

**ZAKLJUČNO POROČILO**  
**O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA**  
**NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA**  
**PROGRAMA (CRP) »ZNANJE ZA VARNOST IN MIR 2004 – 2010«**

**I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta**

1. Šifra projekta:

M1-0031

2. Naslov projekta:

Molekularna detekcija posledic uporabe biološkega orožja ter delovanja bioloških toksinov in drugih strupenih učinkov z dolgodobnim delovanjem na človeka

3. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Nacionalni inštitut za biologijo

4. Trajanje projekta:

2 leti

5. Sofinancer/sofinancerji:

Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije

6. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

07802

Tamara Lah Turnšek

Datum: \_\_\_\_\_

Podpis vodje projekta:

Tamara Lah Turnšek

Podpis in žig izvajalca:

Tamara Lah Turnšek

## II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

### 1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti  
 b) delno  
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da  
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

V delu projekta, kjer smo razvijali enostavno metodo za detekcijo genotoksičnih agensov smo spremenili objekt – namesto ribje celične linije, ki je opisana v literaturi kot biološki sistem detekcije, smo se odločili za razvoj detekcijskega sistema z reporterskim genom na celicah človeškega izvora, HepG2. Ta celična linija je visoko metabolno aktivna in na njej smo tekom projekta opravili teste citotoksičnosti, genotoksičnosti in preverili izražanje stresnih genov (glej vsebino) po inkubaciji z organofosfati. Predvidevamo, da rezultati na tej celični liniji bolje odražajo dogajanje v človeškem organizmu in s tem oceno tveganja za ljudi, kot celice rib.

## 2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela<sup>1</sup>:

### 2.1. Uvod/cilji

Sodobni terorizem uporablja za onesposabljanje in uničevanje žive sile najrazličnejše agense. Potencialni agresor lahko uporabi tudi neznane kemične ali biološke agense, za katere ni nujno da imajo takojšen učinek ampak sprožajo spremembe nekaterih osnovnih celičnih procesov. Posledice agresije s tovrstnimi agensi je mogoče preprečiti le tako, da jih dovolj zgodaj ugotovimo.

Toksičnost kemijskih substanc, bojnih strupov bioloških toksinov in sevanja (v nadaljevanju imenovanih: bioagensov) je odvisna od koncentracije in časa njihovega delovanja. Takšni agensi so nevarni tudi zato, ker ob krajši časovni izpostavljenosti ne povzročijo takojšnje smrti celic, pač pa imajo dolgodobne posledice ob ponovnih in/ali daljših izpostavljenostih. Povzročajo lahko le n.pr. oksidativni stres, to je poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali in oksidanti ter določene spremembe v izražanju genov in dedne spremembe v celicah (mutagenost), kar lahko vodi tudi v nastanek raka (kancerogenost). V principu gre lahko za različne vrste učinkov na človeški genom, ki lahko nastopajo tudi istočasno. V naši raziskavi smo se ukvarjali z vplivom potencialnih bioagensov na ljudi ter z vplivom na okolje, saj le poznavanje mehanizmov delovanja in določitev poškodovanosti omogočajo ustrezne korake v preventivi in zaščito ljudi in okolja.

Glavni cilji so bili razvoj metod za:

**A (1) enostavno detekcijo oksidativnih sprememb na DNA človeških celic**

**A (2) detekcijo sprememb v ekspresiji določenih genov, ki jih toksični bioageni lahko povzročijo in**

**B razvoj občutljivega bio-detekcijskega sistema za oksidativne poškodbe na modelnih celicah.**

V prvem delu naloge (A) smo kot modelne biotoksine uporabili mikrocistine, za modelne substance potencialnih bojnih strupov pa organofosfate.

**Mikrocistini** so najpogostejši hepatotoksični ciklični heptapeptidi, ki jih proizvajajo različne vrste sladkovodnih cianobakterij, kot je *Microcystis aeruginosa*. So potencialni inhibitorji fosfoprotein fosfataz 1 in 2A, posledica česar je porušenje številnih celičnih procesov in spremembe v strukturi citoskeleta. Mikrocistini so znani promotorji tumorjev in predvideva se, da lahko delujejo tudi kot iniciatorji tumorjev. V pogojih *in vitro* in *in vivo* lahko povzročajo poškodbe DNA, vendar pa mehanizmi njihovega genotoksičnega delovanja še niso v celoti pojasnjeni. Zaradi relativno omejenega pojava cvetenj v pomladansko poletni sezoni pri nas, teh toksinov v naših laboratorijih nismo izolirali v večji količini. Dobava komercialno dostopnih mikrocistinov se je izkazala za zapleteno prav zaradi dejstva, da so to tudi biološki strupi, ki bi se lahko potencialno uporabljali v vojne namene ali v terorističnih napadih.

**Organofosfati** (OP) so nepovratni inhibitorji acetilholin esteraze, ki tako prekinejo sinaptično komunikacijo, delujejo pa tudi genotoksično. OP so bili najprej razviti in uporabljeni kot kemična bojna sredstva (nevrotoksini) v drugi svetovni vojni, ter v Zalivski vojni 1991. Že 50 let pa se OP veliko uporablja (čiste ali v mešanica) kot učinkovite pesticide pa vsem svetu. V mirnem obdobju ljudje in živali pridejo v stik z OP preko kontaminirane zemlje (kjer se ti tudi nalagajo), vode ali v aerosolni obliki. Široka uporabnost in dostopnost OP omogoča njihovo relativno preprosto uporabo v potencialnih

<sup>1</sup> Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

sodobnih terorističnih napadih. Vpliv inhibicije acetilholin esterase na živčni sistem je razmeroma dobro poznan, manj pa vemo o potencilanih vplivih organofosfatov na netaična tkiva pri človeku. Dolgodobno izpostavljenost organofosfatnim pesticidom povezujejo z večjim tveganjem za ne-Hodgkin-ove limfome, levkemije in druge oblike raka. Pri procesu nastanka raka OP delujejo predvsem kot pospeševalci nastanka tumorjev, in sicer s stimulacijo celične proliferacije, ki lahko vodi v neoplastično transformacijo. Literaturnih podatkov o *in vitro* citotoksičnih učinkih organofosfatnih snovi na celice je malo. V naši nalogi smo se omejili na tri organofosphate in sicer na dimefoks, paraokson-metil (predstavnik oksono-) in paration-metil (predstavnik tiono-organofosfatov) v modelnih humanih celičnih sistemih.

