnižší dávkou MNU o 41% (**Tab. 12**).

**Tab. 10:** Efekt DAS na mutagenitu IQ – Amesův test, kmeny TA98, TA100

IQ + DAS dávka ( $\mu\text{g}/\text{misku}$ )	<i>S. typhimurium TA98 +S9</i>				<i>S. typhimurium TA100 +S9</i>				
	Počet revertant	$\pm SD$	K	%	dávka ( $\mu\text{g}/\text{misku}$ )	počet revertant	$\pm SD$	K	%
0,1 + 0	1212	167	40,4		10 + 0	1515	320	13,7	
0,1 + 0,3	1179	261	39,3	-3	10 + 0,3	1437	467	13,0	-5
0,1 + 3	1076	213	35,9	-11	10 + 3	1434	397	12,9	-5
0,1 + 30	840 $\blacklozenge$	169	28,0	-31	10 + 30	1295	341	11,7	-15
0,1 + 300	467 $\blacklozenge$	272	15,7	-61	10 + 300	1204	181	10,9	-21
0,01 + 0	300	57	10,0		1 + 0	871	96	7,9	
0,01 + 0,3	245	158	8,2	-18	1 + 0,3	794	84	7,2	-9
0,01 + 3	247	92	8,2	-18	1 + 3	681	245	6,1	-22
0,01 + 30	220 *	54	7,3	-27	1 + 30	667 *	173	6,0	-23
0,01 + 300	97 $\blacklozenge$	45	3,2	-68	1 + 300	607 $\blacklozenge$	84	5,5	-30
0,001 + 0	93	27	3,1		0,1 + 0	301	71	2,7	
0,001 + 0,3	95	20	3,2	+2	0,1 + 0,3	336	84	3,0	+12
0,001 + 3	87	35	2,9	-6	0,1 + 3	283	40	2,6	-6
0,001 + 30	71	13	2,4	-24	0,1 + 30	271	72	2,4	-10
0,001 + 300	49 $\blacklozenge$	12	1,6	-47	0,1 + 300	222	75	2,0	-26
Kontrola (DMSO)	30	8			Kontrola (DMSO)	111	15		
0 + 0,3	29	7	1,0		0 + 0,3	148	25	1,3	
0 + 3	31	14	1,0		0 + 3	178	82	1,6	
0 + 30	29	14	1,0		0 + 30	169	79	1,5	
0 + 300	31	13	1,0		0 + 300	127	53	1,1	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ ) $\blacklozenge$  : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu  $\times 100$ 

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab. 11:** Efekt DAS na mutagenitu AFB<sub>1</sub> - Amesův test, kmeny TA98, TA100

AFB <sub>1</sub> + DAS	<i>S. typhimurium TA98 +S9</i>				<i>S. typhimurium TA100 +S9</i>			
	dávka (µg/misku)	počet revertant	±SD	K	%	počet revertant	±SD	K
10 + 0	1260	77	34,1		1351	211	12,3	
10 + 0,3	1277	78	34,5	+1	1340	225	12,2	-1
10 + 3	1298	81	35,1	+3	1333	226	12,1	-1
10 + 30	1272	104	34,4	+1	1375	229	12,5	+2
10 + 300	824 *	275	22,3	-35	1371	78	12,5	+2
1 + 0	606	75	16,4		1095	228	10,0	
1 + 0,3	556	39	15,0	-8	1056	310	9,6	-4
1 + 3	528	110	14,3	-13	1006	309	9,2	-8
1 + 30	518 *	41	14,0	-15	1037	315	9,4	-5
1 + 300	367 ♦	136	9,9	-39	919	246	8,4	-16
0,1 + 0	145	39	3,9		473	181	4,3	
0,1 + 0,3	154	32	4,2	+6	421	236	3,8	-11
0,1 + 3	132	21	3,6	-9	425	214	3,9	-10
0,1 + 30	99 *	10	2,7	-32	404	177	3,7	-15
0,1 + 300	84 *	39	2,3	-42	351	115	3,2	-26
Kontrola (DMSO)	37	6			110	12		
0 + 0,3	34	3	0,9		118	7	1,1	
0 + 3	40	1	1,1		127	10	1,2	
0 + 30	35	5	0,9		127	24	1,2	
0 + 300	36	4	1,0		114	12	1,0	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu (p≤0,05)

♦ : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu (p≤0,01)

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu x 100

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab. 12:** Efekt DAS na mutagenitu MNU – Amesův test, kmen TA100

MNU + DAS dávka (µg/misku)	<i>S. typhimurium TA100</i>			
	počet revertant	$\pm SD$	K	%
1000 + 0	2749	211	18,8	
1000 + 0,3	2722	229	18,6	-1
1000 + 3	2670	224	18,3	-3
1000 + 30	2669	255	18,3	-3
1000 + 300	2164 ♦	362	14,8	-21
100 + 0	2361	277	16,1	
100 + 0,3	2242	232	15,4	-5
100 + 3	2234	202	15,3	-5
100 + 30	2242	290	15,4	-5
100 + 300	1717 ♦	244	11,8	-27
10 + 0	451	51	3,1	
10 + 0,3	469	82	3,2	+4
10 + 3	444	78	3,0	-2
10 + 30	392	40	2,7	-13
10 + 300	267 ♦	49	1,8	-41
Kontrola (DMSO)	146	35		
0 + 0,3	167	42	1,1	
0 + 3	178	42	1,2	
0 + 30	176	46	1,2	
0 + 300	173	43	1,2	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ )♦ : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu  $\times 100$ se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu  
se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

### 5.3. 2. Mikronukleus test

Počet mikrojaderek se u zvířat ovlivněných samotným DAS se statisticky významně nelišil od kontrolní skupiny. Při perorální aplikaci kombinace DAS v dávce 3x100 mg/kg a AFB<sub>1</sub> 1x1 mg/kg se zjištěné počty mikrojaderek v polychromatofilních erythrocytech (3) statisticky významně odlišovaly od skupiny laboratorních myší, kterým byl aplikován pouze AFB<sub>1</sub> (9,1). Při použití IQ jako mutagenu snižoval DAS v dávce 3x100 mg/kg v kombinaci s mutagenem IQ 1x20 mg/kg statisticky významně jeho klastogenní účinky - počty mikrojaderek byly signifikantně sníženy (3,4) oproti počtu mikrojaderek skupiny, ovlivněné samotným IQ (6,5). Rovněž po ovlivnění myší kombinací DAS v dávce 3x100 mg/kg s MNU 1x50 mg/kg došlo k výraznému snížení počtu mikrojaderek oproti počtu mikrojaderek, vyvolanému podáním pouze MNU (z 32,2 na 15,4) (**Tab. 13**).

**Tab. 13:** Počty mikrojaderek v polychromatofilních erythrocytech kostní dřeně myší, ovlivněných kombinacemi dialylsulfidu se sledovanými mutageny.