Integriteta celične DNA je pod stalnim pritiskom agensov iz okolja. Potencialne toksične in mutagene posledice teh pritiskov so v normalni celici kontrolirane z različnimi popravljivimi mehanizmi in danes je znanih preko 130 človeških genov za popravljanje DNA. Po drugi strani pa je lahko spremenjeno izražanje nekaterih genov povezano z večjo verjetnostjo za razvoj raka. Tako smo za analize izbrali gene oziroma njihove proteine, ki so povezani z odgovorom celic na poškodbe DNA ali z nastankom in razvojem raka (P53, MDM2, GADD45, P21 in pericentrični gen).

**P53** je tumor supresor, transkripcijski faktor, ki leži na kromosomu 17. Številne mutacije tega gena se pojavijo zgodaj v razvoju raka, zato je pokazatelj kancerogeneze. Visoka ekspresija ne-mutiranega p53 (*wild type*) povzroči ustavitev celičnega cikla ali apoptozo, torej deluje kot nekakšna zavora, ki ščiti genom pred akumulacijo večjega števila mutacij. Po drugi strani pa se mutacije p53 pojavljajo z izredno visoko frekvenco v večini človeških tumorjev. Zato so celice z manj p53, praviloma genetsko nestabilne in razvoj maligne bolezni bolj verjeten. Aktivnost p53 med drugim regulira tudi aktivnost gena **MDM-2**, ki leži na človeškem kromosomu 12. Njegov proteinski produkt je celični fosfoprotein, ki se veže na p53, kar blokira funkcijo slednjega. Kot inhibitor p53 onkogen MDM-2 sodeluje pri apoptozi in regulaciji celičnega cikla. Številni tumorji imajo povečano ekspresijo MDM-2.

Eden od ključnih encimov za popravljanje DNA je **GADD45** (growth arrest and DNA damage induced-45) gen, ki leži na kromosomu 1. Poleg popravljivih mehanizmov in v imunskem odzivu podobno kot zgoraj omenjena proteina sodeluje pri regulaciji celičnega cikla in apoptozi. GADD45 se lahko inducira odvisno ali neodvisno od p53.

**P21** **WF1/CIP1**, inhibitor od ciklina odvisne kinaze p21 je ključen protein za preživetje celic. Med možnimi mehanizmi »preživetvene« vloga p21 so preprečitev napredovanja celičnega cikla in posledično omejena sinteza DNA ter interakcija s pro-kaspazami. Posebej je pomembno, da se p21 specifično poveča pri izpostavljenosti genotoksičnim dejavnikom.

**Pericentrični** gen leži na človeškem kromosomu 17. Njegov produkt, centrosomski protein pericentrin sodeluje pri delovanju delitvenega vretena. Pravilno delovanje delitvenega vretena je nujno za normalno porazdelitev kromosomov, sicer pride do pomnoževanja in izgubljanja kromosomov, kar je pomemben vzrok aneuploidije. Nedavni rezultati so potrdili vzročno povezavo med abnormalnostmi centrosomov in delitvenega vretena ter premalignimi obolenji.

## 2.2. Material in metode

### 2.2.1. Uporabljene celične linije:

**HepG2** so jetrne celice, ki so bile izolirane leta 1979 iz hepatoblastoma 11-letnega dečka in so jih že velikokrat uporabili za študije mutagenosti. HepG2 celice imajo ohranjeno

aktivnost encimov, ki igrajo pomembno vlogo v detoksifikaciji karcinogenov, ki reagirajo z DNA. Ta aktivnost se sicer v in vitro kultivaciji pogosto izgubi, zato so HepG2 celice primernejše za teste genotoksičnosti kot bakterijske ali sesalske celice, ki zahtevajo dodatek zunanjih aktivatorjev. HepG2 celice smo dobili v dar od dr. F. Darroudi-ja z Oddelka za kemijsko mutagenozo, Univerza v Leidenu (Nizozemska). Te celice gojimo v Williams mediju z dodatkom 15% FBS, 1% antibiotika (penicilin/streptomycin) in 4mM L-glutamina.

**NC-NC** je imortalizirana linija človeških limfoblastoidnih celic B, ki jo priporočajo kot normalno kontrolno linijo za teste toksičnosti in radiosenzitivnosti. Po priporočilih dobavitelja (DSMZ GmbH) rastejo v mediju RPMI 1640, z 10% FBS in 1% antibiotika (penicilin/streptomycin).

**MCF10A** je spontano imortalizirana linija epiteljskih celic dojke iz pacientke s fibrocistično boleznijo dojke. Celice so po mnogih lastnostih običajne človeške epitelne celice in niso tumorigene v miškah. MCF10A celice smo dobili od prof. B. Sloane, z Oddelka za farmacijo, Wayne State University (Detroit, ZDA) in jih gojimo v priporočenem mediju DMEM/F12 (1:1), s 5% konjskega seruma, 10mM HEPES, 1% antibiotika (penicilin/streptomycin) in 2,5 mM L-glutamina ter z dodatkom epidermalnega rastnega faktorja, hidrokortizona in inzulina.

Vse celice smo gojili v inkubatorju na 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Mediji in dodatki so bili kupljeni pri podjetju Euroclone (Italija).

### **2.2.2. Modelni strupi**

Uporabljali smo organofosfatne analoge živčnih bojnih strupov dimefoks, paraokson-metil in paration-metil, ki smo jih dobili na Politehniko Nova Gorica od prof. Mladena Franka, kot modelni biološki toksin pa smo uporabili mikrocistin-LR (MCLR), ki smo ga kupili (Calbiochem, Švica).

### **2.2.3. Metode uporabljene za določanje citotoksičnega in genotoksičnega delovanja biološkega toksina mikrocistina-LR**

#### *Določanje citotoksičnega delovanja MCLR in vpliv na proliferacijo*

Vpliv MCLR na preživelost oziroma rast celic HepG2 smo določali s testom citotoksičnosti MTT. Citotoksično delovanje MCLR na celice HepG2 smo določali tako, da smo celice izpostavili različnim koncentracijam toksina (0, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml) različno dolgo (4, 8, 12, 16, 20 in 24 h), medtem ko smo pri določanju vpliva toksina na proliferacijo celic, le-te izpostavili za 21, 45, 69 in 93 h.

#### *Določanje genotoksičnega delovanja MCLR*

Genotoksično delovanje MCLR smo ugotavljali s testom komet s katerim lahko zaznamo poškodbe kot so eno- in dvo-verižni prelomi DNA, alkalno labilna mesta in prelome, ki nastanejo kot intermediati v procesih celičnega popravljanja, kot sta nukleotidno (NER) in bazno (BER) izrezovanje in so prehodnega značaja. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam MCLR (0, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml) za 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 8 h. S testom komet tako ovrednotimo prelome DNA, ki nastajajo v procesih celičnega popravljanja. Celice smo izpostavili delovanju MCLR v odsotnosti in prisotnosti inhibitorjev DNA popravljanja, citozin arabinozida (AraC;  $2 \times 10^{-5}$  M) in hidroksiuree (HU;  $2 \times 10^{-3}$  M) za 2, 4, 6, 8 in 12 h in nato izvedli test komet.

#### *Ugotavljanje, ali je oksidativni stres vpleten v genotoksično delovanje MCLR*

Povišan nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti zaradi delovanja MCLR smo določali spektrofotometrično s fluorescenčnim označevalcem DCFH-DA (2',7'-

dichlorofluorescein diacetate). Celice HepG2 predtretirane z DCFH-DA smo izpostavili MCLR (0, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml) in nato v 30-minutnih presledkih med 5-urno inkubacijo merili nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti.

Nastanek oksidativnih poškodb na DNA celic HepG2 zaradi delovanja MCLR smo določali z modificiranim testom komet. Pri tem smo uporabili specifične DNA popravljalne encime, ki prepoznajo mesta oksidiranih DNA baz. Celice smo za 2, 4 in 6 h izpostavili različnim koncentracijam MCLR na enak način kot pri ugotavljanju genotoksičnosti, le da smo dodali encim endonukleazo III (endoIII), ali formamidopirimidin *N*-glikozilazo DNA (fpg), ki prepozna oksidirane purine in purine z odprtim obročem ter 8-okso-gvanine. Na mestih, kjer encima prepoznata spremenjeno bazo, le-to izrežeta iz DNA vijačnice.

Vpletenost prostih kisikovih zvrsti pri nastajanju prelomov DNA in oksidaciji purinov zaradi delovanja MCLR smo določali z modificiranim testom komet. Pri tem smo uporabili specifični DNA popravljalni encim, fpg. Celice HepG2 smo izpostavili delovanju MCLR (1 µg/ml) v prisotnosti in odsotnosti različnih lovilcev prostih radikalov: TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl; 1mM), NAC (N-acetyl-L-cysteine; 5 mM), DFO (deferoxamine; 5 mM), DMTU (1,3-dimethyl-2-thiourea; 10 mM) in DMSO (dimethylsulphoxide; 0.5 vol %). TEMPOL je lovilec superoksidnih radikalov, NAC je prekursor glutationa in lovilec prostih radikalov na splošno, DFO je kelator železa, DMSO in DMTU pa sta lovilca hidroksilnih radikalov. Po 4-urni inkubaciji smo izvedli modificiran test komet.

#### *Ugotavljanje, ali MCLR vpliva na antioksidativni potencial celic HepG2*

Znotraj celični glutation (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine) je glavni neproteinski tiol, ki kot antioksidant ščiti celice pred oksidativnim stresom. V celicah najdemo prost glutation predvsem v reducirani obliki (GSH), ki se pri oksidativnem stresu pretvori v oksidirano obliko (GSSG) in nato ponovno v reducirano obliko s pomočjo encima glutation reduktaza.

Vpliv MCLR na nivo znotraj celičnega reduciranega glutationa (GSH) v celicah HepG2 smo določali spektrofotometrično s fluorigenim označevalcem monochlorobimane (mBCl). Celice HepG2 smo izpostavili cianobakterijskemu toksinu (0, 0.01, 0.1 in 1 µg/ml) za 10 minut, 2, 4, 6, 8 in 16 uh. Po tem času smo k živim celicam dodali mBCl (100 µM končna koncentracija) v 1x PBS. Koncentracija reduciranega glutationa je v razmerju z intenziteto fluorescence, ki smo jo izmerili s pomočjo spektrofotometra. Ugotavljali smo tudi, kakšna je vloga reduciranega glutationa pri genotoksičnem delovanju MCLR. Celice, ki smo jih gojili v prisotnosti in odsotnosti D,L-buthionine-[S,R]-sulfoximina, depletorja znotrajceličnega glutationa, smo izpostavili različnim koncentracijam MCLR za 2, 4 in 6 h na enak način kot pri ugotavljanju genotoksičnosti. Nato smo izvedli test komet. Na ta način smo ugotovili, ali so celice, ki smo jim znižali znotrajcelični reduciran glutation, bolj dovzetne za genotoksično delovanje MCLR.

S kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (QRT-PCR) smo določali izražanje mRNA  $\gamma$ -glutamylcistein sintetaze (GCS) v celicah, ki smo jih izpostavili delovanju MCLR.  $\gamma$ -glutamylcistein sintetaza je ključni encim v sintezi glutationa. Celice HepG2 smo izpostavili MCLR 2, 4, 6 in 8 ur in nato določali ekspresijo omenjenega gena.

#### *Ugotavljanje, ali MCLR povzroča programirano celično smrt*

V celicah HepG2, ki smo jih izpostavili MCLR smo merili sproščanje laktat dehidrogenaze (LDH) iz celic in število viabilnih celic v kulturi z merjenjem ATP-ja, ki nakazuje prisotnost metabolno aktivnih celic. Sprememba v sproščanju/puščanju LDH in znižanje ATP sta prva pokazatelja celične smrti. Programirano celično smrt smo določali s

testom razpršenosti, ki je preprosta in dokaj hitra metoda za določanje apoptotičnih jeder.

### **2.2.3. Metode uporabljene za določanje citotoksičnega in genotoksičnega delovanja organofosfatov in njihovega vpliva na izražanje genov**

#### *Test komet*

Potencialno genotoksičnost OP smo ugotavljali s testom komet (glej zgoraj). Celice smo tretirali z organofosfati v koncentracijah od 0,01 do 100 µg/mL za 4 in 24 h. Kadar smo uporabljali inhibitorje popravljanja smo hkrati dodali citozin arabinosid (AraC) in hidroksiureo (HU) v 20 µM oziroma 2mM koncentraciji. Celice smo obarvali z etidijevim bromidom (5 mg/ml) in analizirali pod fluorescentnim mikroskopom (Nikon, Eclipse 800), po 50 celic vsakega od treh neodvisnih poskusov. Slike smo analizirali s programsko opremo Comet IV, Perceptive Instruments.