Sledovaná látka	Počty mikrojaderek $\pm$ SD
Kontrola 7% DMSO	1,8 $\pm$ 1,1
Dialylsulfid	2,6 $\pm$ 0,8
AFB <sub>1</sub>	9,1* $\pm$ 1,8
AFB <sub>1</sub> + Dialylsulfid	3,0** $\pm$ 0,9
IQ	6,5* $\pm$ 1,6
IQ + Dialylsulfid	3,4** $\pm$ 1,9
MNU	32,2* $\pm$ 4,4
MNU + Dialylsulfid	15,4** $\pm$ 3,4

X\* : statisticky významně vyšší počet mikrojaderek oproti negativní kontrole

X\*\* : statisticky významně nižší počet mikrojaderek oproti samotnému mutagenu



#### **5.4. Testování antimutagenních účinků fenetyl isothiokyanátu (PEITC)**

##### *5.4.1. Amesův test*

PEITC v dávce 30 $\mu$ g/misku velmi silně snižoval mutagenní účinky všech použitých koncentrací nepřímých mutagenů (IQ a AFB<sub>1</sub>), ale i přímého mutagenu (MNU). Vyšší dávka PEITC (300 $\mu$ g/misku) byla v kombinacích s různými dávkami tří mutagenů toxická, rovněž samotný PEITC ve stejné koncentraci vykazoval toxicitu vůči testovacím bakteriálním kmenům. Dávky samotného PEITC 30, 3 a 0,3  $\mu$ g /misku nevykazovaly mutagenní aktivitu na žádném z použitých kmenů bakterií.

V kombinaci s IQ vykazovaly všechny tři koncentrace PEITC statisticky významnou antimutagenní aktivitu na kmenech **TA98** i **TA100**, s výjimkou kombinace IQ 10 $\mu$ g/misku a PEITC 0,3 $\mu$ g/misku na kmeni **TA100**. Dávka PEITC 30 $\mu$ g/misku snižovala mutagenitu různých dávek IQ (0,1, 0,01 a 0,001  $\mu$ g/misku) o 99, 93 a 74% na kmeni **TA98**, mutagenitu dávek 10, 1 a 0,1  $\mu$ g/misku o 94, 87 a 60% na kmeni **TA100**. Toto snížení dosáhlo až na kontrolní hodnoty revertant, v kombinaci s IQ 0,1 $\mu$ g/misku na kmeni **TA98** dokonce silně pod tyto kontrolní hodnoty. Nižší dávka PEITC 3 $\mu$ g/misku snižovala efekt stejných koncentrací IQ o 78, 76 a 67 % na kmeni **TA98** a o 59, 65 a 47 % na kmeni **TA100**. nejnižší koncentrace PEITC 0,3  $\mu$ g/misku snižovala mutagenitu o 29, 29 a 40% v testech na kmeni **TA98** a o 11, 33 a 25% na **TA100** (**Tab. 14**).

Rovněž mutagenita AFB<sub>1</sub> (koncentrace 10, 1 a 0,1  $\mu$ g/misku pro oba kmene) byla snížena statisticky významně dávkou 30  $\mu$ g/misku PEITC o 94, 91 a 86 % na kmeni **TA98**, o 88, 89 a 82% na kmeni **TA100**. Koncentrace 3  $\mu$ g/misku PEITC snižovala efekt tří koncentrací AFB<sub>1</sub> o 31, 65 a 37 % na kmeni **TA98** a o 30, 56 a 49% na **TA100**, snížení bylo opět statisticky významné. Nejnižší koncentrace PEITC 0,3 $\mu$ g/misku neovlivnila nejvyšší koncentraci mutagenu AFB<sub>1</sub> (10 $\mu$ g/misku) na obou kmenech, další dvě koncentrace mutagenu byly touto dávkou PEITC ovlivněny v rozmezí 15–37% inhibice mutagenity samotného AFB<sub>1</sub>, toto snížení bylo většinou statisticky významné. Kombinace 30 $\mu$ g/misku PEITC a 0,1 $\mu$ g/misku AFB<sub>1</sub> snižovala počty revertant pod kontrolní hodnoty na obou kmenech (**Tab. 15**).

PEITC v koncentraci 30  $\mu$ g/misku snižoval velmi silně i mutagenitu přímého mutagenu MNU v koncentracích 1000, 100 a 10  $\mu$ g/misku, a to o 80, 90 a 78 % na kmeni **TA100**. Nižší dávky PEITC byly ale málo účinné. Pouze v kombinaci se dvěma nižšími koncentracemi mutagenu snižovaly statisticky nevýznamně

mutagenitu MNU. Nejnižší koncentrace PEITC 0,3 µg/misku nejevila v kombinaci s MNU v dávkách 1000 a 100 µg/misku vůbec žádný efekt (Tab. 16).

**Tab. 14:** Efekt PEITC na mutagenitu IQ – Amesův test, kmeny TA98, TA100

IQ+ PEITC dávka (µg/misku)	<i>S. typhimurium TA98 +S9</i>				<i>S. typhimurium TA100 +S9</i>				
	počet revertant	$\pm SD$	K	%	dávka µg/misku	Počet revertant	$\pm SD$	K	%
0,1 + 0	1080	44	43,2		10 + 0	1710	216	18,4	
0,1 + 0,3	764 ♦	85	30,6	-29	10 + 0,3	1517	128	16,3	-11
0,1 + 3	238 ♦	38	9,5	-78	10 + 3	706 ♦	148	7,6	-59
0,1 + 30	13 ♦	4	0,5	-99	10 + 30	98 ♦	35	1,1	-94
0,1 + 300	0		-	-	10 + 300	0		-	-
0,01 + 0	310	35	12,4		1 + 0	648	103	7,0	
0,01 + 0,3	220 ♦	51	8,8	-29	1 + 0,3	432 ♦	27	4,7	-33
0,01 + 3	75 ♦	10	3,0	-76	1 + 3	225 ♦	77	2,4	-65
0,01 + 30	23 ♦	19	0,9	-93	1 + 30	87 ♦	27	0,9	-87
0,01 + 300	0		-	-	1 + 300	0		-	-
0,001 + 0	97	9	3,9		0,1 + 0	206	24	2,2	
0,001 + 0,3	58 ♦	9	2,3	-40	0,1 + 0,3	154 ♦	7	1,7	-25
0,001 + 3	32 ♦	5	1,3	-67	0,1 + 3	110 ♦	25	1,2	-47
0,001 + 30	25 ♦	12	1,0	-74	0,1 + 30	82 ♦	15	0,9	-60
0,001 + 300	0		-	-	0,1 + 300	0		-	-
Kontrola (DMSO)	25	5			Kontrola (DMSO)	93	19		
0 + 0,3	28	4	1,1		0 + 0,3	91	9	1,0	
0 + 3	29	4	1,2		0 + 3	85	8	0,9	
0 + 30	20	7	0,8		0 + 30	83	3	0,9	
0 + 300	0		-		0 + 300	0		-	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ )

♦ : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagení efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu x 100

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab. 15:** Efekt PEITC na mutagenitu AFB<sub>1</sub> - Amesův test, kmeny TA98, TA100