#### *Tretiranje celic z organofosfati*

Celice smo tretirali z netoksičnimi koncentracijami organofosfatov. Toksičnost smo predhodno določili z uporabo MTT testa. Z dimefoksom smo tretirali v koncentracijah 0,1, 1, 10 in 100 µg/mL, po 24 in 72 h, s paraoksonom in parationom pa v koncentracijah 1, 10 in 100 µg/mL in sicer 4 in 24 h.

#### *Izolacija RNA, prepis v cDNA in določitev ekspresije izbranih genov*

Iz tretiranih celic in kontrol smo izolirali celotno RNA z dvema metodama. Prva zahteva uporabo fenolne raztopine Trizola po navodilih proizvajalca (Gibco, UK), druga pa komplet proizvajalca Promega (Total RNA Isolation Kit). Koncentracijo in kakovost RNA smo določili s pomočjo Ribogreena (Molecular Probes Inc). cDNA smo sintetizirali z uporabo kompleta Archive assay in kvantificirali ekspresijo izbranih genov z metodo, ki temelji na specifičnem pomnoževanju tarčnega zaporedja s polimerazno verižno reakcijo v realnem času RT-PCR na aparatu ABI 7900 HT Sequence Detection System. Uporabili smo naslednje komplete (Taqman Gene Expression Assays) po navodilih proizvajalca: hs 00153349 za p53, hs 000234753 za MDM-2, hs 00355782\_m1 za p21, hs 00169255 za GADD45A in hs 00227429 za pericentrin. Interno kontrolo je predstavljala sonda GAPDH. Vse kemikalije so bile kupljene pri Applied Biosystems. Podatke smo analizirali z  $\Delta\Delta C$  algoritmom in normalizirali glede na ekspresijo kontrole. Statistično značilnost razlik smo določili s t- testom.  $P < 0.05$  kaže na statistično značilne razlike.

## **2.3. Rezultati in razprava**

V naši raziskavi smo razvili metode za detekcijo oksidativnih sprememb na DNA človeških celic, za detekcijo sprememb v ekspresiji določenih genov, ki so pomembni v regulaciji celičnega cikla in za občutljiv bio-detekcijski sistem za oksidativne poškodbe na modelnih celicah. Kot modelne strupe smo uporabili organofosfate, kot modelni biološki toksin pa mikrocistin-LR (MCLR).

### **2.3.1. Delovanje mikrocistina**

Citotoksično delovanje MCLR smo določali s pomočjo testa MTT. HepG2 celice smo izpostavili različnim koncentracijam MCLR različno dolgo. V prvih 12 h tretiranja, MCLR na celice HepG2 ni deloval citotoksično. Preživelost se je začela zmanjševati po 16 h in se je statistično značilno razlikovala od netretiranih celic po 20 in 24 h pri dveh najvišjih koncentracijah toksina.

Pri ugotavljanju vpliva MCLR na proliferacijo celic HepG2, smo celice izpostavili različnim koncentracijam MCLR za 21, 45, 69 in 93 ur. Po enem dnevu izpostavitve celic MCLR smo opazili, da je MCLR zmanjšal sposobnost rasti in delitve celic, med nadaljno

inkubacijo pa nismo opazili vpliva na delitev HepG2 celic. Ugotovimo lahko, da MCLR v prvih 24. urah zavira delitev HepG2, medtem ko po daljšem času ne vpliva na proliferacijo celic.

Genotoksično delovanje MCLR smo določali na celicah HepG2 s pomočjo testa komet. Celice smo izpostavili delovanju različnih necitotoksičnih koncentracij toksina. Rezultati so pokazali, da je nastanek verižnih prelomov DNA odvisen od doze MCLR, saj so z naraščajočo koncentracijo toksina naraščale poškodbe DNA. Količina poškodb DNA se je prav tako spreminjala s časom izpostavitve celic toksinu in dosegla najvišje vrednosti po 4 h ter se z nadaljnjo izpostavitvijo počasi zmanjševala, dokler po 7 h ni ponovno dosegla kontrolnih vrednosti. Značilno povišan nastanek poškodb DNA smo opazili po štirih urah izpostavitve celic MCLR. Nivo verižnih prelomov se po dveh in štirih urah inkubacije ni razlikoval v skupinah, ki so bile izpostavljene toksinu v prisotnosti in odsotnosti inhibitorjev DNA popravljanja. Po šestih urah izpostavitve je % DNA v repu v prisotnosti inhibitorjev ostal približno enak kot po štirih urah, v odsotnosti inhibitorjev pa smo opazili zmanjšanje % DNA v repu, po vsej verjetnosti zaradi zalepljanja verižnih prelomov v procesu popravljanja DNA. To kaže, da so DNA prelomi večinoma intermediati, ki nastanejo v procesu popravljanja DNA poškodb povzročenih zaradi delovanja MCLR.

Naravo poškodb DNA, ki jih povzroča MCLR, smo ugotavljali z modificiranim testom komet. Uporabili smo specifična popravljalna encima DNA, endonukleazo III (endo III), ki prepozna oksidirane pirimidine in formamidopirimidin *N*-glikozilazo DNA (fpg), ki zazna 8-okso gvanine in purine z odprtim obročem S pomočjo encima endo III smo ugotovili, da MCLR značilno poviša količino endo III občutljivih mest, ki pa se po podaljšani izpostavitvi (6 h) uspešno popravijo. S pomočjo encima fpg, ki prepozna oksidirane purine, predvsem 8-oksogvanine, smo ugotovili, da so bili oksidirani purini po daljši izpostavitvi celic HepG2 MCLR še zmeraj prisotni v DNA in se niso uspešno popravili, temveč so se kopičili v vijačnici DNA.

Reaktivne kisikove zvrsti v celicah HepG2, ki smo jih izpostavili MCLR smo merili spektrofotometrično s fluorescenčnim označevalcem 2',7'-dichlorofluorescin diacetatom (DCFH-DA). Opazili smo od časa in koncentracije odvisno naraščanje prostih radikalov zaradi delovanja MCLR. Z modificiranim testom komet smo nadalje ugotavljali, kakšna je vloga ROS pri nastajanju verižnih prelomov DNA in oksidaciji purinov. Celice smo izpostavili delovanju MCLR v odsotnosti in prisotnosti različnih lovilcev prostih radikalov. Statistično značilno zmanjšanje DNA poškodb kot tudi oksidiranih purinov smo opazili v prisotnosti lovilca hidroksilnih radikalov (TEMPOL), prekursorja glutaciona (*N*-acetil-L-cistein) in specifičnega kelatorja železa (deferoksaminom). Lovilca hidroksilnih radikalov DMSO in DMTU sta le delno znižala količino verižnih prelomov in fpg občutljivih mest. Rezultati so pokazali, da številni lovilci prostih radikalov (TEMPOL, NAC, DFO, DMSO in DMTU) lahko celico zaščitijo pred nastankom verižnih prelomov DNA in oksidacijo purinov, ki jih povzroča MCLR, kar dodatno potrjuje, da so poškodbe nastale zaradi delovanja MCLR, posledica reaktivnih kisikovih zvrsti.

Ker igra reduciran glutation pomembno vlogo pri obrambi celic pred genotoksičnim delovanjem, nas je zanimalo, ali se količina reduciranega glutaciona v celicah HepG2 zaradi MCLR spreminja. To smo določali spektrofotometrično s fluorogenim označevalcem monochlorobimane (mBCl) v celicah, ki smo jih izpostavili delovanju različnih koncentracij MCLR. Že po 10 minutah izpostavitve celic toksinu smo opazili statistično značilno znižanje GSH. Raven GSH se je nato začela počasi poviševati in dosegla maksimalne vrednosti po 6 h tretiranja celic s toksinom, nato pa je po 8 h vsebnost reduciranega glutaciona v celicah ponovno dosegla kontrolni nivo. Izražanje gena,  $\gamma$ -glutamylcistein sintetaze, se je statistično značilno povišalo pri vseh mikrocistinu



izpostavljenih skupinah celic že po dveh urah. Po 6 h smo opazili znižano izražanje  $\gamma$ -GCS, ki se je močno zmanjšalo po 8 h izpostavljenosti. To kaže, v celicah delovanju MCLR pride do *de novo* sinteze glutaciona. Znano je, da je reduciran glutation prva znotraj celična obramba pred prostimi radikali, zato smo želeli ugotoviti, ali količina GSH v celici vpliva na nastanek verižnih prelomov DNA, ki nastanejo zaradi delovanja MCLR. Celice, ki smo jih gojili v prisotnosti in odsotnosti D,L-buthionine-[S,R]-sulfoximina, depletorja znotrajceličnega glutaciona, smo izpostavili različnim koncentracijam MCLR (10, 100 in 1000 ng/ml) za 2, 4 in 6 ur. Ugotovili smo, da se poškodbe DNA v skupinah celic, ki smo jih znižali raven glutaciona, ne popravijo po podaljšanem času izpostavitve temveč se kopičijo v DNA. Pri celicah, ki jim nismo znižali znotraj celičnega glutaciona pa smo opazili popraviljanje poškodb, ki jih povzroča MCLR. Ti rezultati dodatno potrjujejo, da je glutation pomembna obramba pred negativnimi učinki MCLR (detoksifikacija) in deluje kot lovilce prostih radikalov, ki nastanejo zaradi delovanja toksina. Ugotovili smo tudi, da mikrocistini vplivajo na programirano celično smrt. MCLR v HepG2 celicah povzroča poškodbe celične membrane, saj smo izmerili sproščanje laktat dehidrogenaze (LDH) iz celic kot tudi znižanje ATP-ja po daljšem času izpostavitve (16-24 ur). Programirano celično smrt smo določali s testom razpršenosti in ugotovili, da je odstotek apoptotičnih jeder naraščal tako s časom izpostavitve celic MCLR kot tudi z njegovo koncentracijo.

**Zaključimo lahko, da bioagensi cianobakterijskih toksinov povzročajo oksidativne poškodbe DNA, proti katerim se sesalske celice branijo z zvišanjem koncentracije glutaciona. Letalna posledica daljšega časa delovanja nizkih koncentracij teh strupov je apoptoza- odmiranje celic.**

### 2.3.2. Delovanje organofosfatov

Citotoksičnost in vpliv organofosfatov na celično proliferacijo (po 24, 48, 72 in 96 h izpostavljenosti) smo proučevali s pomočjo MTT testa. Modelne strupe so nam predstavljali organofosfati **dimefoks, paration in paraokson**. Naši rezultati kažejo, da je akutna toksičnost teh organofosfatov za netarčne (neživčne) celice razmeroma nizka, saj do koncentracije 100  $\mu$ g/ml le omejeno vplivajo na preživetje celic; dimefoks in paration nista citotoksična do koncentracije 100  $\mu$ g/ml (vključno), medtem ko je bil paraokson pri tej koncentraciji citotoksičen po daljšem času, (24 h) tretiranju.

V HepG2 celicah je dimefoks pri vseh koncentracijah povečal proliferacijo. v MCF10A celicah pa ni imel učinka na proliferacijo. Ker so HepG2 celice metabolno aktivne, smo domnevali, da je razlika v učinku verjetno posledica enega izmed metabolitov, ki nastane po določenem času izpostavitve HepG2 celic dimefoksu in ki je morda bolj toksičen kot sam organofosfat. To smo potrdili s testom proliferacije na HepG2 celicah; vsakih 24 h smo zamenjali medij s sveže pripravljenimi koncentracijami dimefoksa. V tem primeru dimefoks ni vplival na proliferacijo HepG2 celic.

Podobno kot citotoksičnost je tudi genotoksičnost dimefoksa je relativno nizka, najnižja med tremi uporabljenimi organofosfati. **Dimefoks** le v najvišji uporabljeni koncentraciji (100  $\mu$ g/ml) in ob hkratni uporabi inhibitorja popraviljanja DNA poškodb (AraC/HU) rahlo poveča število verižnih prelomov DNA. Pod vplivom **parationa** v koncentraciji 100  $\mu$ g/ml se je po 4 h statistično značilno povišalo število prelomov DNA v primerjavi s kontrolnimi celicami, ne glede na prisotnost ali odsotnost AraC/HU. Po 24 h delovanja smo statistično več DNA poškodb opazili pri koncentracijah parationa 10 and 100  $\mu$ g/ml. **Paraokson** je po 4 h (brez AraC/HU) in 24 h tretiranju povzročil zvišanje števila prelomov DNA le v najvišji uporabljeni koncentraciji. Ugotavljamo torej, da je genotoksičen potencial parationa in paraoksona višji od tistega za dimefoks, saj povzročata veliko število lomov DNA verig, paration celo v nižji koncentraciji kot

paraokson.