AFB <sub>1</sub> + PEITC dávka (μg/misku)	<i>S. typhimurium TA98 +S9</i>				<i>S. typhimurium TA100 +S9</i>			
	počet revertant	$\pm SD$	K	%	počet revertant	$\pm SD$	K	%
10 + 0	908	209	39,5		1377	63	12,5	
10 + 0,3	941	238	40,9	+4	1353	57	12,3	-2
10 + 3	624 *	50	27,1	-31	965 ♦	64	8,8	-30
10 + 30	52 ♦	34	2,3	-94	161 ♦	82	1,5	-88
10 + 300	0		-	-	0		-	-
1 + 0	440	106	19,1		852	80	7,8	
1 + 0,3	309 *	52	13,4	-30	536 ♦	93	4,9	-37
1 + 3	154 ♦	48	6,7	-65	372 ♦	34	3,4	-56
1 + 30	39 ♦	23	1,7	-91	94 ♦	29	0,9	-89
1 + 300	0		-	-	0		-	-
0,1 + 0	120	12	5,2		391	32	3,6	
0,1 + 0,3	102	15	4,4	-15	259 ♦	57	2,4	-34
0,1 + 3	76 ♦	17	3,3	-37	199 ♦	25	1,8	-49
0,1 + 30	17 ♦	8	0,7	-86	69 ♦	21	0,6	-82
0,1 + 300	0		-	-	0		-	-
Kontrola (DMSO)	23	3			110	14		
0 + 0,3	26	5	1,1		102	8	0,9	
0 + 3	30	3	1,3		103	12	0,9	
0 + 30	21	5	0,9		79	19	0,7	
0 + 300	0		-		0		-	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ )

♦ : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

$\text{počet revertant mutagenu} - \text{počet revertant (mutagenu+antimutagenu)} / \text{počet revertant mutagenu} \times 100$

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

**Tab. 16:** Efekt PEITC na mutagenitu MNU – Amesův test, kmen TA100

MNU + PEITC dávka (µg/misku)	<i>S. typhimurium TA100</i>			
	počet revertant	$\pm SD$	K	%
1000 + 0	1324	370	16,0	
1000 + 0,3	1326	349	16,0	0
1000 + 3	1312	299	15,8	-1
1000 + 30	267 ♦	168	3,2	-80
1000 + 300	0		-	-
100 + 0	1594	557	19,2	
100 + 0,3	1587	459	19,1	0
100 + 3	1441	486	17,4	-10
100 + 30	159 ♦	145	1,9	-90
100 + 300	0		-	-
10 + 0	300	43	3,6	
10 + 0,3	279	53	3,4	-7
10 + 3	237	52	2,9	-21
10 + 30	65 ♦	12	0,8	-78
10 + 300	0		-	-
Kontrola (DMSO)	83	11		
0 + 0,3	86	5	1,0	
0 + 3	94	3	1,1	
0 + 30	60	16	0,7	
0 + 300	0		-	

SD : směrodatná odchylka

K : poměr počtu revertant testovaného vzorku a počtu revertant v negativní kontrole

\* : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,05$ )♦ : statisticky významný rozdíl v počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu ( $p \leq 0,01$ )

Antimutagenní efekt testované látky (vyjádřeno %):

počet revertant mutagenu – počet revertant (mutagenu+antimutagenu) / počet revertant mutagenu  $\times 100$ 

se znaménkem - = snížení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

se znaménkem + = zvýšení počtu revertant testovaného vzorku ve srovnání s počtem revertant samotného mutagenu

#### 5.4.2 Mikronukleus test

PEITC podávaný samostatně v dávce 3x50 mg/kg nevykazoval v mikronukleus testu klastogenní účinky (2,3 mikrojadra po podání PEITC a u kontroly 1,8, rozdíl nebyl statisticky významný).

Při perorální aplikaci kombinace PEITC v dávce 3x50 mg/kg a AFB<sub>1</sub> 1x1 mg/kg se zjištěné počty mikrojadra v polychromatofilních erythrocytech (4,2) statisticky významně odlišovaly od skupiny laboratorních myší, kterým byl aplikován pouze AFB<sub>1</sub> (9,1). K podobnému efektu došlo i při použití IQ jako mutagenu. PEITC v kombinaci s mutagenem IQ (3x50 mg/kg + 1x20 mg/kg) statisticky významně snižoval jeho klastogenní účinky (snížení počtu mikrojadra z 6,5 na 3). Rovněž po ovlivnění myší kombinací PEITC 3x50mg/kg s MNU 1x50mg/kg došlo k statisticky významnému snížení počtu mikrojadra oproti jejich počtu, vyvolanému podáním samotné MNU (**Tab. 17**).

**Tab. 17:** Počty mikrojadra v polychromatofilních erythrocytech kostní dřeně myší, ovlivněných kombinacemi fenetyl isothiokyanátu se sledovanými mutageny.

Sledovaná látka	Počty mikrojadra $\pm$ SD
Kontrola 7% DMSO	1,8 $\pm$ 1,1
Fenethyl isothiokyanát	2,3 $\pm$ 1,9
AFB <sub>1</sub>	9,1* $\pm$ 1,8
AFB <sub>1</sub> + PEITC	4,2** $\pm$ 1,6
IQ	6,5* $\pm$ 1,6
IQ + PEITC	3** $\pm$ 1,5
MNU	32,2* $\pm$ 4,4
MNU + PEITC	19,8** $\pm$ 2,3

X\* : statisticky významně vyšší počet mikrojadra oproti negativní kontrole

X\*\* : statisticky významně nižší počet mikrojadra oproti samotnému mutagenu

## 6. Diskuze

Testované chemoprotektivní látky (tj. kyselina elagová, resveratrol, dialylsulfid a fenetyl isothiokyanát) nevykazovaly v použitých koncentracích mutagenitu v žádném z prováděných testů. V Amesově testu byl pozorován výraznější vliv všech testovaných látek na snížení genotoxického efektu nepřímých mutagenů AFB<sub>1</sub> a IQ než na mutagenitu přímého mutagenu MNU nebo AFB<sub>1</sub>. V mikronukleus testu byly ověřeny dávky mutagenů, indukujících u myši signifikantní zvýšení počtu mikrojader oproti kontrole (AFB<sub>1</sub> 1 mg/kg, IQ 20 mg/kg a MNU 50 mg/kg). Tyto dávky byly dále použity ke stanovení antimutagenní aktivity sledovaných látek (Bárta *et al.*, 1990). V testech *in vivo* byl prokázán signifikantní antimutagenní (antiklastogenní) účinek kyseliny elagové, resveratrolu, dialylsulfidu a fenetyl isothiokyanátu aplikovaných ve třech opakovaných dávkách před jednorázovou aplikací mutagenu. Působení resveratrolu bylo také sledováno metodou comet assay v kombinaci s nepřímým mutagenem IQ, kdy byl prokázán pozitivní efekt na snížení množství zlomů DNA v buňkách jater a kostní dřeně a v kombinaci s přímým mutagenem MNU, kdy se efekt projevil pouze u kostní dřeně, ale u jaterních buněk byl účinek minimální.