#### *Dolgodobni učinki organofosfatov – vpliv na izražanje izbranih genov*

Te smo ocenjevali z meritvami mRNA onkogenov in tumor-supresorskih genov, ki igrajo pomembno vlogo v regulaciji celičnega cikla in gena povezanega z odgovorom celic na poškodbe DNA. Vsi trije organofosfati spreminjajo izražanje izbranih genov, vendar je bil podobno kot pri genotoksičnem potencialu vpliv parationa praviloma največji.

Tumor supresor **P53**, ki med drugim uravnava tudi celični ciklus, je spremenjen v večini rakavih obolenj. Ob poškodbah DNA se njegova sinteza pravilnoma poveča. Če celice tretiramo z netoksičnimi koncentracijami **dimefoksa** za 24 h in 72 h se izražanje p53 poveča v vseh treh celičnih linijah. V HepG2 in NC-NC celicah so razlike statistično značilne le pri najvišji uporabljeni koncentraciji dimefoksa, v MCF10A celicah pa se ekspresija P53 zviša za približno 50%, bolj po daljšem času (72 h) izpostavljenosti dimefoksu. Čeprav v teh celicah ekspresija narašča skupaj z naraščujočo koncentracijo dimefoksa, razlike v ekspresiji P53 med posameznimi koncentracijami dimefoksa niso statistično značilne. Pod vplivom **parationa** se izražanje P53 v HepG2 celicah zviša pri vseh treh koncentracijah, vendar so po 4 h razlike statistično značilne le pri višjih dveh koncentracijah (10 in 100 µg/ml), po 24 h pa pri koncentracijah parationa 1 in 100 µg/ml. Zelo podobno se izražanje poveča v NC-NC celicah. Nasprotno pa **paraokson** izražanje P53 v HepG2 celicah ne spreminja bistveno, saj smo statistično značilno povečanje P53 opazili le po daljši inkubaciji v najvišji uporabljeni koncentraciji paraoksona. Zanimivo pa se izražanje P53 v NC-NC celicah po 4 h inkubaciji s paraoksonom statistično značilno poveča pri koncentracijah 1 in 100 µg/ml, ne tudi pri koncentraciji 10 µg/ml. Nasprotno pa se po daljši inkubaciji s paraoksonom v višjih koncentracijah, izražanje P53 mRNA v NC-NC celicah statistično značilno zniža.

**Naši rezultati so pokazali, da vsi trije OP povzročijo povečanje izražanja P53 mRNA pri obeh testiranih celičnih linijah. Paration je izražanje P53 celo podvojil. To kaže na veliko občutljivost gena P53 kot kazalca toksičnega delovanja organofosfatov.**

Bolj specifičen pokazatelj genotoksičnosti je po literaturnih podatkih je **P21**, kinazni inhibitor, ki je tesno povezan s P53 (slednji stimulira njegovo izražanje) in katerega pomembna vloga je inhibicija celičnega cikla. Čeprav deluje P53 stimulatивно na izražanje P21, ki posledično inhibira celični cikel, se ekspresija P21 mRNA zaradi delovanja **dimefoksa** ne spreminja bistveno pri nobeni celični liniji. Pod vplivom **parationa** se izražanje P21 v HepG2 celicah statistično značilno spremeni (poveča) le pri najvišji uporabljeni koncentraciji parationa (100µg/ml); po 4 h inkubaciji 30%, po 24 h inkubaciji s parationom pa se ekspresija p21 poveča kar za 4-krat, kar potrjuje višji genotoksični potencial tega organofosfata. V NC-NC celicah se poveča ekspresija P21 le pri najvišji koncentraciji parationa in sicer po daljšem času izpostavljenosti, 24 h. Precejšnje razlike med vplivom parationa na izražanje p21 v celicah lahko delno razložimo z lastnostmi celic; NC-NC so imortalizirane limfoblastoidne celice brez rakavih karakteristik, medtem ko so HepG2 hepatoblastomske, visoko metabolno aktivne celice. Tudi **paraokson** ima omejen vpliv na izražanje P21 v HepG2 in v NC-NC celicah. **V obeh celičnih linijah smo opazili statistično značilno povečano izražanje P21 mRNA pri najvišji uporabljeni koncentraciji paraoksona (100µg/ml) po 24 h. Gen bomo zato uporabili za pripravo celičnega testnega sistema.**

V povezavi s P53 deluje eden od njegovih inhibitorjev, **MDM-2**. Spremembe izražanja MDM-2 pod vplivom **dimefoksa** so bile zanemarljive tako pri limfoblastoidni in hepatomski celični liniji, pod vplivom **paraoksona** pa so statistično značilne spremembe (a le za okoli 20%) izražanja MDM-2 gena v HepG2 celicah opazne pri

najvišji uporabljeni koncentracijo paraoksona; zanimivo pa se izražanje po 4 h statistično značilno zniža, po 24 h inkubaciji pa zviša. Podobno je omejen vpliv paraoksona v NC-NC celicah, saj so spremembe ekspresije MDM-2 zanemarljivo majhne. Ta razlika med hepatomskimi in limfoblastoidnimi celicami je značilna tudi za vpliv **parationa**. Izražanje MDM-2 v HepG2 celicah se pod vplivom parationa viša; po 4 h inkubaciji se statistično značilno zviša le pri najvišji uporabljeni koncentraciji, po 24 h inkubaciji pa smo opazili statistično značilno povečanje izražanja MDM-2 pri vseh treh uporabljenih koncentracijah parationa. Nasprotno pa se izražanje MDM-2 mRNA v NC-NC celicah se pod vplivom parationa ne spreminja bistveno. **Ugotavljamo, da zvišanje gena MDM-2 celično specifično in posebno pri celicah limfoidnega sistema, ki so potencialno uporabne za testiranje izpostavljenih oseb, ta gen ni bil prizadet. Zato je manj uporaben kot indikator potencialne subletalne izpostavljenosti.**

Gen **GADD45a** je ob poškodbah DNA ponavadi induciran. Ta indukcija je lahko vezana na P53 ali od njega neodvisna. **Dimefoks** ni bistveno vplival na izražanje GADD45a mRNA v hepatoblastomskih celicah, po daljšem času delovanja pa je prepolovil njegovo izražanje v obeh nerakavih linijah. **Paration** povzroči statistično značilno višje izražanje GADD45a mRNA v HepG2 po 24 h inkubaciji s parationom v vseh treh koncentracijah, v NC-NC celicah pa le pri najvišji uporabljeni koncentraciji parationa. Nasprotno pa paration povzroči statistično značilno zmanjšanje izražanja GADD45a v NC-NC celicah po 4 h in tudi pri nižjih koncentracijah (1 in 10 µg/ml) parationa po 24 h inkubaciji. Vpliv **paraoksona** na izražanje GADD45a je zelo podobno v obeh celičnih linijah. Po 4 h paraokson zniža izražanje GADD45a, po 24 h pa je izražanje GADD45a statistično značilno povišano pri vseh treh uporabljenih koncentracijah paraoksona. **Znižanje GADD45a po krajšem času in povišanje po daljšem času izpostavljenosti OP pri obeh celičnih linijah kaže na izrazito odvisnost aktivacije nekaterih genov (prevsem genov, ki ustavijo rast in omogočijo popraviljanje DNA) od časa delovanja potencialnega toksifikanta. Povečano izražanje po daljšem času izpostavljenosti pri vseh treh celičnih linijah kaže na uporabnost izražanja tega gena kot bioindikatorja izpostavljenosti OP.**

Velik vpliv sta imela čas delovanja OP in vrsta celic tudi na ekspresijo proteina delitvenega vretena, ki vpliva na stabilnost kromosomske strukture, **pericentrina**. **Dimefoks** ne vpliva na izražanje pericentrina v HepG2, poviša pa njegovo ekspresijo v eni nerakavi liniji (MCF10A) in jo zniža v drugi (NC-NC) na polovico, a le pri najnižji koncentraciji dimefoksa in sicer po daljšem času inkubacije. Tudi **paration** nima večjega vpliva na izražanje pericentrina v HepG2 celicah. Izražanje v NC-NC celicah se statistično značilno zviša pri nižjih koncentracijah parationa (1 µg/ml in 10 µg/ml). Nasprotno pa se izražanje pericentrina po daljši (24 h) inkubaciji v najvišji koncentraciji parationa zmanjša na vsega polovico izražanja tega gena v netretiranih celicah. Pod vplivom **paraoksona** se izražanje pericentrinske mRNA tako v HepG2 kot v NC-NC celicah po 4 h inkubaciji statistično značilno zniža. Nasprotno pa se po 24 h inkubaciji s paraoksonom v koncentraciji 1 in 100 µg/ml izražanje pericentrina v HepG2 celicah statistično značilno zviša (a le do 20%), ne spremeni se pa izražanje pericentrina v NC-NC celicah. **Ugotavljamo, da vsi trije OP prej ali slej povzročijo zmanjšanje izražanja pericentrina, paraokson že po krajšem času izpostavljenosti. Kljub statistični značilnosti so bile razlike v ekspresiji pericentrina pod vplivom OP majhne, zato je ta gen manj primeren za razvoj celičnega testnega sistema ali kot bioindikator subletalne izpostavljenosti.**

### 2.3.3. Razvoj celičnega detekcijskega sistema

Celice se na okoljske toksine odzivajo s splošnimi obrambnimi mehanizmi, ki so skupni

veliko sesalcev. Večina teh odzivov je povezana namreč z indukcijo določenih genov (encimov), ki so vpleteni v celično obrambo. Zato razvijamo testni sistem, ki temelji na reporterskem genu, ki se bo odzval na genotoksični stres. Odločili smo se za pripravo celične linije, ki ima reporterski gen za zeleni fluorescentni protein (EGFP) vezan na promotorsko regijo gena, ki kodira za inhibitor celičnega ciklusa p21/WAF. Izražanje p21 se namreč specifično poveča pri izpostavljenosti genotoksičnim dejavnikom. Z vezavo p21 promotorja na EGFP lahko enostavno spremljamo aktivacijo p21 promotorja z opazovanjem fluorescence celic (izražanja zelenega fluorescentnega proteina). Tako lahko hitro in enostavno določimo genotoksični potencial kemikalij. V tem delu projekta pa smo spremenili objekt – same celice; namesto ribje celične linije smo se odločili za razvoj detekcijskega sistema z reporterskim genom na celicah človeškega izvora, HepG2. Ta celična linija je visoko metabolno aktivna in na njej smo že opravili teste citotoksičnosti in genotoksičnosti ter preverili izražanje stresnih genov (glej zgoraj) po inkubaciji z organofosfati. Sklepamo, da rezultati na človeških celicah bolje odražajo dogajanje v človeškem organizmu in s tem oceno tveganja za ljudi, kot celice rib.

Najprej smo z metodo elektroporacije vstavili v HepG2 celice reporterski gen EGFP (enhanced green fluorescent protein). Uporabili smo komercialno dostopen vektor p53-EGFP (Clontech). Izolirali smo nekaj klonov, ki stabilno izražajo EGFP protein (torej z najizrazitejšo fluorescenco) in jih nagojili v večji količini. Te celične linije (klone) bomo uporabili kot pozitivno kontrolo v detekcijskem sistemu, uporabne pa so tudi pri testih viabilnosti in proliferacije, kjer se po tretmaju s toksičnimi snovmi enostavno meri fluorescence. Za konstrukcijo vektorja, kjer je EGFP vezan na promotorsko regijo p21 smo uporabili plazmid WWP-LUC1, ki nam ga je podaril dr. Bert Vogelstein, The John Hopkins Oncology Center, Baltimore, ZDA. Iz njega smo izrezali promotorsko regijo in jo vstavili v plazmid z EGFP ter izvedli transfekcijo v HepG2 celice z metodo elektroporacije. Za pripravo stabilne linije, ki se bo najmočneje odzivala na tretma z modelnimi genotoksičnimi kemikalijami z intenziteto fluorescence, trenutno še poteka selekcija z geneticinom.