Antimutagenní účinky **kyseliny elagové** vůči nepřímým mutagenům byly již v minulosti sledovány. Inhibiční efekt kyseliny elagové na mutagenitu indukovanou AFB<sub>1</sub> v Amesově testu popsal ve své studii Loarca-Pina *et al.*, (1998). Snížení mutagenního účinku IQ působením kyseliny elagové popsal také Ayrton *et al.* (1992). Inhibiční efekt kyseliny elagové a resveratrolu vůči účinkům mutagenu benzidinu byl prokázán Amesovým testem na kmeni **TA101** (Makena a Chung, 2007).

Výsledky provedených pokusů potvrzují, že v Amesově testu kyselina elagová v koncentracích 30 a 300 µg/misku prokazatelně snižovala mutagenní aktivitu nepřímých mutagenů IQ a AFB<sub>1</sub> v různých testovaných koncentracích na obou použitých kmenech. Na kmeni **TA100** byla ale účinnější koncentrace 30 µg/misku než 300 µg/misku vůči mutagenitě IQ, vůči mutagenitě AFB<sub>1</sub> byla efektivnější tato nižší koncentrace na obou kmenech. Na mutagenitu nepřímého mutagenu MNU kyselina elagová působila slabě, a to jen v kombinaci s nejnižší použitou koncentrací MNU.

V pokusech *in vivo* perorálně aplikovaná kyselina elagová výrazně snižovala klastogenní efekt AFB<sub>1</sub>, IQ i MNU, což se projevilo signifikantním snížením počtu mikrojader polychromatofilních erytrocytech myši, kterým byly podány mutageny i

kyselina elagová oproti skupinám ovlivněným pouze mutageny. Podobně např. Kumar *et al.* (2007) zaznamenali inhibiční vliv kyseliny elagové na mutagenitu vyvolanou AFB<sub>1</sub> v buňkách kostní dřeně a plic. Antimutagenní a antikarcinogenní účinky kyseliny elagové jsou pravděpodobně realizovány různými mechanismy, které ovlivňují mutagenní aktivitu přímých a nepřímých mutagenů. Loarca-Pina *et al.* (1998) předpokládají ovlivnění mutagenity AFB<sub>1</sub> účinkem kyseliny elagové některým z následujících mechanismů, ale pravděpodobně i jejich kombinací. Jednak jde o přímou interakci a tvorbou intracelulárního komplexu s AFB<sub>1</sub>, čímž se snižuje jeho biologická dostupnost, dalším mechanismem je inhibice enzymů odpovědných za aktivaci AFB<sub>1</sub> nebo přímá interakce s DNA, která snižuje počet vazebných míst pro AFB<sub>1</sub>-8,9,-epoxid, která jsou hlavně na pozici N7 guaninu. Vliv kyseliny elagové na mutagenitu IQ může být výsledkem inhibice mikrosomální N-hydroxylace IQ a jeho další metabolizace na ultimativní mutagen enzymy cytosolu. Kyselina elagová může také tvořit komplexy s magnesiiovými ionty, čímž narušuje proces aktivace mutagenu, nebo přímo reaguje s DNA a tím ji chrání před interakcí s mutagenem (Ayrton *et al.*, 1992). Je prokázáno, že EA je schopna vychytávat elektrofilní produkty, které vznikají při hydrolyze MNU a tím snižovat její mutagenní aktivitu. Mechanismus inhibice mutagenních účinků MNU může spočívat ve schopnosti EA vytvořit specifickou vazbu s DNA a zabránit methylaci 06 pozice guaninu. Je také pravděpodobné, že kyselina elagová inhibuje methylaci ovlivněním konformace DNA v blízkosti vazebných míst a snižuje tak možnost alkylace DNA a vzniku mutací (Dixit a Gold, 1986, Sudheer *et al.* 2007). Získané výsledky Amesova testu, ve kterých je efekt kyseliny elagové výraznější vůči nepřímým mutagenům AFB<sub>1</sub> a IQ než vůči přímému mutagenu MNU, svědčí pro výraznější efekt kyseliny elagové na mechanismus aktivace promutagenu, ale nelze vyloučit i působení dalších mechanismů, které ještě nebyly plně objasněny.

Antikarcinogenní účinky některých zmíněných látek se mohou při kombinaci zvyšovat. Takový synergický účinek byl experimentálně ověřen u lidských leukemických buněk u kyseliny elagové s quercetinem, jejich kombinace aktivovala expresi p53 a p21 a jiných proapoptických faktorů významněji, než by odpovídalo pouhému součtu jejich účinků (Mertens *et al.*, 2005).

**Resveratrol** v Amesově testu vykazoval silnější vliv na mutagenitu nepřímých mutagenů než na mutagenitu MNU. Vůči IQ byl dokonce účinný v širší škále koncentrací, tj. 3, 30 a 300 µg/misku na kmenech **TA98** i **TA100**, na **TA100** i v koncentraci 0,3 µg/misku vůči dvěma nižším koncentracím IQ. Dvě nejvyšší koncentrace resveratrolu (30 a 300 µg/misku) snižovaly mutagenitu různých koncentrací AFB<sub>1</sub> na obou testovaných kmenech. Inhibice mutagenity obou nepřímých mutagenů resveratrolem byla přímo závislá na jeho dávce. Mutagenitu přímého mutagenu MNU resveratrol neovlivnil. S použitím Amesova testu na kmeni **TA100** byl prokázán antimutagenní efekt resveratrolu v dávkách 100 a 200 µg/misku vůči mutagenu benz-a-pyrenu (Fu *et al.*, 2004).

V mikronukleus testu byla antimutagenní aktivita resveratrolu aplikovaného ve třech opakovaných dávkách před podáním mutagenu jasně prokazatelná bez ohledu na to, zda se jednalo o přímé nebo nepřímé mutageny. Podobně prokázali Fu *et al.* (2004) preventivní účinky resveratrolu v dávkách 30 a 180 mg/kg na tvorbu mikrojader vyvolanou podáním cyklofosfamidu laboratorním myším.

Antimutagenní účinek RES byl dále testován pomocí metody comet assay. Byly použity stejné dávky resveratrolu a mutagenů IQ a MNU jako v mikronukleus testu. Podání resveratrolu významně snižovalo procento DNA uvolněné mimo jádra buněk i u kontrolní skupiny. Pokud jde o snížení mutagenity nepřímého mutagenu IQ byla účinnost RES výrazná v buňkách jater i kostní dřeně. Ale protektivní vliv se u přímého mutagenu MNU projevil pouze u kostní dřeně, ale v jaterních buňkách byl účinek minimální. Podobně Le Bon *et al.*, (1997) ve svých pokusech prokázali, že dialylsulfid a dialyl disulfid silně redukovaly jednovláknové zlomy DNA indukované N-nitrosodimethylaminem a AFB<sub>1</sub> v jaterních buňkách, ale neovlivňovaly indukci těchto zlomů MNU.

Stejně jako u kyseliny elagové můžeme i u účinků resveratrolu předpokládat kombinaci více procesů. Velmi pravděpodobné je ovlivnění metabolické aktivace mutagenů cestou detoxikačních enzymů, případně i ovlivnění přímé- neenzymatické. Resveratrol indukuje apoptózu zvýšením exprese Bax, Bak, PUMA, Noxa, Bim, p53, TRAIL, TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5 a zároveň snížením exprese Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1. Resveratrol vyvolává zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a na rozhraní G1/S fáze buněčného cyklu indukcí exprese inhibitorů CDK p21/WAF1/CIP1 a p27/KIP1. Resveratrol rovněž



redukuje zánětlivý proces inhibicí produkce prostaglandinů a snížením aktivity cyclooxygenázy 2 a nukleárního faktoru kappaB (Shankar *et al.* 2007).