## 2.4. Zaključki

Namen raziskave je bil razviti metode za detekcijo dologodobnih učinkov subletalnih koncentracij substanc (biagensov), ki v višjih koncentracijah delujejo močno toksično. Kot modelne substance smo uporabili potencialne živčne strupe (in komponente gnojil) organofosfate (dimefoks, paration in paraokson) ter ciklični peptidni strup mikrocistin-LR (MCLR), ki se v večji meri sprošča v vodno okolje ob cvetenju cianobakterij. Novost projekta je, da smo učinke preskušali na genetskem materialu človeških jetrnih celic HepG2, na limfobalstoidnih celicah NC-NC, ter na epiteliju dojke (modelnih celic MCF10A), kar je relevantno za določanje poškodb izpostavljenih vojnih in civilnih oseb. Rezultati so pokazali, da je:

1) V zvezi z delovanjem mikrocistina (MCLR) lahko **zaključimo, da bioagensi cianobakterijskih toksinov povzročajo oksidativne poškodbe DNA, proti katerim se sesalske celice branijo z zvišanjem koncentracije glutationa. Letalna posledica daljšega časa delovanja nizkih koncentracij teh strupov je apoptoza- odmiranje celic.**

2) Vpliv uporabljenih organofosfatov, dimefoksa, parationa in paraoksone na spremembe izražanja izbranih tarčnih genov, ki kontrolirajo celični cikel (P53, P21, MDM-2, GADD45a) in na gen za protein delitvenega vretena, pericentrin, je **časovno odvisen** in to specifično za posamezne gene in za vrsto celic. Ugotovili smo, da je učinek odvisen od vrste OP: dimefoks ne kaže genotoksičnega potenciala, ima pa verjetno tumor

promotorsko delovanje, medtem ko sta paraokson in še posebno paration, genotoksična in potencialna iniciatorja tumorigeneze. **Izmed izbranih genov smo konzistentno in značilno povišanje izražanja izmerili pri P53 in to pri vseh vrstah celic z vsemi tremi OP, medtem, ko sta povišano izražanje P21 povzročila le paration in paraokson.**

3) Ugotovili smo, da je merjenje sprememb izražanja mRNA genov **P53, P21 in GADD45a možno uporabiti kot bioindikatorje izpostavljenosti ljudi (vojakov) subtoksičnim koncentracijam organofosfatov.** Potrebne pa so nadaljne raziskave, ki bodo pokazale občutljivost in specifičnost teh bioindikatorjev pri uporabi.

4) Ti rezultati so tudi osnova za razvoj novega celičnega sistema za hitro detekcijo subletalnih in potencialnih genotoksičnih učinkov, ki se bo lahko uporabljal tudi v mobilnih laboratorijih. **V človeških celicah hepatoma HepG2 smo pripravili genetski konstrukt z svetlobno označenim genom EGFP vezanim na promotor za protein celičnega ciklusa P21, ki se na genotoksične učinke najhitreje odziva.** Izbor stabilnih celic s tem konstruktom, ki se najmočneje odzivajo na OP z intenziteto fluorescence še poteka in bo predmet nadaljevanja tega projekta. V pripravi so tudi konstrukti s P53 in GADD45a, ki bodo omogočali bolj specifično razlikovanje med genotoksičnimi in negenotoksičnimi subletalnimi učinki.

### 3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen<sup>2</sup> rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
  - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
  - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

---

<sup>2</sup> Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta za naročnike in glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

- Razvili in priredili smo metodologijo za preverjanje genotoksičnega delovanja biotoksina (mikrocistina) in potencialnih kemičnih agensov (organofosfatov) na človeške celice.
- Ugotovili smo, kakšen je vpliv bioagensov na izražanje izbranih genov (onkogenov in tumor supresorskih genov - P53, P21, GADD45a, MDM-2 in pericentrin) in izbrali tarčni gen P21, ki bo ključni indikator subletalnih (genotoksičnih) poškodb človeških celic.
- Razvili smo *in vitro* celični sistem (na človeških celicah) za hitro detekcijo genotoksičnega stresa.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta za naročnike in glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

- Razvoj protokola za ugotavljanje genotoksičnega delovanja – dolgodobno delovanje - bioagensa na izpostavljene vojake in civiliste, oziroma identifikacija rizičnih skupin in ocena tveganja.
- Razvoj enostavnega celičnega detektorskega sistema za uporabo v terenskih laboratorijih.
- Svetovanje ustreznim službam v primeru uporabe bioagensa v vojni ali terorističnem napadu.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Patria, Finska

3.7. Število diplomantov, magistrrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

Ena doktorantka je zaključila izobraževanje, dva delata na tej tematiki za doktorat.

#### 4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

-EU 5FP project: Razvoj testov za detekcijo in predvidevanje ko- in anti-mutagenih sestavin hrane s celicami človeškega izvora (doc. dr. Metka Filipič, 2000-2005).  
-EU-6FP Integrated Project # 503297: Ekstracelularne proteaze pri raku: Novi diagnostični markerji, terapevtske tarče in tumorski dejavniki (CANCERDEGRADOME) 2004-2009 (prof dr. Tamara Lah)  
- Bilateral BI-SCG/05-06-10: Vpliv hkratnega delovanja mikrocistinov, estrogena in tireoidnih hormonov na citogenske spremembe in poškodbe DNA v kulturah človeških limfocitov in HepG2 celicah (doc. dr. Metka Filipič)  
- Partnerships in Science Projects: PSP11/06: Izolacija in karakterizacija rakavih izvornih celic iz humanih glioblastomov (prof.dr. Tamara Lah)  
- Znanstveno-tehnološko sodelovanje z Norveško 2006-2007: Karakterizacija izvornih možganskih tumorskih celic (prof.dr. Tamara Lah)

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Skupne objave in izmenjava študentov in raziskovalcev.

### 5. Bibliografski rezultati<sup>3</sup> :

*Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.*

Priloženi so izpisi za vse sodelujoče raziskovalce. Osenčena so dela ki so nastala v okviru tega projekta.

<sup>3</sup> Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>



**6. Druge reference<sup>4</sup> vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:**

Predstavitev rezultatov projekta delegaciji Centra za doktrino in razvoj pri MORS-u (Mag. Andrej Osterman) junija 2006.

---

<sup>4</sup> Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije. Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitvah projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.