**Dialyl sulfid** vykazoval v Amesově testu antimutagenní efekt v nejvyšší použité koncentraci 300  $\mu\text{g}/\text{misku}$  na mutagenitu IQ u kmene **TA98**. Na kmeni **TA100** však v kombinaci se dvěma koncentracemi IQ (0,1 a 10  $\mu\text{g}/\text{misku}$ ) nejevila signifikantní efekt ani tato koncentrace dialyl sulfidu. Vůči  $\text{AFB}_1$  byl dialylsulfid v této koncentraci antimutagenní pouze na kmeni **TA98**, ne na **TA100**. Nižší koncentrace 30  $\mu\text{g}/\text{misku}$  byla antimutagenní na kmeni **TA98** pouze v kombinaci s některými koncentracemi nepřímých mutagenů.

V některých studiích je popisována rozdílná míra účinku DAS vůči mutagenitě různých látek s prokázaným mutagenním efektem. Např. v Amesově testu S9 frakce z jater potkanů ovlivněných dialyl sulfid a dialyl disulfid silně redukovala mutagenitu N-nitrosodimethylaminu, ale méně výrazně mutagenitu  $\text{AFB}_1$  (Le Bon *et al.*, 1997). S použitím Amesova testu bylo prokázáno výrazné snížení mutagenních účinků N-nitrosodimethylaminu a mírné snížení mutagenních účinků  $\text{AFB}_1$  a redukce počtu jednovláknových zlomů DNA (SSB) způsobených účinkem  $\text{AFB}_1$  metodou comet assay, ale tento efekt nebyl prokázán u mutagenních účinků MNU (Le Bon *et al.*, 1997). DAS snižoval počet mikrojader vzniklých účinkem benzo(a)pyrenu a cyklofosfamidu (Shukla *et al.*, 2003). Indukci apoptózy prokázali na buňkách lidského nasofaryngeálního tumoru Zhang *et al.* (2006).

V mikronukleus testu byl prokazatelný antiklastogenní efekt po opakovaném podání dialyl sulfidu v kombinaci s jednorázovým podáním testovaných mutagenů. Surh *et al.*, (2003) rovněž popisuje snížení četnosti mikrojader účinkem DAS a dalších změn indukovaných mutageny v jádrech střevních buněk, snížení tvorby mikrojader indukovaných benzo[a]pyrenem v myších retikulocytech a potlačení indukce kožních nádorů tímto mutagenem u myší

Rozdílný účinek DAS na aktivitu různých mutagenů a karcinogenů je vysvětlován jeho odlišným vlivem na aktivitu CYP izoenzymů – slabá indukce CYP1A, silná indukce CYP2B, inhibice CYP2E1 (Siess *et al.*, 1997). Toto ovlivnění aktivity CYP izoenzymů může vést jak k potenciaci, tak ke snížení mutagenity jednotlivých látek, což prokázal v Amesově testu Guyonett *et al.*, (2000). Hlavním protektivním mechanismem je zřejmě stimulace enzymů II. fáze (Guyonett *et al.*, 2001), Ve sliznici střev a v jaterní tkáni byly

sledovány zvýšené hladiny GST, NAD(P)H-dependentní quinon reduktázy a UDP-glukuronosyl transferázy po podání DAS laboratorním potkanům (Reddy *et al.*, 1993).

V Amesově testu byl antimutagenní vliv **fenetyl isothiokyanátu** výrazný. Na rozdíl od některých autorů, kteří popisují dokonce silný genotoxický vliv fenetyl isothiokyanátu v pokusech *in vitro*, jsme takový účinek nezaznamenali. Ale fenetyl isothiokyanát byl v koncentraci 300 $\mu$ g/misku v Amesově testu toxický pro indikátorové bakteriální kmeny, ale jeho mutagenní účinek nebyl prokázán. V koncentracích 3 a 30 $\mu$ g/misku měl výrazně antimutagenní efekt vůči všem koncentracím obou nepřímých mutagenů (IQ a AFB<sub>1</sub>) na obou testovaných kmenech. Koncentrace 0,3  $\mu$ g/misku byla také antimutagenní vůči IQ a vůči některým koncentracím AFB<sub>1</sub>. Efekt byl přímo závislý na dávce antimutagenu. Koncentrace 30  $\mu$ g/misku často snižovala mutagenitu na úroveň, nebo pod úroveň kontrolní hladiny revertant. Silná antimutagenní aktivita dávky fenetyl isothiokyanátu 30 $\mu$ g/misku byla pozorována i vůči přímo působícímu mutagenu MNU. V mikronukleus testu byl fenetyl isothiokyanát také výrazně antimutagenní a významně snižoval klastogenní aktivitu AFB<sub>1</sub>, IQ i MNU. Při studiu chemopreventivních účinků fenetyl isothiokyanátu u modelu familiární adenomatosní polyposy na myším modelu Apc(Min/+) byla zjištěna zvýšená apoptotická aktivita (prokázaná změna aktivity kaspáz 3 a 7) a inhibice buněčného cyklu inhibicí cyklinů (D1, A, E) a aktivací p21. (Khor *et al.*, 2008). Isothiokyanáty jsou konvertovány na glutathion konjugáty glutathion S transferázou (GST) a transportovány MRP (*multidrug resistance proteins*). GST polymorfismy a exprese MRP mohou modifikovat jejich účinky. Isothiokyanáty inaktivují izoformy cytochromu P450. Isothiokyanáty indukují apoptózu nádorových buněk aktivací kaspázy -8 (Thornalley, 2002).

Ale na účinky uvedených látek nelze jednostranně pohlížet jako na výhradně pozitivní. Naopak Kassie *et al.*, (2000) popsali genotoxický efekt fenetyl isothiokyanátu *in vitro* v Amesově testu na *Salmonella typhimurium* a v mikronukleus testu v lidských Hep G2. Musk *et al.* (1995) pozorovali indukci chromozomálních aberací a sesterských chromatidových výměn po působení fenetyl isothiokyanátu. V pokusech *in vivo* však byla genotoxicita těchto látek pouze slabá. Je pravděpodobné, že tyto látky skutečně vykazují genotoxický efekt, *in vivo* jsou však ovlivněny pravděpodobně neenzymatickou vazbou na proteiny (Kassie a Knasmüller, 2000). Fenetyl isothiokyanát, podobně jako další chemoprotektivní látky, ovlivňuje metabolickou aktivaci mutagenů skrze změnu hladin a aktivity cytochromů P450 (CYP 1A1, a CYP1A2) a detoxikačních enzymů. Konečný efekt je opět výsledkem těchto vlivů na aktivaci a detoxikaci mutagenu

(Khanum *et al.*, 2004). Jiná studie prokázala na buněčné linii ovariálních buněk čínského křečka ovlivněných dialyl sulfidem a dialyl disulfidem indukci chromozomálních aberací s výměn sesterských chromatid a dokonce byla stanovena i střední letální dávka extraktu z česneku pro potkany a myši na 30mg/kg ( Musk *et al.*, 1995). Také některé současné populační studie jednoznačně neprokázaly, že by příjem antioxidantů měl zásadní význam v primární a sekundární prevenci kolorektálních adenomů (Bjelakovic *et al.*, 2006).

To, že jsou protektivní látky přijímány v běžné straně v nízkých dávkách a mají pozitivní vliv v prevenci některých chorob neznamená, že se ve vyšších dávkách stejných látek neskryvá potenciální nebezpečí. A tak určité riziko nadužívání přípravků obsahující koncentráty látek s předpokládanými antikarcinogenními, antiaterogenními a dalšími účinky nelze brát na lehkou váhu.

Další práce byla věnována jiným protektivním látkám jako je kurkumim, genistein, (viz. uvedené publikace 2 a 3) lykopen, epigalokatechin galát a v současné době pokračuje i výzkum účinků jejich vzájemných kombinací.

## 7. Závěr

Látky rostlinného původu jsou, díky svým různorodým protektivním účinkům vůči nejčastějším civilizačním chorobám tj. kardiovaskulárním a nádorovým, velmi nadějnými složkami lidské stravy, které by i jako doplňky výživy mohly významně přispět k prevenci těchto chorob.

V současnosti, kdy jsou některé přírodní látky již na trhu, je nezbytně nutné stanovit jejich účinnou a bezpečnou denní dávku. Dávka by měla odpovídat možnostem enzymatických a neenzymatických systémů, zodpovědných za udržení rovnovážného stavu mezi oxidanty a antioxidanty. Pro prevenci by měly být tyto látky dostupné ve vhodné formě. Vzhledem k prokázaným antimutagením účinkům vůči testovaným mutagenům, lze testované chemoprotektivní látky (kyselinu elagovou, resveratrol, dialylsulfid a fenetyl isothiokyanát) považovat za možné doplňky stravy nebo za významné složky tzv. funkčních potravin, které spolu s vhodným složením stravy, mohou významně přispět k prevenci nádorových onemocnění a dalších chorob, které jsou etiologicky podmíněny genotoxickými vlivy.

V roce 2003 byl založen nový vědecký směr nazvaný nutrigenomika (Go et al., 2003, Müller and Kerstner, 2003), který se právě zabývá vztahy mezi genetickou výbavou v oblasti trávení živin a predispozicí k chorobám souvisejícím s výživou. Středem zájmu je pochopitelně obezita, ale samozřejmě DNA polymorfizmy hrají hlavní roli v individuální vnímavosti vůči karcinogenům (Ahima and Osei 2001). Vnímavost k účinkům karcinogenů je v populaci velmi individuální záležitostí právě díky polymorfizmům v genech pro enzymy účastnící se metabolismu xenobiotik a v DNA reparačních enzymech (Pardini *et al.*, 2008). Individuální vnímavost vůči xenobiotikům je dále ovlivněna funkcí ABC transportérů (ATP-binding cassette), které fyziologicky regulují absorpci xenobiotik v tenkém střevu. Mimo to geny pro ABC transportéry mohou mít vliv na absorpci léčiv včetně chemoterapeutik. Genové produkty ABCB1 (P-glykoprotein) ABCC1 a ABCG2 mohou být příčinou individuální vnímavosti vůči nádorovým onemocněním (Campa *et al.*, 2008) stejně jako vůči léčivům, jejich vedlejším účinkům a ovlivnit vzájemné interakce i efektivitu léčby (Nakamura, *et al.*, 2008). U člověka byla prokázán snížený přenos 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridinu (PhiP) přes placentární bariéru při vyšší hladině ABCG2. PhiP indukoval expresi ABC transportérů v BeWo buňkách na úrovni mRNA. (Myllynen, *et al.*, 2008).

Prevence vzniku nádorových onemocnění za využití dietních úprav vede obecně dvěma směry. Především jde o snížení výskytu a příjmu karcinogenů v potravě a na druhé straně o zvýšení příjmu látek s antikarcinogenním potenciálem. Preventivní dieta jako součást léčby různých onemocnění má již své nezastupitelné místo, ale otázka optimální doporučené diety pro širší populaci zůstává stále otevřená.

## 7. Grantová podpora:

Práce vznikla za grantové podpory IGA MZČR No. 6138-3 a No.8985-3.

## 8. Seznam publikací:

1. **Langová, M.**, Polívková, Z., Šmerák, P., Bártová, J., Bárta, I.: Antimutagenic Effect of Resveratrol. Czech J. Food Sci., 23, (2005), 202-208. **IF: 0,39**
2. Šmerák, P., Polívková, Z., Šestáková H., Štětina, R., Bárta, I., **Langová, M.**, Turek, B., Bártová, J.: Antimutagenic Effect of Curcumin and its Effect on the Immune Response in Mice. Czech J. Food Sci., 24(2), (2006), 72-83. **IF: 0,39**
3. Polívková, Z., **Langová, M.**, Šmerák, P., Bártová, J., Bárta, I.: Antimutagenic Effect of Genistein. Czech J. Food Sci., 24(3), (2006), 119-126. **IF: 0,39**
4. Bárta, I., Šmerák, P., Polívková, Z., Šestáková H., **Langová, M.**, Turek, B., Bártová, J.: Current Trends and Perspectives in Nutrition and Cancer Prevention. Neoplasma, 53,(2006), 19-25. **IF: 1,21**
5. **Langová, M.**, Polívková, Z., Šestáková H., Šmerák, P., Bártová, J., Bárta, I.<sup>†</sup>: Antimutagenic Effect of Diallyl Sulfide. Czech J. Food Sci. ( v redakci)

## 9. Použitá literatura:

Aggarwal, B.B., Shishodia, S.: Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem-Pharmacol.* 71(10), (2006), 1397-1421.

Aguilar, F., Hussain, S.P., Cerutti, P.: Aflatoxin B1 induces the transversion of G to T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90,(1993), 8586.

Ashima, R.S., Osei, S.Y.: Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. *Trends Molec. Med.*, 7 (2001),205.

Arunkumar, A., Vijayababu, M.R., Gunadharini, N., Krishnamoorthy, G., Arunakaran, J. Induction of apoptosis and histone hyperacetylation by diallyl disulfide in prostate cancer cell line PC-3.,*Cancer Lett.*, 251(1),(2007),59-67.

Ayrton, A. D., Lewis, D. F.V., Walker, R., Ioannide, C.: Antimutagenicity of ellagic acid towards the food mutagen IQ: investigation into possible mechanisms of action. *Food Chem. Toxicol.* 30, (1992) 289-295.

Bárta,I., Adámková M., Petr,T., Bártová J.:Dose and time dependence of chromosomal aberration yields of bone marrow cells in male Chinese hamsters after a single i.p. injection of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Mutation Res.*, 244, (1990),. 189-195.

Bjelakovic, G., Nagorni, A., Nikolova D., Simonetti, R.G., Bjelakovic, M., Gluud C. Meta-analysis: antioxidant supplements for primary and secondary prevention of colorectal adenoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24(2), (2006), 281-291.

Bode, A.M., Dong, Z., Targeting signal transduction pathways by chemopreventive agents. *Mutat. Res.*, 555, (2004), 33-51.

Bonneau, D.: Optimum association of tester strain for maximum detection of mutagenic compounds in the Ames test. *Mutation Res.*, 252, (1991), 269-279.

Bray, F., Sankila, R., Ferlay, J., Parkin, D.M.,Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur. J. Cancer.* 38(1),(2002), 99-166.

Busquets, S., Ametller, E., Fuster, G., Olivan, M., Raab, V., Argiles, J.M., Lopez-Soriano, F.J., Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model. *Cancer Lett.*, 245(1-2), (2007), 144-148.

Campa, D., Vodicka, P., Pardini, B., Novotny, J., Först,i A., Hemminki, K., Barale, R., Canzian, F.. Could polymorphisms in ATP-binding cassette C3/multidrug resistance associated protein 3 (ABCC3/MRP3) modify colorectal cancer risk? *Eur. J. Cancer.* 6(2008),54-57.

Cerdá, B., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J. Agric. Food Chem.*, 53(2),(2005), 227-35.

- Collins A.R., Dobson, V.L., Dušinská M., Kennedy, G., Štětina, R., The comet assay: what can really tell us? *Mutation Res.*, 375, (1997), 183-194.
- Creasy, L.L., Coffee, M., Phytoalexin production potential of grape berries, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 133, (1998), 230.
- Devenport D.M., Wargovich M.J., Modulation of cytochrome P450 enzymes by organosulfur compounds from garlic. *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 1753-1762.
- Dixit, R., Gold, B., Mechanism of inhibition of N - methyl – N - nitrosourea – induced mutagenicity and DNA binding by ellagic acid. *IARC Sci. Publ.* 84, (1987) 197 – 199.
- Ferguson, L.R.: Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.*, 307, (1994), 395.
- Fimognari, C., Nusse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulphoraphane, *Carcinogenesis*, 23, (2002), 581.
- Fraisse, D., Carnat, A., Carnat, A. P., Lamaison, J. L.: Standardization of the aerial parts of *Alchemilla*. *Ann. Pharmacol. Fr.*, 57, (1999) 401-405.
- Fremont, L., Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, 66, (2000) 663-673.
- Fu, Z.D., Cao, Y., Wang, K.F. Xu, S.F., Han, R. Chemopreventive effect of resveratrol to cancer Chinese *J. Canc. Res.* (2004), 869-73.
- Galati, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., O'Brien, P.J., Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics, *Drug Metabol. Drug Interact.*, 17, (2000), 311.
- Gamer, A.O., Leibold, E., Deckardt, K., Kittel, B., Kaufmann, W., Tennekes, H.A., van Ravenzwaay, B., *Food Chem. Toxicol.*, 42(10), (2004), 1655-67.
- Go, V.L.W., Butrum, R.R., Wong D.A., Diet nutrition and cancer prevention : the postgenomic era. *J. Nutrition*, 133, (2003), 3830.
- Gooderham NJ, Murray S, Lynch AM, Yadollahi-Farsani M, Zhao K, Rich K, Boobis AR, Davies DS., Assessing human risk to heterocyclic amines., *Mutat Res.* 376(1-2), (1997), 53-60.
- Guengerich, F.P., Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 21, (2000), 345-351.
- Guyonnet, D. Belloir, C. Suschetet, M. Siess, M.H. Le Bon, A.M., Liver subcellular fractions from rats treated by organosulfur compound from *Allium* modulate mutagen activation. *Mutat. Res.* 466 (2000) 17-26.
- Guyonnet, C. Belloir, M. Suschetet, M.H. Siess, Le Bon, A.M., Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction. *Mutat. Res.* 495 (2001) 135-145.



Hecht, S.S., Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metabol. Rev.*, 32, (2000), 395-411.

Hecht, S. S., Upadhyaya, P., Wang, M., Bliss, R. L., McIntee, E. J., Kenney, P. M. J.: Inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice by N-acetyl-S-(N-2-phenethylthiocarbamoyl)-L-cysteine and myo-inositol, individually and in combination. *Carcinogenesis*, 23, (2002)1455-1461.

Hermann-Antosiewicz, A., Singh, S.V., Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds: a review. *Mutat. Res.*, 555,(2004), 121-131.

Hill, M.J., General background on diet and cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 5(5),(1996),413-4. Review.

Hong, Y.S., Ham, Y.A., Choi, J.H., Kim, J., Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp. Mol. Med.* 32 (2000) 127-134.

Chang, T.K, Chen,J., Lee,W.B., Differential inhibition and inactivation of human CYP1 enzymes by trans-resveratrol: evidence for mechanisms-based inactivation of CYP1A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299, (2001), 82.

IARC: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human: N-nitroso-N-methylurea, 17, (1978) 227-255.

IARC: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human: Aflatoxins. 56, (1993) 245-395.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Metha, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, 275, (1997), 218.

Kassie, F., Laky, B., Lin, Ch. M., Preston, J. F., Wei, Ch., Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *J. Food Protect.*, 63, (2000)727-734.

Kassie, F., Knasmüller, S.: Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem. Biol.Interact.*, 127, (2000)163-180.

Khanum, F., Anilakumar K.R., Viswanathan K.R., Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (2004), 479-88.

Khor, T.O., Cheung, W.K., Prawan, A., Reddy, B.S., Kong, A.N. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis in Apc(Min/+) mice by phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Mol. Carcinog.* 47(5),(2008),321-5.

Kumar, A., Tyagi, Y.K., Ponan, P., Rohil, V., Prasad, A.K., Dwarkanath, B.S., Parmar, V.S., Raj, H.G., Ellagic acid peracetate is superior to ellagic acid in the prevention of genotoxicity due to aflatoxin B1 in bone marrow and lung cells. *J. Pharm-Pharmacol.* 59(1), (2007), 81-86.

Kundu, J. K., Surh, Y. J. : Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutat. Res.* 555, (2004) 65-80.

Lamm, D.L., Riggs, D.R., The potential application of *Allium sativum* (garlic) for the treatment of bladder cancer, *Urol. Clin. North Am.*, 27(2000), 157-162.

Le Bon, A.M., Roy, C., Dupont, Ch., Suschetet, M., In vivo antigenotoxic effects of dietary allyl sulfides in the rat. *Cancer Lett.* 114 (1997) 131-134.

Li, T.M., Chen, G.W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C., Chung, J.G., Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res.*, 25(2A),(2005),971-9.

Liu, Z.M., Li L.Q., Peng M.H., Liu T.W., Qin Z., Guo Y., Xiao K.Y., Ye X.P., Mo X.S., Qin X, Li S, Yan LN, Shen HM, Wang L, Wang Q, Wang KB, Liang RX, Wei ZL, Ong CN, Santella RM, Peng T., Hepatitis B virus infection contributes to oxidative stress in a population exposed to aflatoxin B1 and high-risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 263(2),(2008),212-22

Loarca-Pina, G., Kuzmicky, P. A., de Mejia, E. G., Kado, N. Y.: Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the *Salmonella* microsuspension assay. *Mutation Res.*, 398, (1998), 183-187.

Lopreino, N., Boncristiani, G., Lopreino, G.: An experimental approach to identifying the genotoxic risk by cooked meat mutagens. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 289, (1991), 115 - 131.

Maron, D.M., Ames, B.N., Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, (1983)173-215.

Martínez, M.E., Marshall, J.R., Giovannucci, E., Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation., *Nat. Rev. Cancer.* 2008 [Epub ahead of print]

Makena, P.S., Chung, K.T. Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity. *Food Chem. Toxicol.*, 45(10),(2007),1899-909.

Mertens-Talcott, S.U., Bomser, J.A., Romero, C., Talcott, S.T., Percival, S.S., Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *J. Nutr.* 135(3), (2005), 609-614.

Mirvish, S.S., Haorah, J., Zhou, L., Clapper, M.L., Harrison, K.L., Povey, A.C., Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer, *J. Nutr.*, 133, (2002), 3526.

Musk, S.R., Smith, T.K., Johnson, I.T., On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconasturtiin, *Mutat. Res.*, 348, (1995), 19-23.

- Musk, S.R., Clapham, T., Johnson, I.T., Cytotoxicity and genotoxicity of diallyl sulfide and diallyl disulfide towards chinese hamster ovary cells. *Food and Chem Toxicology*, 35, (1997), 379-385.
- Müller, M., Kersten, S., Nutrigenomics: goals and strategies, *Nature rev./Genetics*, 4,(2003), 315.
- Myllynen, P., Kummu, M., Kangas, T., Ilves, M., Immonen, E., Rysä, J., Pirilä, R., Lastumäki, A., Vähäkangas, K.H., ABCG2/BCRP decreases the transfer of a food-born chemical carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in perfused term human placenta. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 2008,[Epub ahead of print]
- Nakamura, T., Yamamori, M., Sakaeda, T. Pharmacogenetics of intestinal absorption. *Curr. Drug Deliv.*,5(3), (2008) 153-69.
- Pardini, B., Naccarati, A., Novotny, J., Smerhovsky, Z., Vodickova, L., Polakova, V., Hanova, M., Slyskova, J., Tulupova, E., Kumar, R., Bortlik, M., Barale, R., Hemminki, K., Vodicka, P., DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic., *Mutat. Res.*, 638(1-2), (2008)146-153.
- Ray, A., Cancer preventive role of selected dietary factors. *Indian.J.Cancer*, 42(1),15-24.
- Reddy, S.B., Rao,V., Rivenson, A., Kelloff, G. , Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Organosulfur Compounds., *Cancer Res.*, 53, (1993) 3493-3498.
- Robbana-Barnat, S., Rabache, M., Rialland, E., Fradin, J., Heterocyclic amines: occurrence and prevention in cooked food, *Environ. Health Perspect.*, 104, (1996), 280.
- Santarelli, R.L., Pierre, F., Corpet, D.E., Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr. Cancer*, 60(2), (2008), 131-144.
- Satyan, K.S., Swamy, N., Dizon, D.S., Singh, R., Granai, C.O., Brard, L., Phenethyl isothiocyanate (PEITC) inhibits growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis: role of caspase and MAPK activation. *Gynecol. Oncol.*, 103(1), (2006),261-70.
- Seki, T., Hosono, T., Hosono-Fukao, T., Inada, K., Tanaka, R., Ogihara, J., Ariga, T., Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 Suppl 1,(2008),249-52. Review.
- Shankar, S., Singh, G., Srivastava, R.K., Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci.* 12,(2007),4839-54.
- Shukla, Y., Arora, A., Taneja, P., Antigenotoxic potential of certain dietary constituents. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 1,(2003),323-325.
- Schmid, W., The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31 (1975) 9-15.
- Siess, M. H., Le Bon, A. M., Canivenc-Lavier, A. M., Suschetet, M.: Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides. *Cancer Lett.*, 120, (1997), 195-201.

Siglin, J. C., Barch, D. H., Stoner, G. D.: Effect of dietary phenethyl isothiocyanate, ellagic acid, sulindac and calcium on the induction and progression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 16, (1995) 1101-1106.

Smith, C.J., Perfetti, T.A., Rumble, M.A., Rodgman, A., Doolittle, D.J., "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem. Toxicol.* 38(4), (2000):371-83. Review.

Soni, K. B., Lahiri, M., Chackradeo, P, Bhide, S. V., Kuttan, R.: Protective effect of food aditives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenity. *Cancer Lett.*, 115, (1997), 129-133.

Stoner, G.D., Morse, M.A., Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. *Cancer Lett.*, 114(1-2), (1997), 113-9.

Sudheer, A.R., Muthukumaran, S., Devipriya, N., Menon, V.P., Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology.*, 230(1), (2007), 11-21.

Surh, Y.J., Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nature Rev. Cancer*, 3, (2003), 768.

Thompson, M., Ali, M., Garlic (*Allium sativum*): a review of its potential use as an anti-cancer agent, *Curr. Cancer Drug*, 3, (2003) 67-81.

Thornalley, P.J., Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. *Anti-Cancer Drugs*, 13(4), (2002), 331-338.

Udenigwe, C.C., Ramprasath, V.R., Aluko, R.E., Jones, P.J., Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr Rev.* 66(8), (2008), 445-54.

Vidavalur, R., Otani, H., Singal, P.K., Maulik, N.. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp. Clin. Cardiol.* 11(3), (2006), 217-25.

Wargowich, M.J., Diallylsulfide and allylmethylsulfide are uniquely effective among organosulfur compounds in inhibiting CYP1B1 protein in animal models. *J. Nutr.*, 136 (2006) 832-834.

Wild, C.P., Turner, P.C., The toxicology of aflatoxin as a basis of public health decisions, *Mutagenesis*, 17, (2002), 471.

Wolf, T., Niehaus-Rolf, C., Luepke, N.P., Investigating genotoxic and hematotoxic effects of N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodiethanolamine in the hen's egg-micronucleus test (HET-MN), *Food Chem. Toxicol.*, 41, (2003), 561.

Xiao, D., Lew, K.L., Zeng, Y., Xiao, H., Marynowski, S.W., Dhir, R., Singh, S.V., Phenethyl isothiocyanate-induced human apoptosis in P-3 prostate cancer cells is

mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis*, 27(11), (2006), 2223-34.

Xu, K., Thornalley, P. J.: Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 60, (2000), 221-231.

Yang, G.C., Yasaei, P.M., Page S.W., Garlic as anti-oxidants and free radical scavengers. *J. Food Drug Anal.*, 1(1993), 357-364.

Zhang, Y.W., Wen, J., Xiao, J.B., Talbot, S.G., Li, G.C., Xu, M., Induction of apoptosis and transient increase of phosphorylated MAPKs by diallyl disulfide treatment in human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. *Arch. Pharm. Res.*, 29(12),(2006), 1125-31.

Zhang, Y., Seeram, N.P., Lee, R., Feng, L., Heber, D., Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J. Agric. Food. Chem.*, 56(3),(2008), 670-5.